

IDENTIFICACIÓ DE microRNAs CIRCULANTS I PLACENTARIS EN OBESITAT GESTACIONAL I LA SEVA RELACIÓ AMB PARÀMETRES METABÒLICS MATERNES I EL CREIXEMENT PRE I POSTNATAL

Alexandra Bonmatí Santané

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/461800>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-
NoComercial-CompartirIgual

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-
CompartirIgual

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-
ShareAlike licence



Tesi Doctoral

Identificació de microRNAs circulants i placentaris
en obesitat materna gestacional i la seva relació
amb paràmetres metabòlics materns i el
creixement pre i postnatal

Alexandra Bonmatí i Santané

2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized triangle and the name "Alexandra" written in cursive.



Tesi Doctoral

Identificació de microRNAs circulants i placentaris
en obesitat materna gestacional i la seva relació
amb paràmetres metabòlics materns i el
creixement pre i postnatal

Alexandra Bonmatí i Santané

2017

CIÈNCIES EXPERIMENTALS I SOSTENIBILITAT

Tesi dirigida per:

Dr. Abel López-Bermejo

Dra. Judit Bassols Casadevall

Memòria per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona



Dr. Abel López-Bermejo, de la Universitat de Girona,

DECLARO:

Que el treball titulat "Identificació de microRNAs circulants i placentaris en obesitat materna gestacional i la seva relació amb paràmetres metabòlics materns i el creixement pre i postnatal", que presenta **Alexandra Bonmatí Santané** per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la meua direcció i que compleix els requisits per poder optar a aquest títol.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Dr. Abel López-Bermejo

Girona, 20 de juny de 2017



Dra. Judit Bassols Casadevall, de la Universitat de Girona,

DECLARO:

Que el treball titulat "Identificació de microRNAs circulants i placentaris en obesitat materna gestacional i la seva relació amb paràmetres metabòlics materns i el creixement pre i postnatal", que presenta **Alexandra Bonmatí Santané** per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requisits per poder optar a aquest títol.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Dra. Judit Bassols Casadevall

Girona, 20 de juny de 2017

Agraïments

Aquesta història va començar ara fa 5 anys, amb una sessió del dr. Abel López-Bermejo al servei de ginecologia i obstetria de l'hospital, on ens presentava la proposta d'un projecte d'investigació pel qual necessitava la nostra col·laboració. Des del primer moment vaig veure clar que no podia deixar escapar l'oportunitat i no vaig tardar a contactar, tímidament, amb ell. Així que el primer agraïment és pel dr. López-Bermejo, per engrescar-me des d'un principi en el seu nou projecte i donar-me l'oportunitat de formar part del seu equip.

A la dra. Judit Bassols, per introduir-me en el món dels microRNAs, per transmetre'm els seus coneixements i sobretot, per la seva infinita paciència.

Agraïr també a la resta de l'equip la seva col·laboració, en Ferran, l'Esti, la Sílvia, i tot el personal del laboratori; i a la dra. Gemma Carreras per ajudar-me a formar part d'aquest petit gran equip i per ser-hi sempre.

A la dra. Elena Álvarez que des del primer moment em va donar el seu suport en aquest projecte i s'ha il·lusionat en cada pas que he assolit. Al dr. Josep Maria Ramos per haver-me inculcat des del primer dia que vaig entrar a l'hospital un esperit curiós i crític. A la dra. Eva López, en un principi tutora de resident, després, gran suport i ajuda dins i fora de l'hospital.

I a la resta de companys, adjunts i residents, als que hi sou i als que ja no, per haver compartit amb mi tots aquests anys de noves experiències. I a tot el personal de sala de parts i del PASSIR, llevadores i auxiliars, per haver participat activament en la recollida de pacients i de placentes, a vegades a hores intempestives.

Vull donar les gràcies a la meva família, per escoltar les meves inquietuds i les meves pors a diari i interessar-vos per l'evolució del treball. A en David, pels molts caps de setmana tancats a casa sense queixes i per saber contagiar-me la teva serenitat. I sobretot, a l'àvia Roser, sense ella res seria com és.

Finalment, vull donar les gràcies a totes les famílies: mares, pares, nens i nenes, que formen part d'aquest treball.

Gràcies a tots.

Sigles, abreviatures i acrònims

Ago2	proteïna Argonaute 2
AUC	àrea sota la corba
β -HCG	porció β de la hormona gonadotropina coriònica
CxMC	clúster de microRNAs del cromosoma x
CAP	centre d'atenció primària
Ct	cicle tèrmic
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DM	diabetis mellitus
DNA/ADN	àcid desoxiribonucleic
EFN-B2/B4	<i>Ephrin receptor B2/B4</i>
eIF4E/4G	<i>eukaryotic initiation factor 4E/4G</i>
EUA	Estats Units d'Amèrica
FATP	<i>fatty acid transport protein</i>
FIV	fecundació in vitro
GLUT	<i>glucose transport protein</i>
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL-c	colesterol-lipoproteïna d'alta densitat (<i>high-density lipoprotein</i>)
HLA	antigen leucocitari humà (<i>human leukocyte antigen</i>)
HOMA-IR	<i>homeostatic model assesment</i> – resistència a la insulina
HPL	hormona lactogen placentari
HTA	hipertensió arterial
IDF	federació internacional de diabetis
IGF	factor de creixement insulínic (<i>insulin growth factor</i>)
IL	interleuquina
IMC	índex massa corporal
IOM	<i>institute of medicine</i>
IR	receptor insulina
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
miRNA	microRNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NCEP-ATP	<i>national cholesterol education program – adult treatment panel</i>
OBGest	obesitat gestacional (increment excessiu de pes)

OBPre	obesitat pregestacional
PASSIR	programa d'atenció a la salut sexual i reproductiva
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTEN	proteïna <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RCIU	retard de creixement intrauterí
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA/ARN	àcid ribonucleic
RT-PCR	<i>real time - polymerase chain reaction</i>
SEM	<i>desviació estàndard de la mitjana</i>
SDS	<i>standard deviation score</i>
TA S/D	tensió arterial sistòlica/diastòlica
TG	triglicèrids
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLDA	<i>Taqman Low Density Array</i>
TNF	factor de necrosi tumoral (<i>tumor necrosi factor</i>)
TTOG	test tolerància oral a la glucosa
VLD-LP	lipoproteïnes de molt baixa densitat
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNT	via <i>Wingless-related Integration</i>

Índex de Figures

Figura 1. Criteris pel diagnòstic de la síndrome metabòlica segons la National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III)	4
Figura 2. Funcions de la insulina sobre el teixit adipós, el fetge i el múscul esquelètic	5
Figura 3. Conseqüències de l'obesitat pregestacional durant l'embaràs	7
Figura 4. Distribució de l'augment de pes normal durant la gestació	12
Figura 5. Guany de pes gestacional recomanat per la IOM	13
Figura 6. Conseqüències de l'augment excessiu de pes durant la gestació ..	14
Figura 7. Sensibilitat a la insulina durant la gestació	18
Figura 8. Representació dels efectes de la lipòlisi durant la gestació	20
Figura 9. Conseqüències de la diabetis gestacional	22
Figura 10. Implantació del blastocist a la decídua materna	24
Figura 11. Esquema de la placenta	25
Figura 12. Placenta humana	26
Figura 13. Regulació de la funció placentària	27
Figura 14. Regulació de la via mTOR a nivell placentari	29
Figura 15. Epigenètica	33
Figura 16. Síntesi de microRNA	35
Figura 17. Processament de pri-miRNA a microRNA	36
Figura 18. Localització dels gens codificants per microRNA	36
Figura 19. Complementarietat microRNA-mRNA	37
Figura 20. Esquema de la traducció proteica.....	38
Figura 21. Esquema de la inhibició dels microRNAs en la iniciació de la traducció	39
Figura 22. Inhibició dels microRNAs a nivell post-iniciació	40
Figura 23. Inhibició dels microRNAs a nivell de la degradació del mRNA	40
Figura 24. microRNAs extracel·lulars derivats del trofoblast	43
Figura 25. Clúster C19MC	45

Figura 26. Representació de l'evolució i destí del trofoblast governat per microRNAs	46
Figura 27. Expressió de microRNAs en estats pre-implantacionals	48
Figura 28. Expressió de microRNAs en plasma durant la gestació i a les 24 hores post-part	49
Figura 29. Expressió de microRNAs en obesitat/resistència a la insulina	50
Figura 30. Exemples dels microRNAs més validats en placenta i plasma en preeclàmpsia	53
Figura 31. MicroRNAs associats a placentació anormal	54
Figura 32. Desenvolupament de microRNAs terapèutics	56
Figura 33. Exemples de microRNAs terapèutics a estudi	57
Figura 34. Recomanacions de guany de pes durant l'embaràs en funció de l'IMC pregestacional segons l'IOM	70
Figura 35. Biòpsia de placenta	72
Figura 36. Esquema d'extracció d'ARN total	75
Figura 37. Imatge d'una placa de TLDA	78
Figura 38. Resultats de TLDA	79
Figura 39. Expressió relativa mitjançant cicles tèrmics	80
Figura 40. Taqman® microARN Assays de plasma	82
Figura 41. Taqman® microARN Assays de placenta	82
Figura 42. Esquema resum de l'estudi dels microRNAs	83
Figura 43. Diagrama de Venn, on es mostren els microRNAs expressats en plasma del segon trimestre de gestació dels diferents grups d'estudi	92
Figura 44. Gràfics de barres on es mostra l'expressió relativa dels microRNAs expressats en plasma matern durant el segon trimestre de gestació	94
Figura 45. Corbes ROC per a la precisió discriminatòria dels microRNAs en plasma matern durant el segon trimestre de gestació	95
Figura 46. Gràfics de dispersió del guany de pes durant la gestació amb els microRNAs expressats en plasma matern durant el segon trimestre	99
Figura 47. Gràfics de dispersió de la glucosa i de la HbA1c durant la gestació amb els microRNAs expressats en plasma del segon trimestre	100

Figura 48. Gràfics de dispersió de paràmetres metabòlics durant la gestació amb els microRNAs seleccionats expressats en plasma matern durant el segon trimestre	101
Figura 49. Gràfics de dispersió de paràmetres de creixement prenatal amb els microRNAs expressats en plasma matern durant el segon trimestre	104
Figura 50. Gràfics de dispersió de paràmetres de creixement postnatal amb els microRNAs expressats en plasma matern durant el segon trimestre	104
Figura 51. Diagrama de Venn, on es mostren els microRNAs expressats en placenta dels diferents grups d'estudi	107
Figura 52. Gràfics de barres on es mostra l'expressió relativa dels microRNAs detectats en placenta	109
Figura 53. Gràfics de dispersió dels paràmetres de creixement prenatal amb els microRNAs seleccionats expressats en placenta	116
Figura 54. Gràfics de dispersió de paràmetres de creixement postnatal amb els microRNAs seleccionats expressats en placenta	117
Figura 55. Gràfic de dispersió de la relació entre miR-296 en plasma i miR-296 en placenta	123
Figura 56. Gràfics de dispersió de paràmetres de creixement neonatal amb el miR-296 circulant	124
Figura 57. microRNAs circulants relacionats amb el creixement prenatal i postnatal	132
Figura 58. Vies de senyalització a les que s'associen els microRNAs plasmàtics associats a obesitat materna	133
Figura 59. microRNAs placentaris relacionats amb el creixement prenatal i postnatal	135
Figura 60. Vies de senyalització a les quals s'associen els microRNAs placentaris associats a obesitat materna	136
Figura 61. Efectes de miR-296 sobre el creixement pre i postnatal.....	139
Figura 62. Esquema resum dels microRNAs plasmàtics i placentaris relacionats amb el creixement prenatal i postnatal.....	142

Índex de Taules

Taula 1. Característiques de la població d'estudi	90
Taula 2. Expressió relativa dels microRNAs expressats en plasma durant el segon trimestre de gestació	93
Taula 3. Correlacions entre l'expressió relativa dels microRNA i els paràmetres endocrinometabòlics materns	96
Taula 4. Anàlisi de regressió multivariant de les característiques metabòliques relacionades amb l'obesitat com a variable dependent en totes les embarassades de l'estudi	98
Taula 5. Correlacions entre expressió relativa de microRNA i paràmetres de creixement	102
Taula 6. Anàlisi de regressió multivariant amb els paràmetres de creixement pre i postnatal com a variables dependents en totes les dones embarassades de l'estudi.....	103
Taula 7. Rutes metabòliques que contenen els gens diana dels microRNAs expressats en plasma matern en segon trimestre de gestació associats amb paràmetres de creixement pre i postnatal	105
Taula 8. Expressió relativa dels microRNAs expressats en placenta.....	108
Taula 9. Correlacions entre expressió relativa dels microRNA placentaris i els paràmetres endocrinometabòlics materns	110
Taula 10. Anàlisi de regressió multivariant amb els paràmetres endocrinometabòlics materns com a variable dependent en totes les dones de l'estudi	112
Taula 11. Correlacions entre expressió relativa de microRNA placentaris i els paràmetres de creixement pre i postnatal	113
Taula 12. Anàlisi de regressió multivariant amb els paràmetres de creixement pre i postnatal com a variables dependent en totes les dones embarassades	115
Taula 13. Rutes metabòliques que contenen els gens diana dels microRNAs expressats en placenta associats amb paràmetres de creixement pre i postnatal	118

Taula 14. Els 10 microRNA més expressats en placenta i la seva expressió en plasma durant el segon trimestre en grup control, GestOB, PreOB.....	120
Taula 15. Expressió en plasma dels microRNAs placentaris associats amb paràmetres obesogènics	121
Taula 16. Correlació de l'expressió de microRNAs en mostres de plasma en segons trimestre de gestació amb paràmetres de creixement pre i postnatal en totes les dones incloses a l'estudi	122
Taula 17. Anàlisi de regressió multivariant pel miR-296	123

Resum

Els microRNAs (miRNAs) són petits fragments d'ARN monocatenari no codificants que regulen l'expressió gènica a nivell posttranscripcional. S'expressen de manera específica en els teixits i també es troben en la circulació sanguínia. La placenta humana mostra un perfil específic de microRNAs que està desregulat en alteracions de l'embaràs com la preeclàmpsia i el retard de creixement intrauterí. Els microRNAs circulants han estat descrits com a valuosos biomarcadors i possibles dianes terapèutiques per a malalties metabòliques com l'obesitat, la diabetis i el risc cardiovascular. És ben conegut que l'obesitat abans i durant l'embaràs té efectes adversos sobre la salut de la mare i també en el desenvolupament del fetus. Els nounats de mares amb obesitat tenen més pes en néixer i major risc de patir obesitat i malalties associades a l'edat adulta. Es desconeix si l'obesitat materna afecta al perfil de microRNAs i si aquests microRNAs poden tenir un paper important en la regulació del creixement pre i postnatal.

En aquest treball s'ha determinat el perfil de microRNAs circulants i placentaris en dones amb obesitat pregestacional i gestacional, i s'han estudiat les associacions d'aquests microRNAs amb paràmetres endocrinometabòlics durant l'embaràs i amb paràmetres de creixement pre i postnatal.

La població d'estudi va consistir en 70 dones caucàsiques l'embaràs de les quals va cursar sense complicacions (excepte obesitat pregestacional o gestacional) controlades a l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta. Les dones es van agrupar segons el seu índex de massa corporal pregestacional i l'augment de pes durant l'embaràs en control (n=25), obesitat pregestacional (OBPre, n=20) i obesitat gestacional (OBGest, n=25). El perfil de microRNAs es va estudiar en mostres de plasma de segon trimestre de gestació i en mostres de placenta obtingudes al néixer, mitjançant Arrays TaqMan de baixa densitat (TLDA) en un subgrup de 18 gestants (6 Controls, 6 OBPre i 6 OBGest). Els resultats es van validar en tota la cohort d'estudi mitjançant qPCR i es van correlacionar amb el fenotip matern durant la gestació (composició corporal i marcadors metabòlics) i el fenotip del nadó (pes i longitud al naixement i als 1, 4, 6 i 12 mesos de vida). Finalment, es van realitzar estudis *in silico*,

amb base de dades informàtiques, per determinar els mRNA diana i les possibles rutes metabòliques regulades pels microRNAs d'interés.

En plasma, els resultats mostren 13 microRNAs desregulats en obesitat materna. La majoria d'aquests s'associen amb paràmetres metabòlics durant l'embaràs. A més, els miR-340, miR-423-5p i miR-652 s'associen negativament amb el creixement prenatal i els miR-29c, miR-128a i miR-221 s'associen negativament amb el creixement postnatal. En placenta, els resultats mostren 8 microRNAs desregulats en obesitat materna, dels quals els miR-100-3p, miR-296-5p, miR-487-3p i miR-1285-3p s'associen amb paràmetres metabòlics durant l'embaràs i mostren associacions negatives amb el creixement prenatal i positives amb el creixement postnatal.

Entre els microRNAs placentaris, el miR-296-5p es troba present en plasma de segon trimestre de gestació, i s'associa amb la seva expressió en placenta i amb els paràmetres de creixement pre i postnatal.

Estudis *in silico* mostren que tots aquests microRNAs d'interés en plasma i placenta estan relacionats amb rutes de senyalització de la insulina i/o proliferació cel·lular.

Amb aquest treball proporcionem la primera identificació del perfil de microRNAs en obesitat materna i aportem noves dades sobre el possible paper d'aquests microRNAs com a reguladors del creixement pre i postnatal. Les intervencions sobre aquests microRNAs podrien modular l'efecte perjudicial de l'obesitat materna sobre la seva descendència.

Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños fragmentos de ARN monocatenario no codificantes que regulan la expresión génica a nivel posttranscripcional. Se expresan de forma específica en los tejidos y también se encuentran en la circulación sanguínea. La placenta humana muestra un perfil específico de microRNAs que está disregulado en alteraciones del embarazo como la preeclampsia y el retraso de crecimiento intrauterino. Los microRNAs circulantes han sido descritos como valiosos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas para enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes y el riesgo cardiovascular. Es bien conocido que la obesidad antes y durante el embarazo tiene efectos adversos sobre la salud de la madre y también en el desarrollo del feto. Los hijos de madres con obesidad tienen más peso al nacer y mayor riesgo de sufrir obesidad y enfermedades asociadas en la edad adulta. Se desconoce si la obesidad materna afecta al perfil de microRNAs y si estos microRNAs pueden tener un papel importante en la regulación del crecimiento pre y postnatal.

En este trabajo se ha determinado el perfil de microRNAs circulantes y placentarios en embarazadas con obesidad pregestacional y gestacional, y se han estudiado las asociaciones de estos microRNAs con parámetros endocrino-metabólicos durante el embarazo y con parámetros de crecimiento pre y post-natal.

La población de estudio consistió en 70 mujeres caucásicas cuyo embarazo cursó sin complicaciones (excepto obesidad pregestacional o gestacional) controladas en el Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta. Las mujeres fueron agrupadas según su índice de masa corporal pregestacional y el aumento de peso durante el embarazo en control (n=25), obesidad pre-gestacional (OBPre, n=20) y obesidad gestacional (OBGest, n=25). El perfil de microRNAs se estudió en muestras de plasma de segundo trimestre de gestación y muestras de placenta recogidas en el nacimiento, mediante Arrays TaqMan de baja densidad (TLDA) en un subgrupo de 18 gestantes (6 controles, 6 OBPre y 6 OBGest). Los resultados se validaron en toda la cohorte mediante qPCR y se correlacionaron con el fenotipo materno durante la gestación (composición corporal y marcadores metabólicos) y el fenotipo del recién nacido (peso y longitud al

nacer y a los 1, 4, 6 y 12 meses de vida). Finalmente, se realizaron estudios *in silico*, con bases de datos informáticas, para determinar los mRNA diana y las posibles rutas metabólicas reguladas por los microRNAs de interés.

En plasma, los resultados muestran 13 microRNAs disregulados en obesidad materna. La mayoría de éstos se asocian con parámetros metabólicos durante el embarazo. Además, los miR-340, miR-423-5p y miR-652 se asocian negativamente con el crecimiento prenatal y los miR-29c, miR-128a y miR-221 se asocian negativamente con el crecimiento postnatal.

En placenta, los resultados muestran 8 microRNAs disregulados en obesidad materna, de los cuales los miR-100-3p, miR-296-5p, miR-487-3p y miR-1285-3p se asocian con parámetros metabólicos durante el embarazo y muestran asociaciones negativas con el crecimiento pre-natal y post-natal. Entre los microRNAs placentarios, el miR-296-5p se encuentra presente en plasma de segundo trimestre de gestación, y se asocia con su expresión en placenta y con parámetros de crecimiento pre y postnatal.

Estudios *in silico* muestran que todos estos microRNAs de interés en plasma y placenta están relacionados con rutas de señalización de la insulina y/o proliferación celular.

Con este trabajo proporcionamos la primera identificación del perfil de microRNAs en obesidad materna y aportamos nuevos datos sobre el posible papel de estos microRNAs como reguladores del crecimiento pre y post-natal. Las intervenciones sobre estos microRNAs podrían modular el efecto perjudicial de la obesidad materna sobre su descendencia.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding fragments of single-stranded RNA that regulate gene expression at the post-transcriptional level. microRNAs exhibit tissue specific expression and are also abundant in the blood. The human placenta shows a specific microRNA profile that is dysregulated in several pregnancy disorders such as pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. Circulating microRNAs have been described as valuable biomarkers and potential therapeutic targets for metabolic diseases such as obesity, diabetes and cardiovascular risk. It is well known that obesity before and during pregnancy has adverse effects on the health of the mother and also on the development of the fetus. Newborns of obese mothers have higher birth weight and greater risk of obesity and associated diseases in adulthood. It is unknown if maternal obesity affects the microRNA profile and whether these microRNAs may play an important role in the regulation of pre and postnatal growth.

In this work, we have identified the microRNA profile in plasma at the second trimester and in placentas from women with pre-gestational and gestational obesity, and examined the associations of these microRNAs with endocrine-metabolic parameters during pregnancy and with pre and postnatal growth parameters.

The study population consisted of 70 Caucasian women with uncomplicated pregnancies (except for pre-gestational or gestational obesity) who gave birth at Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta. Women were grouped according to their pregestational body mass index and weight gain during pregnancy into control (n = 25), pre-gestational obesity (OBPre, n = 20) and gestational obesity (OBGest, n = 25) categories. The microRNAs profile was studied in plasma at the second trimester of gestation and in placenta samples at birth using low density TaqMan Arrays (TLDA) in a subgroup of 18 pregnant women (6 Controls, 6 OBPre and 6 OBGest). The results were validated in the complete cohort by qPCR and correlated with the maternal phenotype during gestation (body composition and metabolic markers) and the newborns' phenotype (weight and height at birth and at 1, 4, 6 and 12 months of life). Finally, *in silico* studies, using computer databases, were performed to determine the

target mRNAs and possible metabolic pathways regulated by the microRNAs of interest.

Plasma samples show 13 dysregulated microRNAs in maternal obesity. Most of these are associated with metabolic parameters during pregnancy. In addition, miR-340, miR-423-5p and miR-652 are negatively associated with prenatal growth parameters and miR-29c, miR-128a and miR-221 are negatively associated with postnatal growth parameters. The results in placenta show 8 dysregulated microRNAs in maternal obesity, of which miR-100-3p, miR-296-5p, miR-487-3p and miR-1285-3p are associated with metabolic parameters during pregnancy and show negative associations with pre-natal and post-natal growth.

Among placental microRNAs, miR-296-5p is also present in second trimester gestational plasma and is associated with its own placental expression and pre and postnatal growth parameters.

In silico studies show that all these microRNAs of interest in plasma and placenta are related to insulin signaling and/or cell proliferation pathways.

We provide the first identification of the microRNA profile in maternal obesity and generate new data about the possible role of these microRNAs as regulators of pre and postnatal growth. Interventions on these microRNAs could modulate the negative effect of maternal obesity on their offspring.

ÍNDEX

Certificats de direcció de tesi	i
Agraïments	v
Sigles, abreviatures i acrònims	vii
Índex de Figures.....	ix
Índex de Taules	xiii
Resum	xv
Resumen.....	xvii
Abstract	xix
Índex	xxi

Introducció	1
1.- Obesitat.....	2
1.1. La síndrome metabòlica	3
1.2. Resistència a la insulina	4
2.- Obesitat pregestacional	6
2.1. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre la mare	7
2.2. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre el part i el puerperi	8
2.3. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre el nadó.....	9
2.4. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre el descendent a llarg termini ...	10
3.- Augment de pes excessiu durant la gestació.....	12
3.1. Efectes del guany de pes excessiu sobre mare	13
3.2. Efectes del guany de pes excessiu sobre el nadó	14
3.3. Efectes del guany de pes excessiu sobre el descendent a llarg termini.....	15
4.- Adaptacions metabòliques maternes durant la gestació	16
4.1. Sensibilitat a la insulina	16
4.2. Adiponectina	17
4.3. Metabolisme de la glucosa	18
4.4. Metabolisme lipídic.....	19
4.5. Diabetis Gestacional	21
4.5.1. Efectes de la diabetis gestacional.....	22
5.- La placenta	24
5.1. Desenvolupament placentari	24
5.2. Parts de la placenta	25
5.3. Funcions de la placenta.....	27
5.3.1. Transport placentari i creixement fetal.....	28
6.- Programació fetal	30
6.1. Epigenètica	31

7.- Els microRNAs	34
7.1. Característiques dels microRNAs	34
7.1.1 Biosíntesi dels microRNA	34
7.1.2. Localització.....	36
7.1.3. Funcions	37
7.1.4. Regulació	41
7.1.5. Nomenclatura i bioinformàtica.....	41
7.2. microRNA circulants	42
7.3. microRNA i placenta	44
7.3.1. Localització.....	44
7.3.2. Funcions	46
7.3.3. Regulació	48
7.4. Presència de microRNAs placentaris expressats en plasma.....	49
7.5. microRNAs i patologies.....	50
7.5.1. Obesitat i diabetis.....	50
7.5.1.1. microRNAs i població obesa	50
7.5.1.2. microRNAs i gestants obeses	51
7.5.2. Implicacions clíniques dels microRNAs en patologia obstètrica.....	52
7.7. microRNAs com a dianes terapèutiques	56
Hipòtesis	59
Objectius	63
Material i Mètodes	67
1.- Disseny i subjectes d'estudi	69
2.- Variables d'estudi	70
2.1. Variables prenatales	70
2.1.1. Variables clíniques.....	71
2.1.2. Variables analítiques	71
2.2. Variables del part i postpart.....	72
2.2.1. Variables del part	72
2.2.2. Variables del nadó	73
3.- Expressió gènica.....	73
3.1. Extracció d'ARN	73
3.1.1. Extracció d'ARN de plasma	73
3.1.2. Extracció d'ARN en placenta	74
3.2. Quantificació	76
3.3. Retrotranscripció d'ARN.....	76
3.4. Preamplificació de cDNA circulat, provinent de plasma	77

3.5. Perfil de microRNA: TLDA.....	77
3.6. Anàlisi individual de microRNAs: RT-PCR.....	79
3.7. Predicció de dianes de microRNA	84
4.- Anàlisi estadístic	84
5.- Aspectes ètics.....	85
Resultats	87
1.- Característiques de la població d'estudi	89
2.- MicroRNAs circulants en obesitat pregestacional i gestacional.....	91
2.1. Identificació del perfil dels microRNAs en plasma.....	91
2.2. Validació de microRNAs plasmàtics diferencials en l'obesitat materna	91
2.3. Associació de microRNAs plasmàtics amb paràmetres metabòlics materns	96
2.4. Associació dels microRNAs plasmàtics amb paràmetres de creixement pre i postnatal.....	102
2.5. Anàlisi <i>in silico</i> de vies metabòliques relacionades amb els microRNAs plasmàtics associats al creixement pre i postnatal.....	105
3.- MicroRNAs placentaris en obesitat pregestacional i gestacional	106
3.1. Identificació del perfil dels microRNAs en placenta	106
3.2. Validació de microRNAs placentaris diferencials en l'obesitat materna	106
3.3. Associació de microRNAs placentaris amb paràmetres metabòlics materns	110
3.4. Associació dels microRNAs placentaris amb paràmetres de creixement pre i postnatal.....	113
3.5. Anàlisi <i>in silico</i> de vies metabòliques associades amb els microRNAs placentaris associats al creixement pre i postnatal	118
4.- Presència dels microRNAs placentaris en plasma matern.....	119
4.1. Presència en plasma dels microRNAs placentaris específics de cada grup d'estudi.....	119
4.2. Presència en plasma dels microRNAs placentaris amb perfil diferencial en obesitat materna	121
Discussió	125
1.- Grups d'estudi.....	127
2.- microRNAs en plasma	127
2.1. Perfil de microRNAs plasmàtics en obesitat.....	127
2.2. Associació amb paràmetres metabòlics materns	129
2.3. Associació amb creixement pre i postnatal.....	130
2.4. Associació a vies funcionals.....	132
3.- microRNAs en placenta	134
3.1. Perfil de microRNA placentaris en obesitat	134

3.2. Associació amb paràmetres metabòlics materns relacionats amb l'obesitat	134
3.3. Associació amb creixement pre i postnatal.....	135
3.4. Associació a vies funcionals.....	136
3.5. Localització cromosòmica	137
4.- Presència de microRNAs específics de placenta en el plasma matern	138
5.- Discussió general.....	141
6.- Limitacions.....	144
Conclusions	145
Bibliografia	149

INTRODUCCIÓ

L'augment de malalties metabòliques en nens és un problema de salut pública important. L'obesitat infantil, la diabetis i les malalties cardiovasculars estan augmentant a taxes alarmants. Mentre que això és parcialment degut al consum d'aliments calòrics i comportaments sedentaris, l'evidència científica suggereix que la capacitat de respondre a canvis metabòlics durant la vida postnatal pot estar vinculat a l'ambient prenatal. Estudis epidemiològics revelen que un subministrament inadequat de nutrients al fetus durant l'embaràs, com passa amb l'obesitat materna, s'associa al desenvolupament de malalties metabòliques de la descendència com l'obesitat i la diabetis tipus 2. Les marques epigenètiques, com els microRNAs, podrien ser un dels mecanismes que regulen aquesta associació. Treballs recents han demostrat que els microRNAs juguen un paper crucial en molts processos biològics relacionats amb el desenvolupament. El significat funcional dels microRNAs i les seves interaccions dinàmiques i complexes que regulen l'expressió gènica estan començant a ser explorades.

1.- Obesitat

Segons la *World Health Organization (WHO)* l'obesitat es defineix com l'acumulació anormal o excessiva de greix que pot posar en perill la salut de l'individu. La valoració quantitativa del greix corporal s'efectua per mitjà de dues estratègies diferents: l'estimació, mitjançant la valoració de paràmetres antropomètrics (IMC o perímetre abdominal); i mesures directes, mitjançant tècniques específiques com la densitometria o la impedància bioelèctrica. De tots aquests mètodes, l'índex de massa corporal (IMC) és el més usat i es calcula dividint el pes (kilograms) entre l'alçada al quadrat (metres): kg/m^2 .

En adults, es considera normal un IMC entre 18.5 i 24.9 Kg/m^2 , el sobrepès es defineix com un $\text{IMC} \geq 25$ i la obesitat com un $\text{IMC} \geq 30$.

En nens és més difícil establir punts de tall degut a les característiques de creixement i desenvolupament pròpies d'aquest període, i els valors es comparen amb els valors de referència segons l'edat i el sexe i s'expressen segons la desviació estàndard de l'IMC (IMC-SDS).

Durant l'embaràs, l'IMC presenta una bona correlació amb el percentatge de teixit adipós durant el primer trimestre, igual que amb les dones no embarassades. No obstant això, aquesta correlació no és tan bona a mesura que avança la gestació degut a l'increment de volum plasmàtic i líquid amniòtic entre d'altres. De totes maneres, l'IMC s'ha acceptat com a mesura d'obesitat al llarg de tota la gestació amb propòsits clínics (1).

S'estima que l'any 2014, més de 1900 milions d'adults arreu del món tenien sobrepès i més de 600 milions eren obesos. Això implica que un 39% de la població de més de 18 anys presentava sobrepès i un 13% obesitat. Entre els menors de 5 anys, 41 milions presentaven sobrepès o obesitat. Davant d'aquestes dades, la WHO parla de la primera epidèmia no infecciosa de la història de la humanitat.

L'obesitat en la infància és un factor de risc d'obesitat en l'edat adulta. Els estudis mostren que un nen obès té un 80% de probabilitat de seguir-ho sent als 35 anys; a més, els adolescents amb excés de pes o obesitat, encara que s'aprimin, tenen un risc augmentat de mortalitat per causa cardiovascular en l'edat adulta en comparació amb un adolescent amb pes adequat.

L'obesitat és una malaltia complexa i multifactorial. Entre les causes que la provoquen s'inclouen la genètica; els factors ambientals i socioeconòmics, amb un desequilibri entre la ingesta de calories i la despesa energètica; i els efectes des de l'etapa de programació fetal intraúter. És una malaltia crònica que s'associa a un augment de la mortalitat i la morbiditat a causa de patologies associades com la síndrome metabòlica, la hipertensió, la resistència a la insulina, la hiperlipèmia, la patologia vascular arterioscleròtica, i alguns càncers com el d'endometri, de mama, d'ovari, de pròstata o de còlon (2).

1.1. La síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica és un conjunt d'anomalies que actuen com a factors de risc de tenir una patologia cardiovascular o diabetis mellitus. Es caracteritza per una obesitat central i la consegüent resistència a la insulina. És el resultat de la interacció de factors genètics, fisiològics i influències ambientals com ara el tabaquisme, la dieta

hipercalòrica o l'absència d'exercici físic. L'obesitat abdominal, amb el conseqüent augment de greix a nivell visceral, sobretot a nivell de múscul, fetge i pàncrees, implica la formació d'adipoquines que afavoreixen estats proinflamatoris i protrombòtics, el desenvolupament de resistència a la insulina i l'hiperinsulinisme.

El diagnòstic de la síndrome metabòlica es dona per la combinació de 3 dels 5 criteris definits segons el National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III) i la Federació Internacional de Diabetis (FID), que inclouen tolerància a la glucosa, obesitat, hipertensió i dislipèmia (triglicèrids i colesterol) (3, 4) (figura 1).

Segons aquests criteris, la prevalença a Espanya de la síndrome metabòlica s'estima d'un 31% en la població adulta i d'un 5% en la població adolescent (aquesta augmenta al 12% en nens amb sobrepès i al 29% en nens obesos). Els criteris diagnòstics no estan ben establerts en nens amb edat inferior als 10 anys (5).

Paràmetre	Criteri
Perímetre abdominal	>88 cm en dones* >102 cm en homes*
HDL-C	<40 mg/dL en homes, <50 mg/dL en dones
Triglicèrids	≥150 mg/dL (1.69 mmol/L)
Tensió arterial	≥130/85 mmHg*
Glucosa en dejú	≥110 mg/dL (6.1 mmol/L)

Figura 1. Criteris pel diagnòstic de la síndrome metabòlica segons la National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III). *Superior a P90 segons edat i sexe fins als 16 anys

1.2. Resistència a la insulina

La insulina, produïda per les cèl·lules β dels illots de Langerhans del pàncrees, és l'hormona que regula el metabolisme de carbohidrats, lípids i proteïnes. És, sobretot, l'encarregada de mantenir els nivells òptims de glucosa en sang. Així, quan els nivells de glucosa en sang s'eleva, el pàncrees allibera insulina, que és l'encarregada d'estimular la glicogènesi i d'inhibir la glicòlisi i la glicogenòlisi a nivell hepàtic; d'augmentar la lipogènesi i d'inhibir la degradació lipídica a nivell de teixit adipós; i

d'activar la captació i utilització de la glucosa a nivell muscular (figura 2). A més, estimula la síntesis lipídica i la síntesis de proteïnes.



Figura 2. Funcions de la insulina sobre el teixit adipós, el fetge i el múscul esquelètic.

La resistència a la insulina és l'estat patològic en què l'organisme no respon a les accions de la insulina. En aquest estat, el cos ha de secretar més hormona per obtenir els mateixos efectes, sobretot la captació de glucosa pels teixits metabòlics: fetge, múscul i teixit adipós. Es tracta d'un estat d'hiperglucèmia, amb la conseqüent sobreproducció d'insulina pancreàtica que es tradueix en una hiperinsulinèmia (6).

La resistència a la insulina es calcula amb l'índex HOMA-IR (*homeostatic model assesment*) (7): $(\text{glucosa (mg/dl)} \times \text{insulina (mUI/l)} \times 0,0551) / 22,5$.

2.- Obesitat pregestacional

A Espanya, segons dades del *Instituto Nacional de Estadística*, s'estima que un 10.75% de les dones en edat fèrtil (18 a 44 anys) presenta obesitat i un 29%, sobrepès. Les dones que presenten sobrepès o obesitat presenten una taxa de fertilitat reduïda, tan en concepció natural com si parlem de tractaments de reproducció assistida. La subfertilitat en aquestes dones s'atribueix en gran part a la oligo o anovulació que presenten, associada o no a una síndrome d'ovari poliquístic, és a dir, dins d'un context d'alteració metabòlica que inclou un estat de hiperinsulinèmia i hiperandrogenisme i, fins a un 40% de casos, a més, d'obesitat visceral (8). Igualment en les dones normoovuladores la taxa de fertilitat està reduïda tot i que l'augment d'aneuploidies podria explicar l'augment d'avortaments en gestacions incipients, possiblement la relació entre l'obesitat i la qualitat oocitària o la receptivitat endometrial n'explicaria gran part (9).

La prevalença d'obesitat en dones embarassades s'estima entre un 1.8% i un 25.3%. L'augment de resistència a la insulina i citoquines inflamatòries són condicions que es mantindran i s'agreugeran en cas de gestació en una dona obesa. Es tracta de gestacions d'alt risc amb conseqüències fetals entre les que destaca el risc de macrosomia i el risc d'obesitat a llarg termini, i conseqüències maternes com l'anomenada "*síndrome metabòlica de l'embaràs*" que inclou intolerància a la glucosa, alteracions hipertensives, hiperlipidèmia i alteració de marcadors inflamatoris circulants. Aquestes són condicions relacionades amb la gestació i normalment es resolen després del part. De totes maneres, aquestes gestants presenten un desordre metabòlic subclínic i presenten un major risc de síndrome metabòlica al llarg de la vida, particularment si hi ha un increment de pes excessiu que segueix en el postpart (10) (*figura 3*).

Són molts els estudis que han relacionat l'obesitat pregestacional amb l'augment de patologies obstètriques i les conseqüències sobre la descendència (8, 11-13).

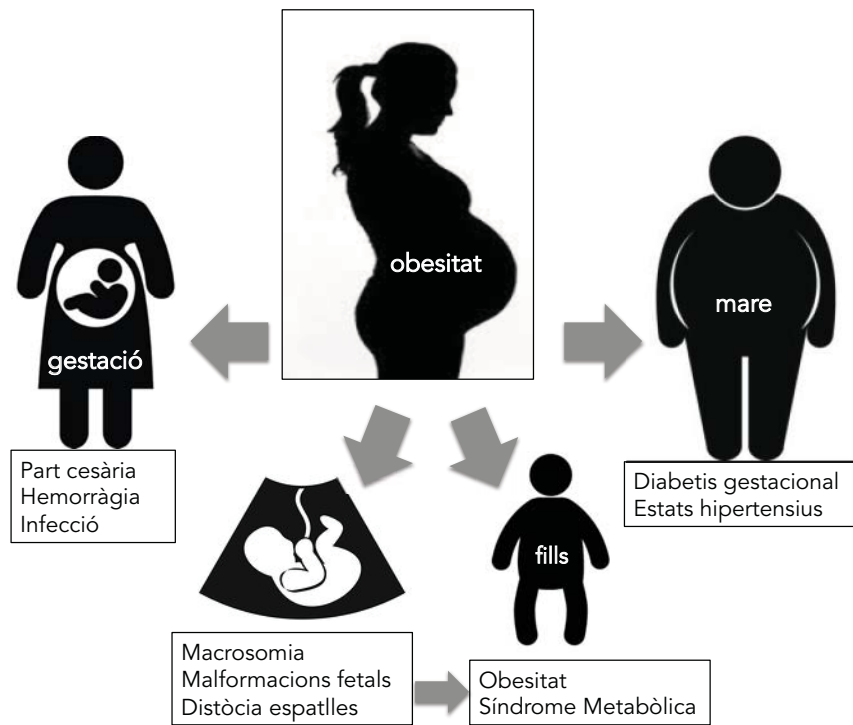


Figura 3. Conseqüències de l'obesitat pregestacional durant l'embaràs. L'obesitat materna abans de l'embaràs té implicacions sobre el curs de l'embaràs; sobre la mare: diabetis gestacional, estats hipertensius; sobre el part: part per cesària, hemorràgia, infecció; i sobre el descendent: macrosomia, malformacions fetals i obesitat i síndrome metabòlica a llarg termini.

2.1. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre la mare

L'obesitat augmenta el risc de patologies maternes com:

-avortament: el risc d'avortament espontani està augmentat en dones obeses (16.6%) i lleument en dones amb sobrepès (11.8%) respecte a dones amb pes normal (10%). Aquesta taxa d'avortament també es veu augmentada en cas de tractament de reproducció assistida en dones obeses (14). En gestacions incipients en les que ha estat possible realitzar un cariotip, no s'ha pogut demostrar l'augment d'aneuploidies com a causa de l'augment d'avortaments espontanis (15).

-diabetis gestacional: les gestants obeses presenten un risc augmentat de diabetis gestacional que va relacionat amb l'increment de resistència a la insulina produït per l'estat obesogènic. El risc s'incrementa segons el pes de la mare, així el risc en les obeses és del 6-12% mentre que en gestants amb pes normal és del 2-4%. L'odds ratio ajustat és de 2.6 per gestants obeses i de 4 en obeses mòrbides (16). La diabetis

gestacional es resol't després del part, però és per si sola un factor de risc de desenvolupar diabetis mellitus tipus 2 (DM2) a llarg termini. De les gestants obeses amb diabetis gestacional fins a un 70% presentaran DM2 als 15 anys del part (17).

-estats hipertensius de l'embaràs: són una de les complicacions gestacionals amb més repercussions maternes com alteracions neurològiques, hepàtiques i renals, amb seqüeles greus i inclús mortalitat; i també complicacions fetals com retard del creixement i mortalitat. La hipertensió induïda per la gestació es defineix com la tensió arterial sistòlica (TAS) i diastòlica (TAD) per sobre 140 i 90 mmHg en repetides preses que es presenta durant la gestació en dones prèviament normotenses. La preeclàmpsia, que es dona a partir de les 20 setmanes d'embaràs, es diagnostica per TA elevades associada a proteïnúria (16). La causa, tot i que encara desconeguda, és d'origen placentari i per tant, com hem dit, afecta tant a la mare com al fetus. El mecanisme pel qual està augmentada en l'obesitat podria estar relacionada amb la hiperlipidèmia, l'augment de la resistència a la insulina i l'augment de la inflamació subclínica que implica aquest estat. El risc d'hipertensió gestacional en pacients obeses està augmentat 2.5 vegades, i el risc de preeclàmpsia fins a 1.6. Aquest risc està augmentat 3.2 i 3.3 vegades, respectivament, si ens centrem només en les dones amb obesitat mòrbida (18).

-part preterme: s'estima que el risc d'un part preterme en dones amb obesitat pregestacional és d'1.5. De totes maneres, el risc de part preterme no és del tot real, sinó que és degut a parts induïts per la obesitat en si o per les malalties associades com la diabetis gestacional o la preeclàmpsia (19).

-part postterme: es desconeix el motiu; també es postula com un error de càlcul doncs les dones amb obesitat tendeixen a ser oligoovuladores i per tant la data de l'última regla podria ser un mètode inexacte per al càlcul de l'edat gestacional (20).

2.2. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre el part i el puerperi

L'obesitat pregestacional també presenta un impacte sobre el resultat del part i el puerperi. Per començar cal destacar la dificultat de monitorització tan fetal com de contractilitat uterina materna degut a l'excés de teixit adipós. Igualment, es veu

augmentada la dificultat anestèsica, tant a nivell regional com, sobretot, en cas de necessitat d'intubació d'una pacient obesa, i a més, gestant.

-cesària: l'obesitat és un factor important per a la realització d'una cesària, inclús si s'ajusta per l'associació amb diabetis gestacional o hipertensió; el risc de cesària és de 1.5 en gestants obeses i de 3.1 en obeses mòrbides. També està augmentada la taxa d'inducció fallida entre altres per la desproporció pèlvicofetal per l'augment de nadons macrosomes. A major IMC hi ha més risc d'una dilatació i progressió del part més lentes; així mateix com més IMC més risc de fracàs de la inducció (risc de 2.89). La probabilitat d'un part vaginal després d'una primera cesària també es troba disminuïda (8, 21, 22).

-infecció: la obesitat augmenta el risc d'infecció de ferida de cesària, episiotomia i/o endometritis. També està augmentat el risc d'infecció d'orina.

-hemorràgia i pèrdua sang: existeix un risc augmentat de pèrdua de més d'1 litre de sang per augment d'atonia postpart per macrosomia o per menor biodisponibilitat dels oxitòtics en relació a l'IMC de la pacient; també pot estar relacionat amb cesàries més dificultoses i llargues.

-trombosis venosa: la gestació és per si mateixa un estat protrombòtic. Així, unida a l'obesitat, el risc de trombosi està augmentat sobretot després de cesària per l'estat de repòs que implica. El risc és de 1.4 en dones amb sobrepès i de 5.3 en dones obeses (21).

2.3. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre el nadó

L'obesitat pregestacional també presenta un impacte sobre el nadó:

-òbits i morts perinatals: l'obesitat materna doble el risc d'òbit fetal, la causa és desconeguda, però es postula una disfunció fetoplacentària. També està augmentat el risc de mort sobtada del neonat (23).

-malformacions fetals: està demostrat el risc augmentat de defectes del tub neural, paret abdominal i cardíacs. També són de més difícil detecció degut a la resistència que ofereix el teixit adipós al pas d'ultrasons (24).

-macrosomia: l'obesitat per si sola explica la macrosomia i és independent de la diabetis (25). La macrosomia es defineix com un nadó amb pes superior a l'esperat per l'edat gestacional (en general la definició implica un pes superior al percentil 90 segons edat gestacional i sexe, però en alguns estudis directament es defineix com a pes superior a 4 kg). El risc de parir un nadó de més de 4 kg és 1.7 vegades més gran en dones obeses i 2 vegades més gran en obeses mòrbides; el risc d'un nadó de més de 4.5 kg és 2 i 2.4 vegades més gran respectivament (16). L'obesitat materna s'associa concretament amb l'augment d'adipositat fetal no amb la massa muscular magra (26).

-distòcia d'espatlles i lesions del plexe braquial: són lesions en el moment del part relacionades amb la macrosomia fetal, el número de parts, el pes i la talla materna.

-petit per edat gestacional: el sobrepès i l'obesitat presenten un risc disminuït de gestar un nadó amb baix pes al néixer, en canvi, presenten un risc augmentat de parir un nadó amb molt baix pes (<1500g) al néixer, amb un risc relatiu de fins a 1.98; com més obesa és la gestant més risc presenta de tenir un infant amb pes extremadament baix al néixer (menys de 1000g) (19).

2.4. Efectes de l'obesitat pregestacional sobre el descendent a llarg termini

I finalment, l'obesitat de la mare també presenta efectes a llarg termini sobre el descendent en l'edat infantil i adulta (11):

-obesitat infantil: els fills de mares obeses tenen el doble de risc de tenir obesitat als 2 anys de vida, independentment del pes al néixer (27).

-obesitat en l'adolescència i l'edat adulta: les filles de gestacions amb augment de pes excessiu tenen fins a 3 vegades més risc de presentar sobrepès o obesitat; aquesta

associació és més intensa en mares amb sobrepès pregestacional, independentment del pes al néixer (28).

-diabetis mellitus 2 i síndrome metabòlica: s'observa una relació positiva entre l'IMC matern pregestacional amb la circumferència de la cintura, la TA sistòlica i diastòlica, així com amb els valors d'insulina i de triglicèrids dels descendents als 30 anys de vida; i una relació negativa amb HDL-C. Totes elles característiques independents del guany de pes matern i característiques al naixement (29).

-pubertat precoç: que es defineix com a l'aparició del caràcters sexuals secundaris abans dels 8 anys en nenes i abans dels 9 anys en nens (30).

3.- Augment de pes excessiu durant la gestació

El guany de pes durant l'embaràs té un efecte immediat i a llarg termini per a la dona i per al seu nadó.

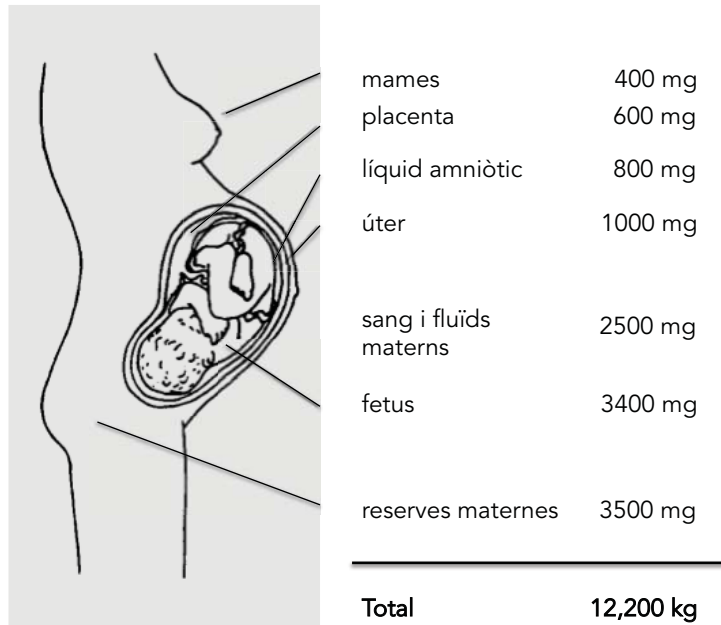


Figura 4. Distribució de l'augment de pes normal durant la gestació. S'estima que el guany de pes adequat associat a la gestació és d'entre 11 i 16kg, dels quals el fetus, el líquid amniòtic i la placenta en representen uns 4.5kg i l'augment de l'úter i de les mames uns 1400g més. La resta correspon a l'augment, a la redistribució hemodinàmica i a les reserves maternes.

La recomanació de guany de pes durant l'embaràs, publicat l'any 2009 per l'*Institute of Medicine (IOM)*, es basa en l'IMC pregestacional i és independent de l'edat, la raça, la paritat i l'historial d'hàbits tòxics (tabac) (31). Es tracta d'unes recomanacions per assegurar un bon estat de salut tant per a la mare com per al fetus i assolir un pes fetal adequat al néixer, evitar parts preterme i evitar la retenció de pes matern en el postpart (figura 4 i 5).

Més d'un 40% de les gestants presenten un augment de pes superior al recomanat per la IOM, i aquest augment excessiu té unes conseqüències sobre el curs de la gestació així com sobre la mare i sobre el fill (32) (figura 6).

Categoria pregestacional	IMC	Recomanació de guany de pes (Kg)
Infrapès	<18,5	12,5-18
Pes normal	18,5-24,9	11,5-16
Sobrepès	25-29,9	7-11,5
Obesitat	>30	5-9

Figura 5. Guany de pes gestacional recomanat per la IOM. Recomanacions de guany de pes durant la gestació segons IMC inicial. Recomanacions del Institute of Medicine de l'any 2009 (31). IMC: índex de massa corporal.

3.1. Efectes del guany de pes excessiu sobre mare

-diabetis gestacional: el guany de pes durant l'embaràs és un factor independent i significatiu de desenvolupar diabetis gestacional. L'augment de pes sobretot a l'inici de la gestació està directament relacionat amb la concentració de glucosa entre les 24 i 28 setmanes, que comporta un metabolisme anormal de la glucosa. Els estudis suggereixen que hi ha una relació positiva entre l'excés de guany de pes i l'adipositat abdominal, que presenta una relació directa amb el risc augmentat de patologia cardiovascular i alteracions metabòliques com la DM2 (17). La diabetis gestacional, associada tant a la obesitat pregestacional com a l'augment excessiu de pes durant la gestació, presenta un augment de risc de desenvolupar alteracions del metabolisme de la glucosa així com de diabetis a llarg termini.

-estats hipertensius de l'embaràs: l'augment de pes excessiu està relacional amb un augment d'hipertensió gestacional així com de preeclàmpsia, amb una *odds ratio* de 1.51 i 2.14 respectivament, comparat amb les gestants que presenten un augment de pes normal, independentment de l'IMC pregestacional (17).

-depressió i ansietat: les pacients amb augment de pes excessiu durant la gestació presenten una pitjor percepció i satisfacció de la seva imatge corporal, sobretot les que parteixen d'un IMC menor. Hi influeixen molts altres factors, com el nivell cultural i l'estatus socioeconòmic (33).

-retenció de pes i posterior obesitat: l'excés de guany de pes durant la gestació és el factor predictor més important pel que fa a retenció de pes en el postpart, sense

relació amb el pes pregestacional (13). Aquesta relació amb la retenció de pes és en el postpart immediat, als 2 anys i també als 8 anys postpart. Per tant, la incidència de sobrepès i obesitat a l'inici d'una següent gestació és més gran, augmentant així la morbilitat explicada prèviament (34).

-altres complicacions maternes com: apnea obstructiva del son, exacerbació de l'asma, complicacions músculoesquelètiques i complicacions relacionades amb l'anestèsia.

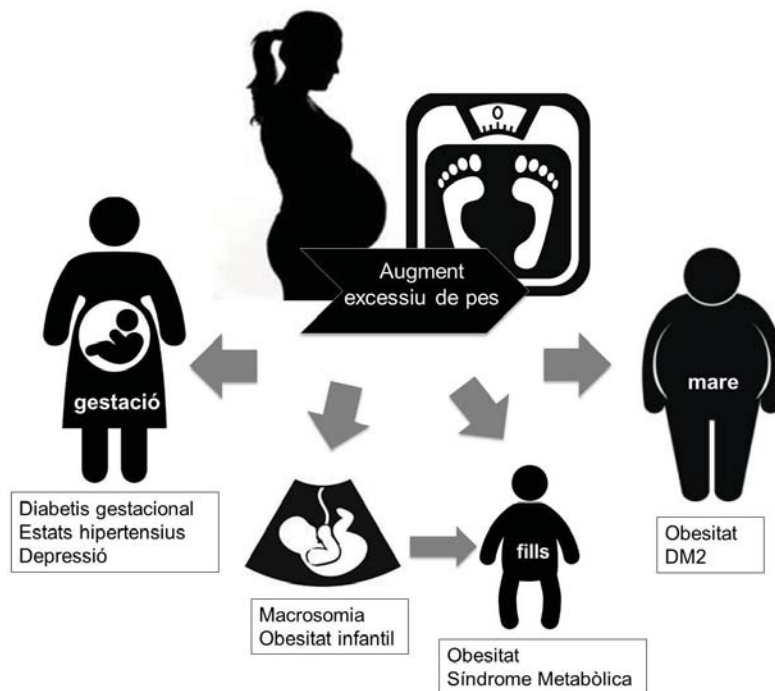


Figura 6. Conseqüències de l'augment excessiu de pes durant la gestació. L'augment excessiu de pes té implicacions sobre el curs de l'embaràs; sobre la mare: diabetis gestacional, estats hipertensius, depressió; i obesitat i DM2 a llarg termini; sobre el descendent: macrosomia, i obesitat i síndrome metabòlica a llarg termini.

3.2. Efectes del guany de pes excessiu sobre el nadó

-macrosomia: diferents estudis objectiven l'associació d'aquesta amb l'excés de guany de pes durant la gestació (34). Aquesta relació és veu encara més reforçada entre l'associació obesitat/sobrepès i excés ponderal de pes durant la gestació (26). Com ja s'ha comentat anteriorment, la macrosomia s'associa a efectes adversos fetals i

materns com risc de lesió traumàtica en el part, risc de cesària per desproporció pèlvicofetal i risc de mortalitat perinatal.

-l'associació amb el risc de cesària és menor que amb la obesitat pregestacional.

-petit per edat gestacional: tant l'excés de guany de pes com el dèficit de guany de pes durant la gestació estan associats a un menor pes al néixer. De totes formes, l'augment de pes superior al recomanat seria un factor protector del risc de nadó petit per edat gestacional (12).

3.3. Efectes del guany de pes excessiu sobre el descendent a llarg termini

-obesitat infantil: l'augment excessiu de pes, sobretot durant el primer trimestre, presenta un risc augmentat d'obesitat infantil fins als 4 anys de vida (35).

-obesitat edat adulta: el guany de pes durant la gestació, associat a l'IMC pregestacional, s'associa positivament amb l'adipositat en el descendent adult: augment de l'IMC, augment de la circumferència abdominal i de triglicèrids.

-alteracions cardiometabòliques: associat o no a l'obesitat (29).

Són pocs els estudis que relacionen els efectes de l'excés de guany de pes amb el trimestre en el que es produeix. Així, Li i col. (2013) estudia els efectes tant fetals com materns en funció del trimestre, conclouent que els efectes són més importants quan aquest afecta al primer trimestre de gestació (36).

4.- Adaptacions metabòliques maternes durant la gestació

L'estat de nutrició i benestar matern juntament amb el desenvolupament placentari són agents limitants del potencial genètic del creixement fetal. A través de la placenta difonen el nutrients de la mare al fetus, i en direcció oposada els productes del metabolisme fetal. La glucosa és el substrat més important pel fetus, que ha d'estar fàcilment disponible per a la transferència transplacentària. Els aminoàcids també creuen, en molt menor mesura, la placenta, i pel que fa als lípids, només els àcids grassos lliures i els cossos cetònics hi són permeables. La secreció d'hormones placentàries amb efectes anabòlics sobre el metabolisme matern és important per compensar el cost energètic que l'embaràs i el creixement fetal representen (37-40).

Per garantir la nutrició fetal al llarg de tot l'embaràs, la gestació es divideix en dos períodes metabòlics i energètics diferents:

-els primers dos terços, quan el creixement del fetus encara és limitat, la mare emmagatzema gran proporció dels nutrients que ingereix, i acumula reserves grasses, ajudada per la hiperfàgia que experimenta. Parlem de l'etapa d'anabolisme.

-l'últim terç, quan el creixement fetal és més ràpid, la mare passa a un metabolisme catabòlic per posar tots els nutrients a disposició del fetus.

4.1. Sensibilitat a la insulina

La insulina, encarregada de mantenir els nivells òptims de glucosa en sang, és a més, considerada clau en la regulació del creixement fetal, regulació que realitza a través dels seus efectes promotors de l'anabolisme tissular. Durant l'etapa embrionària, també estimula la síntesis d'ADN (6).

Els canvis en la sensibilitat a la insulina durant l'embaràs no estan del tot definits, però sembla que les hormones placentàries podrien tenir una gran contribució, doncs després del deslliurament la sensibilitat a la insulina millora significativament. Entre elles destaquen la somatotropina coriònica o lactogen placentari (HPL) i la leptina (41).

La HPL produeix un augment de la resistència a la insulina, disminueix la captació de glucosa pels teixits, i per tant, augmenta els nivells sèrics de glucosa, fent així més disponible la glucosa al fetus. També indueix la lipòlisis, per tal d'obtenir àcids grassos que serviran de combustible per a la mare. Les cetones, producte de la lipòlisis, també travessen la barrera placentària i poden ser utilitzades pel fetus.

La leptina és produïda pels adipòcits materns i per la placenta, l'augment de concentració de leptina durant la gestació, sobretot a partir del segon trimestre, sembla ser a causa de l'augment de la secreció placentària. Fora de la gestació, la leptina actua com a senyal saciant, informa al cervell sobre la mida dels adipòcits. Per tant, els nivells de leptina són més elevats en les persones obeses. Durant la gestació se li han adjudicat funcions en el manteniment de la gestació, angiogènesis placentària i efectes sobre la insulina. L'augment de leptina és relaciona amb un augment de la resistència a la insulina, per tal de mobilitzar reserves materns sobretot al final de la gestació (42).

4.2. Adiponectina

L'adiponectina és una hormona sintetitzada pel teixit adipós, però no per la placenta, que té efectes sensibilitzants a la insulina (43). Al contrari que altres adipoquines, la seva concentració plasmàtica és inversament proporcional a l'adipositat i positivament a la sensibilitat a la insulina. Per tant, la seva disminució en cas d'obesitat podria ser el desencadenant de la resistència a la insulina. Aquests efectes es veuen també durant la gestació, sobretot durant el tercer trimestre, quan l'adiponectina arriba als seus nivells mínims i la resistència a la insulina és major. Aquests efectes encara són més evidents en el cas de gestants obeses o amb diabetis gestacional, i es poden objectivar ja al primer trimestre. Així, una adiponectèmia baixa al primer trimestre té una relació amb el diagnòstic de diabetis gestacional al segon trimestre (*figura 7*). L'adiponectina materna no travessa la placenta, per tant no contribueix a l'adiponectèmia fetal.

L'adiponectina no circula mai en forma de monòmer; així, es defineixen tres tipus d'adiponectina segons les seves formes multimèriques: les de baix pes molecular, de mitjà pes molecular i d'alt pes molecular. La d'alt pes molecular (APM) és considerada la forma biològicament activa.

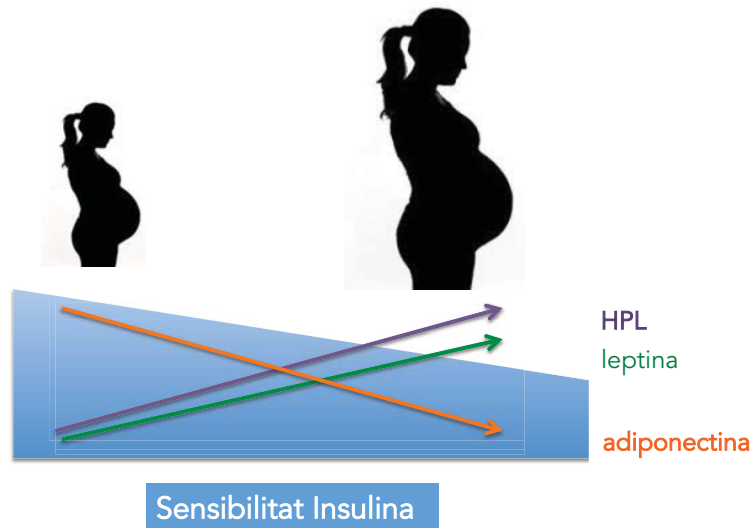


Figura 7. Sensibilitat a la insulina durant la gestació. La sensibilitat a la insulina disminueix entre un 50-60% al llarg de la gestació. Els nivells de lactogen placentari (HPL) i de leptina, que augmenten augmenten la resistència a la insulina, s'incrementen al llarg de la gestació; en contra, els nivells d'adiponectina, sensibilitzant de la insulina, disminueixen.

4.3. Metabolisme de la glucosa

A l'inici de l'embaràs, l'augment de sensibilitat a la insulina facilita la captació de glucosa per part dels teixits i l'anabolisme cel·lular mitjançant la glicogènesi i la lipogènesi.

Independentment de l'IMC pregestacional, hi ha una disminució d'entre el 50 i 60% de la sensibilitat a la insulina a mesura que avança la gestació per tal de garantir la disponibilitat de nutrients pel fetus, sobretot carbohidrats (44). Així, al final de l'embaràs, l'augment de resistència a la insulina disminueix la captació i utilització de glucosa per part dels teixits perifèrics i permet mobilitzar els lípids emmagatzemats anteriorment (figura 7). L'augment de la resistència a la insulina es compensa amb un augment de secreció d'insulina pel pàncrees.

A mesura que avança l'embaràs, i especialment en etapes de dejuni, la gestant té tendència a la hipoglucèmia, que sol ser deguda a l'esgotament de les reserves hepàtiques de glucogen i a l'esgotament de substrats per a la producció de glucosa degut al gran pas d'aquests al fetus; a pesar que les capacitats enzimàtiques per a produir-ne milloren. La unitat fetoplacentària utilitza un 50% de la glucosa materna.

4.4. Metabolisme lipídic

El teixit adipós fa adaptacions durant l'embaràs, doncs és plàstic pel que fa a grandària i estructura. L'expansió depèn dels adipòcits, els factors angiogènics i la matriu extracel·lular. A més, presenta una funció endocrina regulant l'augment de concentració de leptina en sang materna i la disminució d'adiponectina (44).

El mecanisme molecular que dirigeix l'adipogènesi i la lipòlisi és desconegut. Podria estar regulat per proteïnes específiques dels adipòcits com són les adipoquines, que interefereixen amb l'acció de la insulina. El TNF α (*tumor necrosis factor α*), la IL-6 (*interleukin-6*), la resistina i la leptina regulen negativament l'efecte de la insulina, mentre que la leptina i l'adiponectina són insulinosensibilitzants.

Al final de la gestació, amb l'augment de la resistència a la insulina, que permet mobilitzar els lípids emmagatzemats, hi ha una gran depleció de dipòsits grassos. Ens trobem davant d'un estat hiperlipidèmic: augment del colesterol, triglicèrids (TG) totals i lipoproteïnes. Aquests productes lipolítics del teixit adipós, alliberats a la circulació, tenen com a major destí el fetge, on són modificats i transformats a TG i VLD-LP (lipoproteïnes de baixa densitat). Encara que els triglicèrids no travessin directament la placenta, la hipertriglicidèmia pot ser beneficiosa en condicions de dejú per la seva conversió hepàtica a cossos cetònics que sí poden ser utilitzats pel fetus. A més, els àcids grassos són útils com a font d'energia per la mare i per a la preparació de la lactància al final de les gestació.

En condicions de dejú, els àcids grassos lliures es poden oxidar a cossos cetònics, que creuen la placenta per difusió simple i arriben al plasma fetal en igual concentració que al plasma matern i els triglicèrids passen a glicerol per formar glucosa.

El fetus no és capaç de sintetitzar cossos cetònics, però a diferència dels adults, els cossos cetònics poden ser utilitzats com a substrat energètic i com a substrat lipogènic pel cervell fetal. Les grans quantitats de glicerol al plasma matern i l'eficient conversió a glucosa, també beneficien als fetus es casos de dejú (38) (figura 8).

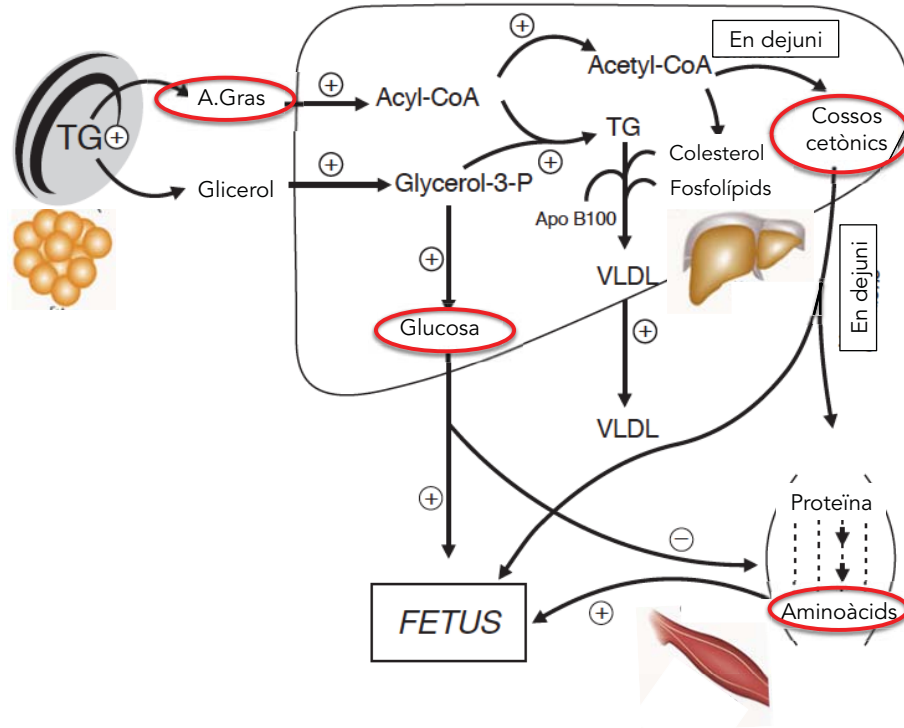


Figura 8. Representació dels efectes de la lipòlisi durant la gestació. Adaptació d'Herrera i col. En vermell els metabòlits que travessen i serveixen de font energètica al fetus (38).

L'obesitat és el factor de risc més comú que provoca disminució de sensibilitat a la insulina. En el cas de les dones obesas i amb sobrepès hi ha, des de l'inici de l'embaràs, un augment d'adipositat i per tant una disminució d'adiponectina, que explicaria l'augment de resistència a la insulina i el desenvolupament d'inflamació metabòlica. La disminució en percentatge de la sensibilitat a la insulina és pràcticament igual en dones amb pes normal que en dones obesas, això explicaria la tendència de les gestants obesas a presentar més diabetis i hipertensió gestacional, i nens amb macrosomia. La relació no és tan forta en el guany de pes excessiu o obesitat gestacional.

L'augment de triglicèrids i colesterol també és més pronunciat en dones obeses i diabètiques, l'augment d'àcids grassos lliures podria ser font energètica quan els requeriments són mes grans i explicar també l'excés de creixement fetal. En aquest sentit, l'increment de nutrients en sang materna en dones obeses i amb resistència a la insulina que travessaran la placenta i estimularan el pàncrees fetal, farà que es desenvolupi un hiperinsulinisme i augment de diversos factors de creixement fetal, responsables de la visceromegàlia.

4.5. Diabetis Gestacional

La diabetis gestacional es desenvolupa en aquelles dones en les que la funció pancreàtica és insuficient per sobreposar-se a l'estat de resistència a la insulina associada a l'estat gestacional. Es defineix com la tolerància anormal a la glucosa diagnosticada durant la gestació.

S'estima que al voltant d'un 17% de les gestacions presenten diabetis gestacional, valor que depèn de l'edat, raça, pes pregestacional de la mare i paritat (45).

El cribratge de la diabetis gestacional és universal, es realitza a totes les embarassades durant el segon trimestre de la gestació: entre les 24 i 28 setmanes, moment en què presenta una major rentabilitat diagnòstica. Es valora la necessitat de realitzar el cribratge al primer trimestre, o de repetir les proves de tolerància a la glucosa al tercer trimestre, segons els protocols establerts (46).

Hi ha diversos tests acceptats, el recomanat per la *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*, és un diagnòstic en dos passos:

Cribratge: Test d'O'Sullivan: la determinació de glicèmia en plasma venós una hora després de la ingesta de 50 grams de glucosa. La prova es pot realitzar en qualsevol moment del dia, independentment de la ingesta prèvia d'aliments. Es considera positiva quan la glicèmia és ≥ 140 mg/dl (7.8 mmol/l).

Diagnòstic: En cas de positivitat del test d'O'sullivan es realitza el test de sobrecàrrega oral de glucosa, el Test de tolerància oral a la glucosa (TTOG): la determinació en

plasma de glucosa al minut 0 i a les 1, 2 i 3 hores de la ingesta de 100 grams de glucosa. El resultat és positiu quan dos o més dels següents valors estan alterats: glicèmia basal > 105 mg/dL (5.8 mmol/L), una hora > 190 mg/dL (10.6 mmol/L), dues hores > 165 mg/dL (9.2 mmol/L) > tres hores: 145 mg/dL (8.1 mmol/L).

Les dones que desenvolupen diabetis gestacional tenen un guany de pes més elevat a les 24 setmanes. Per tant, el guany de pes és un factor de risc de desenvolupar diabetis gestacional, sobretot en dones obeses i amb sobrepès (47).

La diabetis gestacional té complicacions maternes i fetals a curt i llarg termini. Algunes d'aquestes es poden reduir si amb l'ajuda del tractament s'aconsegueix un òptim control glicèmic, com la preeclàmpsia o la macrosomia i la distòcia d'espatlles (48) (figura 9).

4.5.1. Efectes de la diabetis gestacional

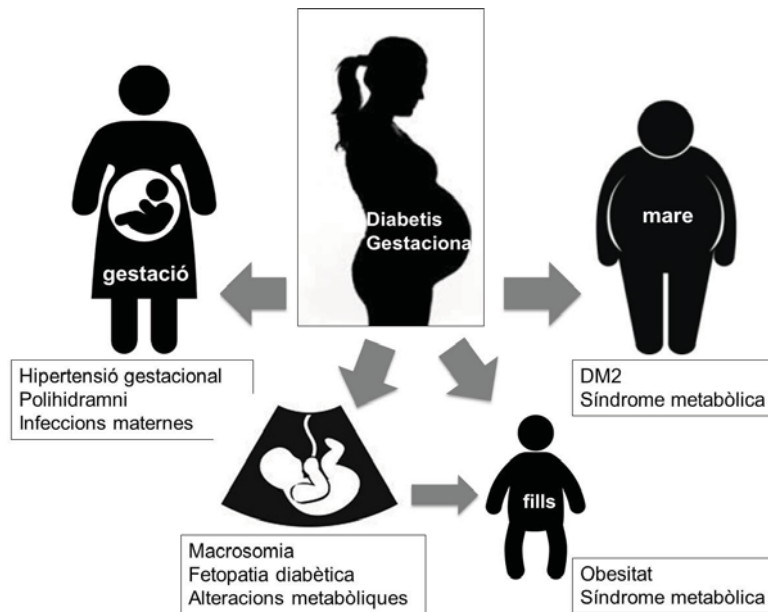


Figura 9. Conseqüències de la diabetis gestacional. La diabetis gestacional s'associa a complicacions durant l'embaràs: estats hipertensius, polihidramni i infeccions maternes; té conseqüències sobre el descendent: macrosomia, fetopatia diabètica i obesitat i síndrome metabòlica a llarg termini; i sobre la mare: DM2 postpart i síndrome metabòlica.

Les gestacions que cursen amb diabetis gestacional presenten un risc augmentat d'hipertensió i preeclàmpsia, amb un risc relatiu d'1.54 (49). A més a més, la

hiperglucèmia durant la organogènesis, dóna complicacions en etapes inicials de la gestació, és l'embriopatia diabètica, que pot comportar anomalies congènites importants així com avortaments. Més endavant, la fetopatia diabètica, pot provocar sobretot retard en la maduració dels òrgans, especialment pulmonar (50).

Independent de l'IMC pregestacional o el guany de pes gestacional, el risc relatiu de macrosomia és d'1.81. Es tracta de nadons grans per edat gestacional i amb una disposició truncular de la grassa subcutània a causa de l'excés de nutrients provinents de la mare diabètica mal controlada. Hi ha un increment de teixit adipós, no de teixit muscular, així com un creixement de teixits particularment sensibles a la insulina com són el fetge, múscul, cor i greix subcutani, anomenat visceromegàlia. La glicèmia durant el tercer trimestre així com l'IMC pregestacional són predictors independents del pes al néixer en gestacions que precisen insulina (51).

La hiperglucèmia fetal resulta en hiperinsulinèmia que estimula la síntesis i emmagatzematge de lípids a nivell hepàtic i de teixit adipós; efectes que podrien tenir conseqüències a llarg termini. El risc d'obesitat, diabetis mellitus i síndrome metabòlica a llarg termini és independent de la història familiar de diabetis o IMC durant la infància, fet que suggereix que l'ambient intrauterí contribueix al seu desenvolupament. Ho posa de manifest, entre molts altres *Boney i col.* (2005) que relacionen el risc de síndrome metabòlica infantil (11 anys) en nadons macrosomes fills de mares amb diabetis així com en fills de mares obeses (52). A més llarg termini, *Dabelea i col.* (2000) objectiven que més de dos terços de fills de mares amb diabetis gestacional desenvolupaven DM2 als 34 anys de vida (53). A més, presenten un IMC lleument superior (20.8 vs 20.2), un risc augmentat de presentar sobrepès (18.8% vs 8.4%) i una circumferència abdominal superior (73.3cm vs 71.5 cm) (54).

Pel que respecte a la mare, als 5 anys postpart, la incidència de diabetis mellitus després d'una gestació normal és del 1.1%, del 18.8% en pacients amb diabetis gestacional, i del 36% quan la diabetis gestacional s'associa a sobrepès (55). A més, i independentment del desenvolupament de diabetis mellitus 2, a llarg termini les dones poden presentar síndrome metabòlica, segurament degut als marcadors comuns entre les dues entitats, com els mediadors inflamatoris (56).

5.- La placenta

La placenta és l'òrgan que actua d'intermediari entre la mare i l'embrió/fetus durant la gestació, és l'òrgan encarregat de regular l'intercanvi de nutrients i gasos respiratoris, a més de presentar una funció endocrina i protectora.

La placenta humana, formada a partir de teixits materns i fetals, és de tipus hemocorial, és a dir, que el teixit fetal penetra l'endometri fins a entrar en contacte amb la sang materna. La implantació i desenvolupament seran essencials per a un bon funcionament, i juntament amb els canvis que es van succeint al llarg de la gestació, seran necessaris pel creixement fetal.

5.1. Desenvolupament placentari

El desenvolupament de la placenta s'inicia al voltant del dia 6 de gestació, amb la implantació del blastocist (*figura 10*). Aquest es diferencia en: el trofoblast, que donarà lloc a la placenta i membranes fetals; i l'embrioblast, que donarà lloc a l'embrió, cordó umbilical i mesènquima placentari.

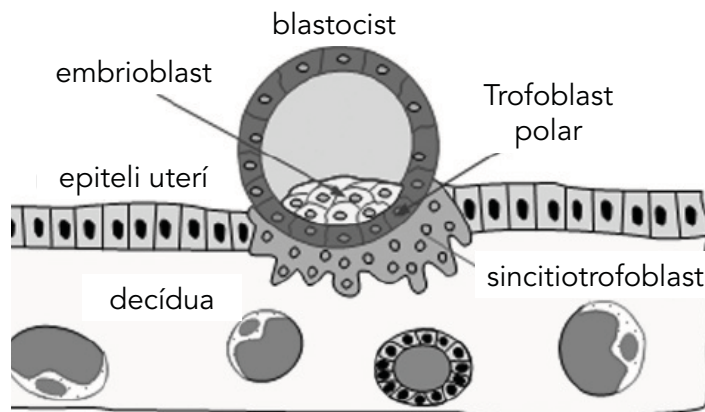


Figura 10. Implantació del blastocist a la decídua materna. El dia 6 de gestació, el blastocist, concretament el trofoblast polar entra en contacte amb la decídua materna i s'inicia el procés d'implantació. Imatge modificada de Huppertz i col. (57).

El sincitiotrofoblast (la capa externa) es l'encarregat d'enviar els senyals per transformar l'endometri en decídua i invadir-la; és al dia 12, quan tot l'embrió està rodejat d'endometri, que es considera que la implantació està completa.

El sincitiotrofoblast trenca l'epiteli endometrial i comença a introduir-se a l'estroma de la capa funcional de l'endometri, arrossegant amb ell el citotrofoblast i formant digitacions cap a l'interior de l'estroma, el que posteriorment seran els vil·lis placentaris o vellositats corials, i les llacunes trofoblàstiques, on s'iniciarà la circulació uteroplacentària. Per tant, és l'encarregat d'arribar a les artèries espirals maternes i responsable d'adaptar l'elasticitat d'aquestes al ràpid creixement fetal. Les artèries espirals, inicialment congestionades i dilatades, patiran una transformació de petites arterioles musculars a grans vasos de baixa resistència, que facilitaran el flux sanguini.

Tot aquest procés va acompanyat d'un complex procés de tolerància immunitària que evita el refús de la mare.

5.2. Parts de la placenta

A terme, la placenta té forma de disc, fa uns 20 centímetres de diàmetre, uns 3 centímetres de gruix i un pes aproximat de 500-600 grams.

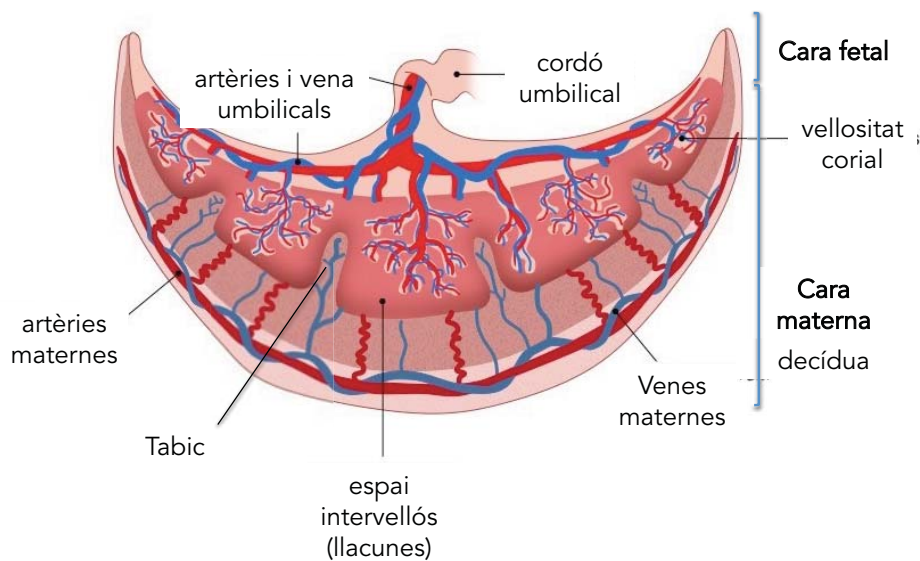


Figura 11. Esquema de la placenta. La cara fetal està coberta per les membranes corioamniòtiques i és d'on surt el cordó umbilical. La cara materna que entra en contacte amb la decídua, és on es valoren els cotiledons formats per les vellositats corials on es durà a terme l'intercanvi maternofetal.

La cara fetal, la superfície llisa de la placenta, està coberta per les membranes fetals o corioamniòtiques que són travessades pel cordó umbilical. El cordó umbilical, que a terme mesura uns 50cm i té un diàmetre de 2, està format per dues artèries que es bifurquen de forma centrífuga en artèries coriòniques fins arribar a les vellositats; i una vena única.

La cara materna, rugosa, està representada per la placa basal, que sorgeix de la separació de la placenta de la superfície materna, on està firmament adherida mitjançant les vellositats corials que infiltrin l'endometri sense arribar al miometri, en condicions normals. És una barreja de cèl·lules de la decidua materna i del trofoblast fetal, a més de matriu extracel·lular, teixit fibrinoide i coàguls de sang (figura 11).

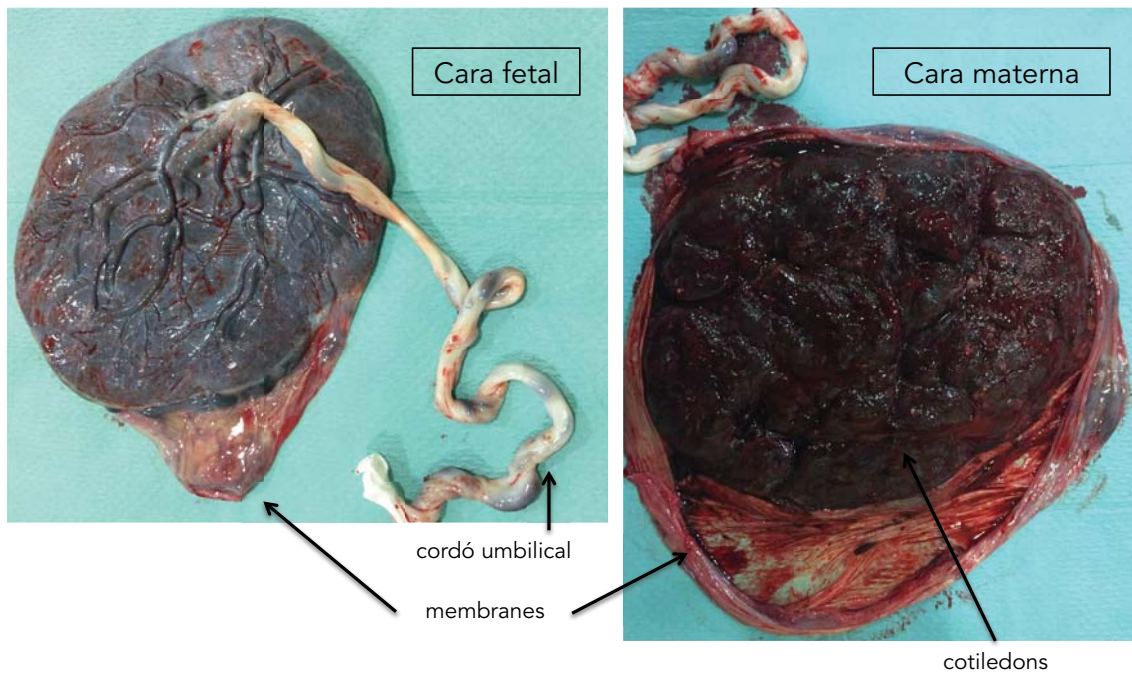


Figura 12. *Placenta humana.* A) cara fetal: llisa i brillant, formada per les membranes i on s'objectiven els vasos que conflueixen per a formar el cordó umbilical; B) cara materna: cotiledons íntegres.

La placa basal està dividida entre 10 i 40 regions, anomenats lòbuls o cotiledons, separats per tabics, cada un format per entre 1 i 4 troncs de vellositats principals, a través dels quals circula la sang de la mare al fetus. És important comprovar la integritat dels cotiledons després del deslliurament de la placenta, per tal de verificar el deslliurament complet (figura 12).

5.3. Funcions de la placenta

El sincitiotrofoblast és l'encarregat d'integrar els senyals materns i fetals per tal de regular la funció placentària. Aquesta es pot veure modificada pel flux arterial que arriba a l'úter i a la placenta, la hipòxia, la influència d'hormones maternes o la nutrició materna, així com per l'edat de la mare, el sexe del nadó, la gestació múltiple, l'hàbit tabàquic o l'aparició de patologies com la preeclàmpsia (57) (figura 13).

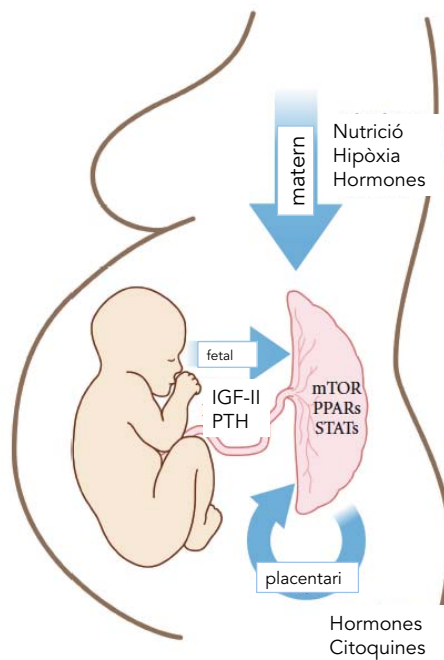


Figura 13. Regulació de la funció placentària. La funció de la placenta ve regulada a diferents nivells: matern: la nutrició, la hipòxia o les hormones; placentari: hormones i citoquines; fetal: hormones i factors de creixement. Adpatació de Lager i col. [60].

La funció placentària es pot estimar a partir del seu pes. Així doncs, una placenta de pes inferior a l'esperat podria indicar una falta d'aport de nutrients o d'oxigenació al fetus, i ser la responsable d'una restricció del creixement fetal.

El trofoblast dirigeix processos que són obligatoris per al desenvolupament fetal, incloent l'intercanvi de gasos, el subministrament de nutrients, l'eliminació de productes de rebuig, el suport hormonal i la defensa immunològica. El mecanisme molecular subjacent és complex i comprèn nombroses vies de regulació interconnectades. Hormones, factors de creixement i algunes citoquines maternes

com: insulina, *insulin-like growth factor I i II (IGF-I i II)*, IL-6 o TNF α regulen el transport transplacentari, responsable del creixement fetal.

A part de ser el filtre de nutrients, factors de creixement i hormones, la placenta presenta una funció endocrina i secreta hormones com l'estriol (encarregat d'augmentar l'úter i les mames, accions sobre el desenvolupament fetal), la progesterona (manteniment de la decídua i no contractibilitat de l'úter, preparació de les mames); la β -HCG (manteniment de la gestació), relaxina (relaxació la musculatura per permetre el part), el lactogen placentari (disminueix la sensibilitat de la insulina i estimula l'alliberació d'àcids grassos, per garantir les fonts d'energia al fetus), la leptina (important per al creixement fetal) i l'hormona de creixement placentària (58).

5.3.1. Transport placentari i creixement fetal

El creixement i desenvolupament fetal depèn del potencial genètic del fetus modulats per factors biològics i ambientals, incloent la salut i nutrició materna. Així, el seu creixement depèn de l'estat nutricional de la mare i de la capacitat de la placenta per al transport de nutrients. A més, es coneix que la capacitat de la placenta per al transport de nutrients està augmentada en mares obesas, i per tant també el risc de tenir nadons amb alt pes al néixer (59).

La producció fetal de glucosa és mínima, i per tant la disponibilitat fetal depèn de la seva concentració en la mare. Es tracta d'una difusió facilitada mitjançant transportadors proteics de glucosa (GLUTs: *glucose transport protein*). Aquests transportadors augmenten al llarg de la gestació. El pas d'aminoàcids és realitzat mitjançant transport actiu, el més conegut és el sistema A, i està regulat, entre altres, per la via de mTOR. Els triglicèrids que arriben a la placenta són hidrolitzats a àcids grassos no esterificats mitjançant lipasses. Aquesta activitat augmenta segons avança la gestació. El transport mitjançant difusió simple és insuficient i calen les proteïnes transportadores d'àcids grassos (*FATPs: fatty acid transport protein*).

L'obesitat pot regular l'expressió de transportadors i augmentar el transport d'aminoàcids i de glucosa cap al fetus, fet que s'associa amb l'activació de la vida de

la insulina/mTOR i amb el sobrecreixement fetal (58). L'IGF-I, la insulina i la leptina maternes promouen la captació i transport mitjançant el sistema A, mentre que l'adiponectina l'inhibeix (60).

Els nivells d'adiponectina es relacionen inversament amb el creixement fetal, el metabolisme i la funció placentària. L'adiponectina crea resistència a la insulina a les cèl·lules del trofoblast (al contrari que en altres teixits), limita el pas transplacentari de nutrients i el creixement fetal. Per contra, els nivells baixos d'adiponectina en les pacients obeses no limiten aquest efecte de forma efectiva. La infusió d'adiponectina en mares obeses, normalitza la sensibilitat a la insulina de la mare, la via de senyalització placentària insulin/mTOR i el transport de nutrients i creixement fetal (61) (figura 14).

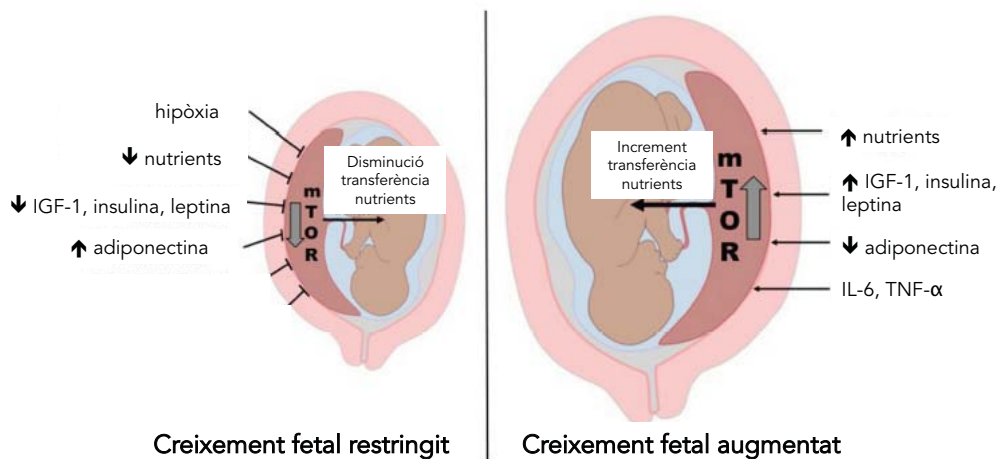


Figura 14. Regulació de la via mTOR a nivell placentari. Adaptació de Dimasuay i col. (58). L'augment de nutrients, això com de leptina o insulina i/o la disminució d'adiponectina, activen la via mTOR que incrementa el pas de nutrients cap al fetus estimulant el seu creixement.

Els lípids circulants en la mare, que serveixen com a substrat pels àcids grassos que seran transportats a través de la placenta, també tenen una funció com a molècules senyalitzadores que modulen el transport placentari d'aminoàcids a través de TLR4 (*toll-like receptor 4*). Aquest receptor també està elevat en mares obeses i es correlaciona amb els nivells de IL-6.

6.- Programació fetal

Ja als anys 90, *Hales* i *Barker* van formular la hipòtesi que un ambient desfavorable intrauterí i fins al primer any de vida causa alteracions en el creixement i desenvolupament fetal, i per tant un fenotip més susceptible a malalties cardiovasculars i diabetis, l'anomenada "*Thrifty phenotype hypothesis*" o hipòtesi del fenotip estalviador (62).

Moltes teories posteriors han recolzat aquesta teoria, però els primers estudis que van relacionar la infranutrició amb els efectes a llarg termini van ser els "*Dutch famine*" (Dutch Hunger Winter 1944-45), que mostraven que hi havia una creixement accelerat i a la llarga més obesitat entre els nens que havien estat exposats a una restricció de nutrients durant l'etapa fetal a causa de la guerra, i posteriorment, un cop acabada la guerra, rebien una alimentació millor.

A partir d'aquests estudis, molts altres han introduït el tòpic del "*Developmental origins of health and disease*", orígens del desenvolupament de la salut i la malaltia; la relació entre la manca de nutrició materna durant la gestació i el risc de desenvolupar malalties relacionades amb la síndrome metabòlica a la vida adulta. El fetus s'adapta a la vida intrauterina, creant canvis en els sistemes per ajudar a la supervivència immediata i fer front a l'ambient advers postnatal, són les anomenades "*predictive adaptive responses*", respostes adaptatives predictives. Així, la pobra nutrició fetal, per desnutrició materna o per causa placentària, produiria una adaptació en forma de canvis tant en la grandària com en el funcionament de diferents òrgans, així com de la via metabòlica glucosa-insulina. Aquests canvis servirien per protegir òrgans claus del fetus i protegirien també el nou-nat en un ambient de malnutrició com el que la mare li ha presentat en la vida intrauterina. El risc de desenvolupar diabetis, hipertensió o hiperfàgia, entre d'altres, es veu augmentat quan aquest fetus, ara ja nen o adult, es troba en un ambient més favorable pel qual ha estat preparat (63, 64).

Menys estudis s'han centrat en l'adaptació neonatal davant l'obesitat en la gestació. Actualment, i com hem vist en apartats anteriors, és la sobrenutrició més que la desnutrició la que ens afecta als països desenvolupats. L'ambient obesogènic *in útero*,

per obesitat materna o augment de pes excessiu, també pot produir canvis permanents en el desenvolupament del fetus i en el control de la gana, funcions neuroendocrines i metabolisme energètic, canvis que tindran conseqüències a llarg termini sobre l'adipositat, tolerància a la glucosa i síndrome metabòlica. També efectes en la composició del cos com el número i grandària de cèl·lules adiposes, les cèl·lules pancreàtiques o l'hipotàlem, que poden resultar en adipositat augmentada per a la resta de la vida.

Howie i col. (2009) estudien la sobrenutrició durant la gestació en model animal i mostren la importància de la nutrició en el període crític de desenvolupament com és el fetal i primers dies de vida; observen que l'obesitat, induïda per la sobrenutrició gestacional, augmenta la malaltia metabòlica a llarg termini, independentment de la nutrició postnatal i del sexe (65).

Aquest efecte encara és més clar en el cas de la diabetis gestacional. La glucosa passa a la placenta i arriba al fetus, cosa que no fa la insulina. El pàncrees en desenvolupament respon a l'augment de glucosa produint insulina que en l'etapa fetal actua com a hormona del creixement. Així s'ha demostrat com la obesitat en l'adolescència es correlaciona amb els nivells d'insulina en líquid amniòtic en fills de mares diabètiques (66).

6.1. Epigenètica

Al 2005, McMillen i Robinson, van introduir el concepte de plasticitat genètica, que hipotetitzava que l'expressió gènica no és rígida, sinó que factors ambientals la poden modificar i canviar-ne el fenotip, el que es coneix com a remodelació epigenètica (67).

El procés epigenètic uneix els factors genètics amb l'ambient. L'epigenètica dels primers mesos de vida podria ser una de les claus per entendre la programació fetal de malalties metabòliques i obesitat. L'ambient obesogènic dins l'úter pot provocar canvis epigenètics que modifiquen l'expressió gènica, estructura tissular i desenvolupament dels òrgans causants del risc cardiometabòlic en el descendent

adult. L'ambient maternofetal s'ha vist que també afecta altres funcions biològiques com l'estrès mitocondrial i l'escurçament de telòmers.

El desafiament principal és establir com l'ambient interacciona amb el fenotip programat per influir en el desenvolupament de les malalties metabòliques.

La modificació de l'expressió gènica sense modificar canvis en la seqüència d'ADN es pot donar per tres mecanismes (*figura 15*):

-metilació del DNA: metiltransferases que afegeixen grups metil a les regions CpG de la zona promotora. La unió de diferents proteïnes a la zona hipermetilada impedirà l'inici de la transcripció.

-modificació de les histones: acetilació, metilació, fosforilació i ubiquïnitació de les histones, que són les proteïnes sobre les que s'enrotlla el DNA formant la cromatina.

-microRNA: petits fragments d'ARN amb capacitat de regular l'expressió gènica a nivell post-transcripcional.

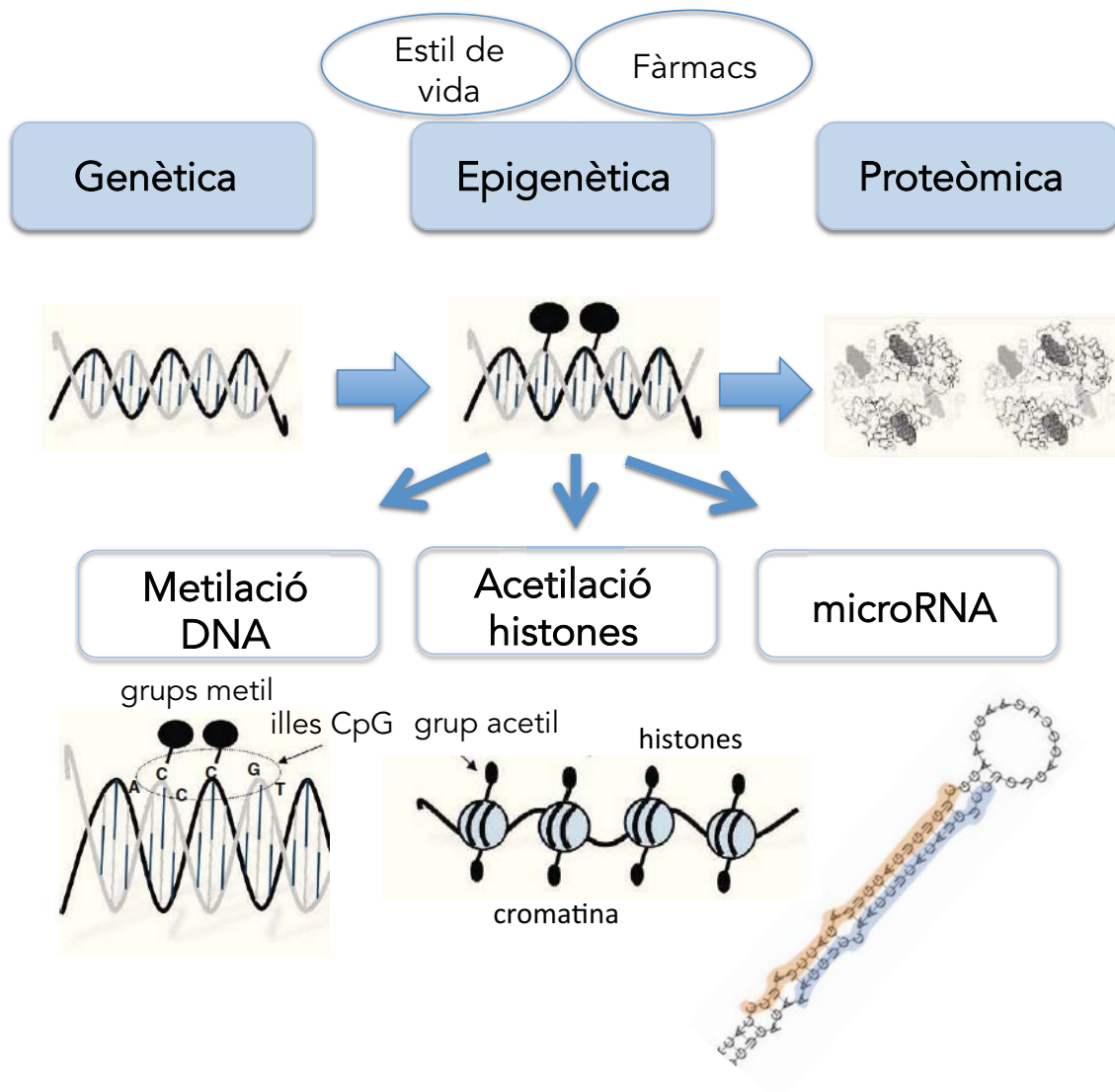


Figura 15. *Epigenètica.* La modificació de l'expressió genètica sense modificar canvis en la seqüència d'ADN es pot donar per tres mecanismes: metilació de DNA, acetilació de les histones o microRNAs.

7.- Els microRNAs

Els microRNA (o miRNA) són petits fragments d'ARN monocatenari, d'entre 20 i 25 nucleòtids, que no codifiquen a proteïna, i tenen la capacitat de regular l'expressió gènica a nivell posttranscripcional. Van ser descrits inicialment per *Lee i col.* (1993) a la dècada dels 90 (68); però no va ser fins al 2001 que es va adoptar el terme microRNA (69). Són seqüències ben conservades a totes les espècies i expressades, de manera específica, a cada teixit. Són crítics en el desenvolupament, proliferació i comunicació cel·lular així com en la diferenciació tissular. L'expressió aberrant dels microRNAs s'ha associat amb diverses patologies com neoplàsies, patologies vasculars o alteracions de la gestació. La *MiR database* ja inclou, en la seva darrera versió 35828 microRNAs madurs, en 223 espècies, dels quals més de 2500 es troben en humans.

7.1. Característiques dels microRNAs

7.1.1 Biosíntesi dels microRNA

Dins del nucli, el gen microRNA és transcrit a pri-miRNA mitjançant l'enzim RNA polimerasa II. La RNA polimerasa II s'uneix a la regió promotora de la seqüència específica de DNA i forma el pri-miRNA, format per uns 70 nucleòtids i que presenta una estructura en "*hairpin stem-loop*" o en bucle, amb una caputxa a l'extrem 5' i una cadena poli-A a l'extrem 3' (figura 15).

Aquest pri-miRNA és processat per l'enzim Drosha, una endonucleasa d'ARN, que està associat a la proteïna d'unió d'ARN de doble cadena DGCR8 (que proporciona especificitat i posiciona l'endonucleasa), i escindeix nucleòtids d'ambdós extrems del pri-miRNA per formar el precursor pre-miRNA, que presenta una estructura en "*stem-loop*".

El pre-miRNA és transportat al citoplasma mitjançant la proteïna Exportin 5. Allà és processat per l'enzim Dicer, una endonucleasa III d'ARN, que talla el bucle de l'estructura i produeix el miRNA madur de doble cadena, el miRNA dúplex (figura 16 i 17).

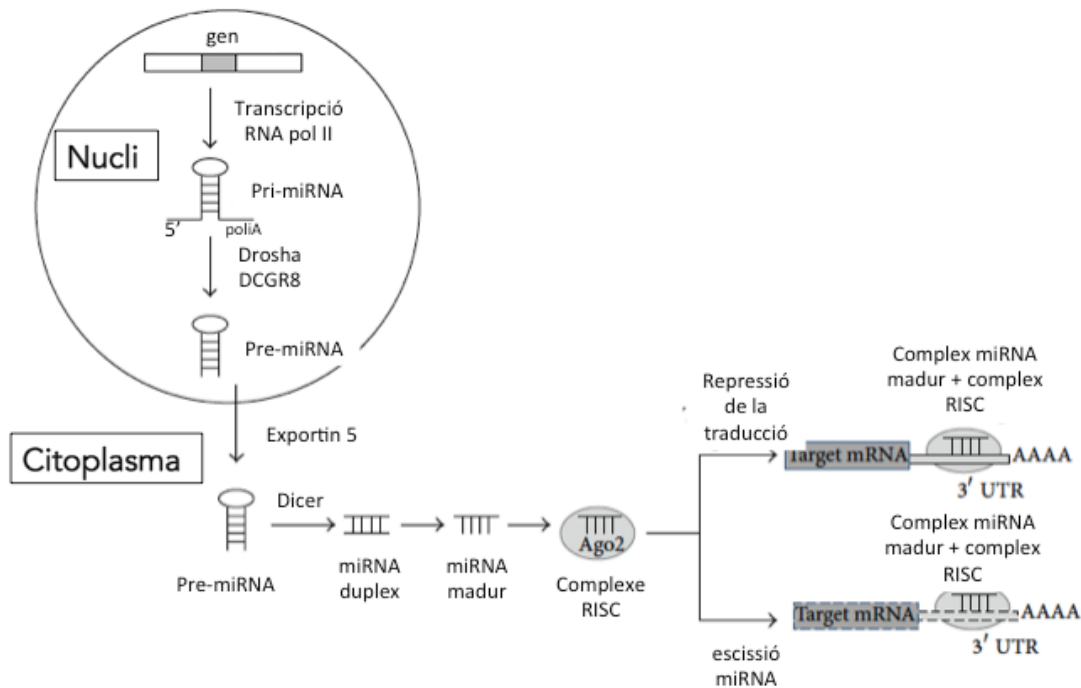


Figura 16. Síntesi de microRNA. Esquema adaptat de Tsochandaridis i col. (70). Dins del nucli cel·lular, el gen del miRNA és transcrit per la RNA polimerasa II que forma un transcric en "hairpin stem-loop", el pri-miRNA. Aquest és processat per l'enzim Drosha per formar el pre-miRNA, que és transportat al citoplasma amb l'ajuda de Exportin 5, on l'enzim Dicer escindeix el bucle per formar un dúplex que conté el miRNA. Aleshores el miRNA madur és incorporat al complex RISC per unir-se a la regió 3' del mRNA diana i reprimir l'expressió o tallar-lo.

Aquestes cadenes se separen i una d'elles donarà lloc al microRNA madur, d'uns 20-25 nucleòtids que s'incorpora al complex ribonucleoproteic conegut com a RISC (*RNA induced silencing complex*), formada entre altres per la proteïna Agronaute: Ago2. L'altra cadena de microRNA, que en un inici s'havia descartat com a funcional i es creia que era degradada pel mateix complex RISC, actualment es creu que també podria ser funcional, i per tant un mateix "hairpin" podria donar lloc a dos microRNAs madurs (70-72).

El complex RISC evita l'expressió del mRNA diana segons la unió d'aquest a la zona 3'UTR del mRNA diana. És Ago2 l'encarregada de degradar el mRNA diana.



Figura 17. Processament de pri-miRNA a miRNA. Pri-miRNA és processat a pre-miRNA mitjançant Drosha i a miRNA mitjançant Dicer (72)

Els *P-bodies* o cossos citoplasmàtics són regions específiques del citoplasma on s'acumulen els factors involucrats en el procés de creació i inhibició de la síntesi proteica com la proteïna Agronauta, els microRNAs i els mRNAs inactivats. Dins dels *P-bodies* no hi ha activitat, doncs no s'hi ha detectat factors iniciadors de la traducció ni ribosomes, però en cas de reactivació de la síntesi proteica els mRNA poden deixar el *P-body* i estar de nou disponibles per a la síntesi proteica (72).

7.1.2. Localització

Més de la meitat dels microRNA coneguts estan localitzats en clústers, inicialment transcrits com a una única molècula, que posteriorment es fragmenta en múltiples microRNA.

Els gens que codifiquen pels microRNAs estan localitzats principalment dins dels introns, fins a un 80%, però també en regions intergèniques o exons (73). La codificació d'introns podria explicar l'especificitat tissular dels microRNA (figura 18).

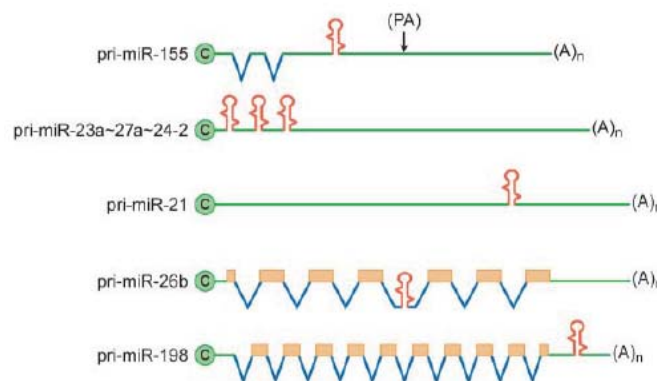


Figura 18. Localització del gens codificants per microRNA. Els gens que codifiquen pels miRNAs estan localitzats principalment dins dels introns, fet que explicaria l'especificitat tissular. miRNAs en vermell; seqüències no codificant en verd; introns en blau; exons en taronja. Cullen i col. (73)

7.1.3. Funcions

Hi ha dues vies per les quals els microRNAs poden regular negativament l'expressió gènica. Quan les seqüències es complementen perfectament, el complex RISC s'uneix al microRNA que és degradat per Ago2. Quan les seqüències no es complementen a la perfecció, la majoria de casos, el complex RISC inhibeix la traducció del mRNA sense degradar-lo. Les dues vies porten al mateix objectiu, la disminució dels nivells de proteïna del gen diana.

L'especificitat i funció venen determinats pels nucleòtids 2 a 7 de la zona 5' del miRNA madur, l'anomenada "seed region". Aquests són obligatòriament complementaris del mRNA diana. La complementarietat imperfecta de la resta de nucleòtids fa que un sol miRNA pugui regular un gran nombre de gens. Així, cada microRNA pot regular molts mRNAs i cada mRNA pot ser regulat per diferents microRNAs.

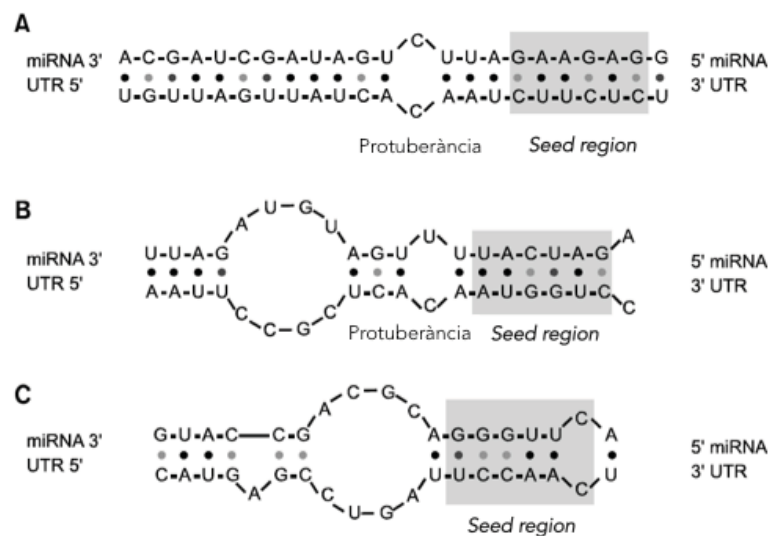


Figura 19. Complementarietat microRNA-mRNA. Complementarietat perfecta de la seed region i tipus de complementarietat de les seqüències esteses. A: canònica: una complementarietat quasi perfecta; B: pobra complementarietat a la zona 3'suplementària i C: zones compensatòries a 3' per a compensar una diferència en la seed region. Adaptació de Min i col.

Un cop realitzada la seva funció inhibidora, el microRNA queda intacte, i per tant pot seguir realitzant la seva funció.

Els microRNAs en mamífers s'estima que poden regular l'expressió gènica i síntesi proteica de fins al 60% dels gens que codifiquen per proteïnes. Participen en pràcticament totes les vies i tenen importants funcions cel·lulars en múltiples processos fisiològics com formació, diferenciació, proliferació i mort cel·lular.

Abans d'entrar en la inhibició, cal analitzar el procés de traducció proteica, que presenta dos mecanismes (figura 20):

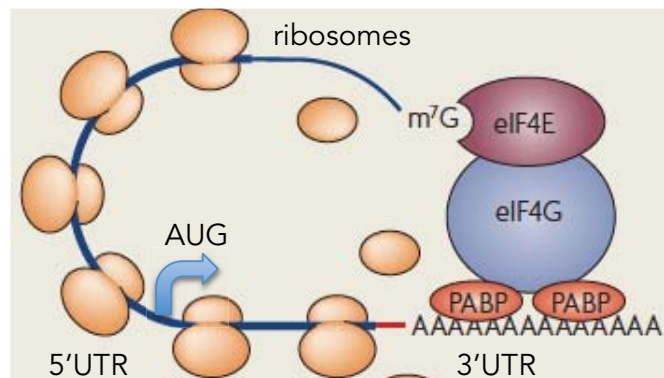


Figura 20. Esquema de traducció proteica. Adaptació de Stefani i col. (74). eIF4E i eIF4G: eukaryotic initiation factor 4E i 4G, cua poliA i PABP: poliA-binding protein, el m⁷G cap: extrem 7-metilguanósina.

La traducció dependent de Cap: el eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) reconeix l'extrem 5' on hi ha el m⁷G cap (7-metilguanósina) i s'inicia la preparació de la traducció. eIF4G s'uneix a la cua poliA (poliA-binding protein (PABP)), que tanca el bucle on s'unirà el ribosoma. El ribosoma, que s'unirà a cua 5' UTR del mRNA, es mou al llarg de la cadena en direcció 3', la traducció s'iniciarà al codó d'inici, normalment AUG (que codifica per metionina) fins al codó de finalització.

En la traducció independent de Cap: el ribosoma s'uneix directament al lloc d'inici de la traducció evitant la zona que no es tradueix de l'extrem 5'. Es tracta de la zona interna d'entrada del ribosoma, Internal Ribosome Entry Site (IRES), una seqüència de nucleòtids dins d'una seqüència d'ARNm situat a prop del codó d'inici

Els diversos mecanismes d'actuació dels microRNA són la inhibició de la iniciació de la traducció, la inhibició post-iniciació i la degradació del mRNA (74):

L'inici de la traducció pot ser inhibida mitjançant la competència per la mateixa zona d'unió, el m⁷G, del factor eIF4E i de la Ago2. Així, Ago2 evitaria el reconeixement del factor iniciador de la traducció i per tant aquesta no es portaria a terme (figura 21) (75).

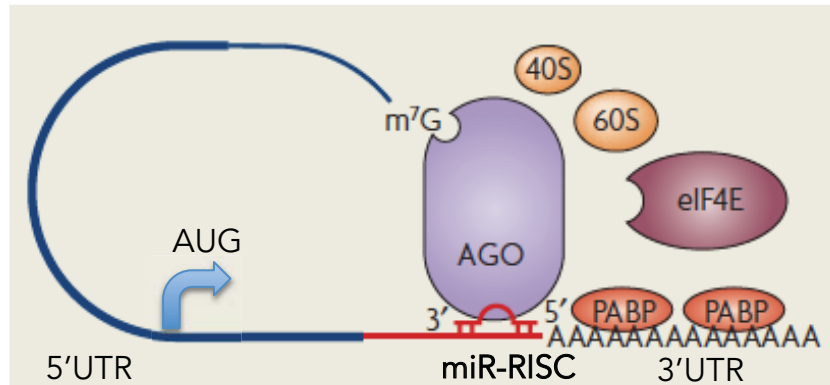


Figura 21. Esquema inhibició dels microRNAs de la iniciació de la traducció. Adaptació de Steffani i col. (74). eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E. AGO: proteïna Argonate2.

La inhibició postiniciació de la traducció es pot produir per dues vies: per proteòlisi immediata de la proteïna recent formada o per disgregació dels ribosomes. En aquest cas, la separació de les subunitats dóna lloc a la terminació prematura de la traducció. El microRNA bloqueja l'eIF6 que antagonitza la unió de les dues subunitats del ribosoma i evita el muntatge productiu del ribosoma 80s (76) (figura 22).

Un tercer mecanisme és la degradació del mRNA. En aquest cas, el mRNA és segregat dels *P-bodies*, i Ago2 amb l'ajuda de la proteïna GW182 (que es troba en els *P-bodies*), interactuen amb la cua poliA per a iniciar la degradació de la cadena (77) (figura 23).

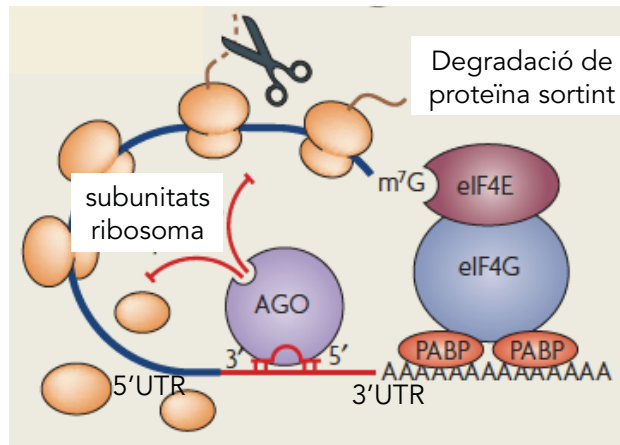


Figura 22. Inhibició dels microRNAs a nivell postiniciació. Degradació de la proteïna sortint i destrucció del ribosoma. Adaptació de Steffani i col. (74). eIF4E i eIF4G: eukaryotic initiation factor 4E i 4G. AGO: proteïna Argonate2.

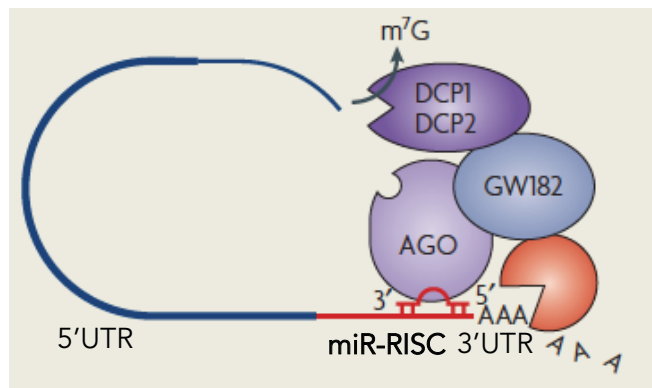


Figura 23. Inhibició dels microRNAs a nivell de degradació del mRNA. Adaptació de Steffani i col. (74). DCP decapping protein.

El microRNA s'uneix a la zona 3'UTR de l'ARN diana. S'ha descrit també la unió del complex RISC a la zona 5'UTR, en aquest cas la funció no és de repressió sinó d'activació de la traducció. Aquest efecte s'ha descrit per exemple en el miR-122 que actua a la via replicació en la càrrega viral del virus de l'hepatitis C. La silenciació de miR-122 es tradueix en una pèrdua de replicació del virus. Així doncs, la unió a 5' millora la traducció, incrementant la càrrega viral. També s'ha descrit la milloria de formació dels ribosomes (78).

7.1.4. Regulació

La biogènesi dels microRNAs pot ser regulada a qualsevol dels passos a través de les proteïnes que assegurin el bon funcionament dels microRNAs (79).

Com que cada microRNA pot tenir múltiples mRNAs dianes i per tant intervenir en múltiples vies, petites desviacions en el nivell normal d'un sol microRNA pot afectar la regulació de molts gens diana i alterar la funció cel·lular basal. L'esgotament de Drosha o de DGCR8, o mutacions en DGCR8, ambdós necessaris per a la maduració del pri-miRNA, serien un exemple de disminució en la creació de miRNA. Igualment, mutacions en la transcripció de Exportin 5, que evitarien el transport del pre-miRNA al citoplasma i el seu accés a Dicer, reduirien els nivells de microRNA madurs, incloent aquells que presenten funció supressora de tumors.

Finalment, Argonauta també regula l'estabilitat dels microRNAs. A més, sembla que l'associació miRNA-Agronaute-mRNA protegeix el microRNA de la degradació exonucleòtica.

7.1.5. Nomenclatura i bioinformàtica

Inicialment les dianes de miRNA es buscaven mitjançant experiments genètics clàssics. Posteriorment el desenvolupament de tècniques computacionals n'ha facilitat la recerca. Per contra, això fa que cada vegada sigui més difícil distingir entre veritables microRNAs i altres fragments de transcripcions o ARN curts. A més, existeixen diferents algorismes per a establir la complementarietat i en conseqüència diferents bases de dades que poden diferir àmpliament.

Per tant, és important d'establir bases de dades globals i especificar l'evidència en cada cas. Amb aquestes bases de dades, accessibles per internet de forma lliure, es pot doncs, fer recerca de seqüències de microRNA, potencials dianes, gens i inclús vies metabòliques associades (80, 81).

Com que els microRNAs són seqüències curtes, i amb complementarietat imperfecta amb la seva diana, és difícil predir les dianes amb una alta especificitat. El que es

busca és la “seed región”, que ha de tenir una complementarietat perfecta amb la zona 3'UTR del mRNA diana.

A part de la complementarietat, alguns algoritmes tenen en compte l'estabilitat termodinàmica de la unió miRNA-mRNA, que facilitaria la unió del complex RISC; seqüències esteses de les “seed regions” i/o la presència demostrada de múltiples dianes, per tal d'assignar una puntuació a cada UTR. Bases de dades com *TargetScan* presenten una taxa de falsos positius del 22% en humans.

Pel que fa a la nomenclatura, la numeració dels microRNA és seqüencial, s'han anat enumerant en l'ordre que han estat descrits. Previ al número, les tres primeres lletres defineixen l'organisme, així pels humans cal afegir: *hsa* com a prefix (*hsa-mir-121*).

Per tant, cada entrada a la seqüència *miRBase* té un sol número. Les bases estan en constant evolució, per tant s'hi van incorporant microRNAs però també els ja descoberts i publicats es poden modificar si és necessari.

Quan la informació no és suficient per determinar quina seqüència del pre-miRNA és la predominant (anteriorment la no dominant era marcada amb un *), o s'ha demostrat funcionalitat a les dues cadenes, s'afegeix un 5p o 3p segons de quina cadena del pre-miRNA prové, la proximitat a l'extrem 3 o 5. Per exemple: *miR-221-5p* (del braç 5') i *miR-221-3p* (del braç 3').

En alguns casos també s'afegeix un 1 o un 2 al final del número (*hsa-miR-9.1*), que indica seqüències de microRNA madur idèntics que s'originen de diferents locus del genoma.

7.2. microRNA circulants

L'any 2007, Valadi i col. i Gilad i col., quasi simultàniament, van mostrar com els microRNAs eren empaquetats en nanopartícules exosomals i es trobaven en sang o compartiments extracel·lulars (82, 83).

En general, els microRNAs extracel·lulars són classificats segons si van units a proteïnes com Ago2 o lipoproteïnes d'alta densitat; o encapsulats en vesícules lipídiques: microvesícules, exosomes o òrgans apoptòtics. En qualsevol de les formes, el microRNA està ben protegit de les RNases, i això és el que confereix estabilitat relativa als microRNAs circulants (figura 24).

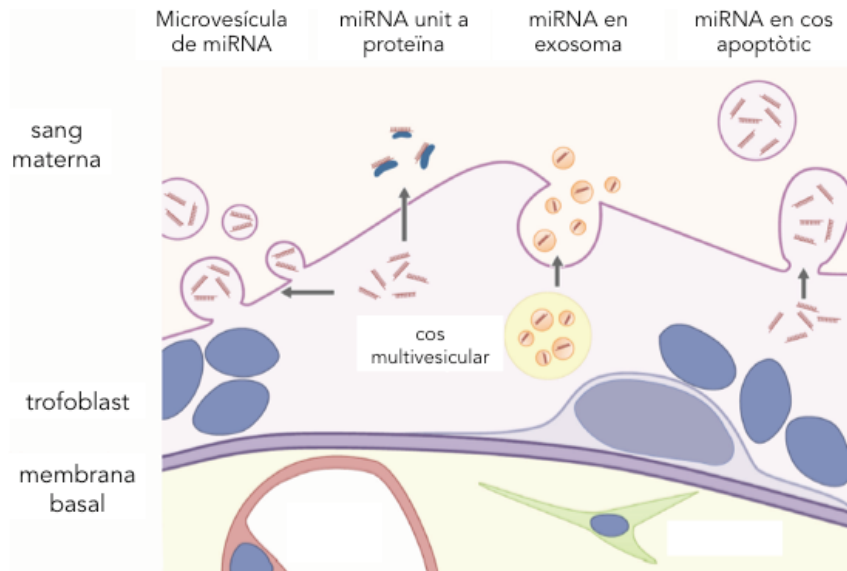


Figura 24. *microRNAs extracel·lulars derivats del trofoblast.* Adpatació de Ouyang i col. (84). Els microRNAs són alliberats a la sang materna dins de microvesícules, en forma d'exosomes, en cossos apoptòtics o units a proteïnes.

La biogènesi de les microvesícules és diferent de la dels exosomes. En general, les microvesícules s'originen directament de la membrana plasmàtica, que embolcalla la càrrega i fan entre 50nm i 1µm de diàmetre. A diferència dels exosomes, que són petites vesícules d'entre 40-100nm, que se sotmeten a múltiples passos per formar vesícules intraluminals abans de ser alliberades a l'espai extracel·lular. La interacció amb proteïnes d'unió és encara desconeguda (84).

A nivell experimental s'ha demostrat l'alta resistència al procés de congelació i descongelació dels microRNAs; a més, la presència dels microRNAs en exosomes o microvesícules els confereix una alta estabilitat, i els fa resistents a accions enzimàtiques o pHs extrems.

Els mecanismes exactes mitjançant els quals els microRNAs arriben al sèrum i si són biològicament funcionals o simplement biomarcadors de factors etiològics són encara desconeguts, però sembla que podrien tenir un paper important en la comunicació intercel·lular. No obstant això, els nivells de microRNAs en sèrum podrien ser un potencial sistema predictiu de diferents malalties, en comparació amb els biomarcadors derivats de teixits diana. La creixent evidència indica que molts microRNAs circulants estan involucrats en la patogènesi de diverses malalties com ara la diabetis o les malalties cardiovasculars.

7.3. microRNA i placenta

Els microRNAs han estat descrits en diferents teixits i fluids corporals com plasma, saliva, llàgrimes, orina, líquid amniòtic, calostre i llet materna, líquid bronquial, líquid cefaloraquídi, líquid peritoneal, líquid pleural i semen. Alguns microRNAs són específics i la majora s'expressen de manera diferencial a cada òrgan i aquesta expressió canvia en cas d'alteració de la fisiologia (85).

Estudis recents han demostrat també l'expressió de microRNAs en placenta humana (86). Alguns s'expressen de manera específica en aquest teixit i/o de forma temporal durant les diferents etapes del desenvolupament placentari i d'acord amb les seves funcions. Se n'han detectat més de 500, i el seu origen és principalment les cèl·lules del trofoblast (87, 88).

7.3.1. Localització

Molts dels microRNAs placentaris descrits fins al moment provenen dels clústers C19MC (*chromosome 19 miRNA cluster*) i C14MC (*chromosome 14 miRNA cluster*) que s'expressen específicament o preferentment a la placenta.

El C19MC, es localitza en el cromosoma 19q13.41 i s'expressa a partir de l'al·lel patern (89). És el grup més gran de microRNAs identificats fins a dia d'avui en placenta i expressa 46 gens intrònics que donen lloc fins a 59 microRNAs (*figura 25*). El C19MC, a més, té un impacte important en la proteòmica del trofoblast, tot i que la

seva funció encara és poc coneguda. S'expressa també en cèl·lules embrionàries, i la seva baixa expressió en estats poc diferenciats, com en cèl·lules mare embrionàries, expliquen un possible rol en la diferenciació o manteniment de la pluripotencialitat (90). Els nivells de C19MC en cèl·lules trofoblàstiques augmenten del primer al tercer trimestre, així la seva expressió es relaciona amb el ràpid creixement i desenvolupament de la placenta.

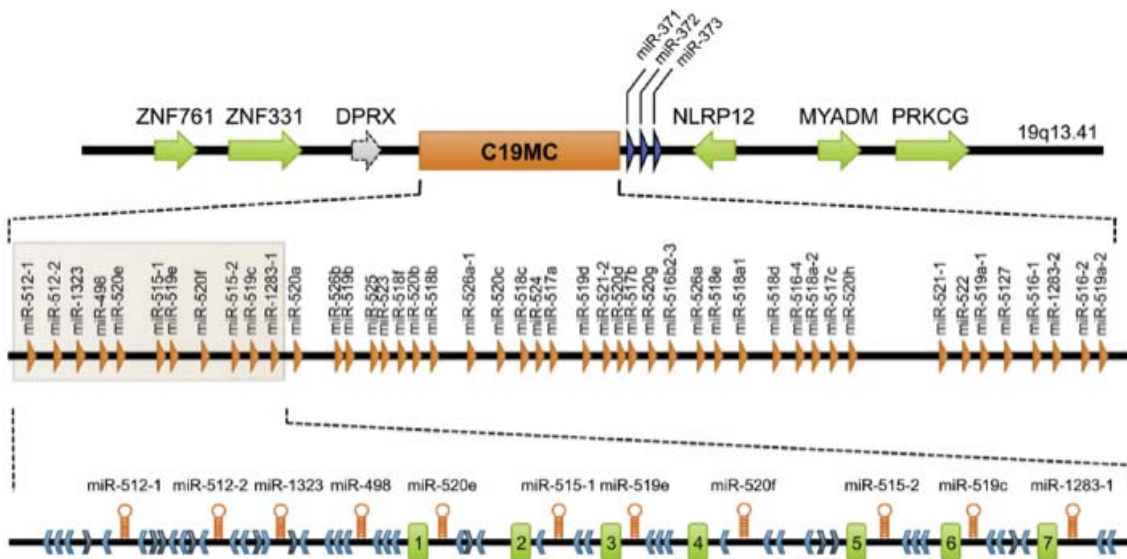


Figura 25. Clúster C19MC. MicroRNAs inclosos en el clúster C19MC. Mouillet i col. (88)

El clúster C14MC, d'origen matern, es troba al cromosoma 14q32 i conté 46 miRNAs,. També és altament expressat en la placenta humana, però no de forma exclusiva,. Els microRNAs de C14MC estan sobreexpressats en cèl·lules trofoblàstiques del primer trimestre i el seu nivell disminueix en el tercer trimestre. Altres microRNAs placentaris, no presents en aquestes regions, també varien en funció del trimestre de gestació. (91)

Un tercer clúster, el miR-371-3 clúster, molt pròxim a C19MC també s'expressa predominantment en placenta i en cèl·lules mare embrionàries, i els seus nivells disminueixen durant el desenvolupament, possiblement marcant l'estat de pluripotencialitat de les cèl·lules (92).

7.3.2. Funcions

L'expressió diferencial dels microRNAs durant diferents estadis gestacionals suggereix que tenen una funció específica en cada etapa de la gestació. Per tal de donar alguns exemples, en aquest apartat es resumeixen breument alguns microRNAs i les seves funcions en la gestació.

Els microRNAs presenten efectes reguladors sobre el trofoblast en relació a la proliferació, apoptosi, migració, invasió, així com en l'angiogènesi o metabolisme cel·lular. Tot això suggereix que els microRNAs regulen el desenvolupament i funció placentària. A més, són els encarregats de la comunicació maternofetal, responsable de la tolerància immunològica. Només un petit nombre de microRNAs han estat estudiats i per tant la majoria de funcions dels microRNAs són encara desconegudes.

La proteïna Dicer s'expressa de forma molt abundant en el trofoblast extravellós de primer trimestre, fet que recolza la hipòtesi que els microRNAs poden jugar un paper important en la invasió del trofoblast i transformació de les artèries espirals (93).

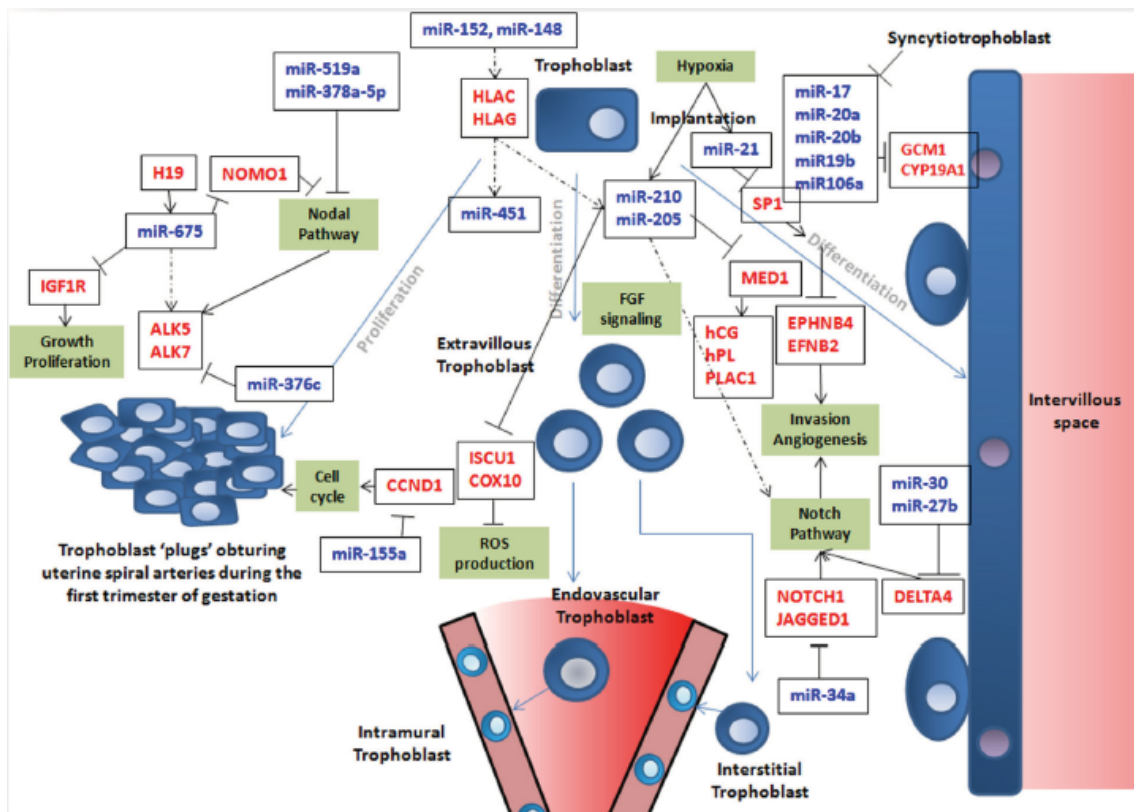


Figura 26. Representació de l'evolució i destí del trofoblast governat per microRNAs. Esquema adaptat de Ludivine i col. (94).

La funció d'alguns microRNAs ha estat relacionada amb el procés de placentació normal (figura 26). Luo i col·laboradors (2012), per exemple, han descrit com miR-378a-5p està augmentat durant la migració/invasió (95). De forma interessant, aquest miRNA té com a diana la via del Nodal/TGF- β . Nodal, és membre de la família del *Transforming Growth Factor*, que presenta un rol crucial durant l'embriogènesi, aquest inhibeix la proliferació i promou l'apoptosi en les cèl·lules del trofoblast. Així mateix, han demostrat que els nivells de miR-378a-5p varien segons l'edat gestacional i són disregulats en patologies com la preeclàmpsia.

Els miR-152 i miR-148 regulen els antígens HLA-G i HLA-C (Human Leukocyte Antigen) de les cèl·lules del trofoblast, concretament al trofoblast extravellós, juguen un paper important en la tolerància immunològica uterino-embriònica.

Altres com miR-93, que s'expressa en estadis inicials de la placenta humana, es creu que tenen un paper important en l'angiogènesi, ja que la seva diana és la *integrin- β 8*, que promou l'angiogènesi tumoral. La falta d'aquesta integrina en embrions de rata és letal, es creu que per la insuficient vascularització de la placenta (96, 97).

En canvi, els miR-21 o miR-221, es creu que tenen una funció supressora de tumors, i estan augmentats en placentes a terme. L'expressió de microRNAs supressors seria lògica per a la maduració placentària i limitació del creixement placentari quan la gestació ja és a terme. Per tant es creu que els microRNAs també podrien jugar un paper en la iniciació del procés de part (98) (99).

S'ha iniciat també l'estudi de microRNAs en embrions humans procedents de cicles de fecundació in vitro (FIV), hipotetitzant que l'expressió i secreció de microRNAs per l'embrió, regulen la interacció blastocist-endometri, necessària per a la implantació. Rosebluth i col·laboradors (2014) van demostrar la secreció d'aquests microRNAs en el medi de cultiu de l'embrió (101). Capalbo i col·laboradors (2016) buscant un biomarcador no invasiu i predictor de la capacitat d'implantació de l'embrió, demostren com els miR-20a i miR-30c estan igualment presents tant en cèl·lules trofoblàstiques com en medi de cultiu d'embrions que s'implantaràn (96,6% de taxa d'implantació). Aquests microRNAs s'expressen en l'estat de blastocist, però no

abans. Així, exposen quins són els miRNAs més expressats en cada estat pre-implantacional (100) (figura 27).

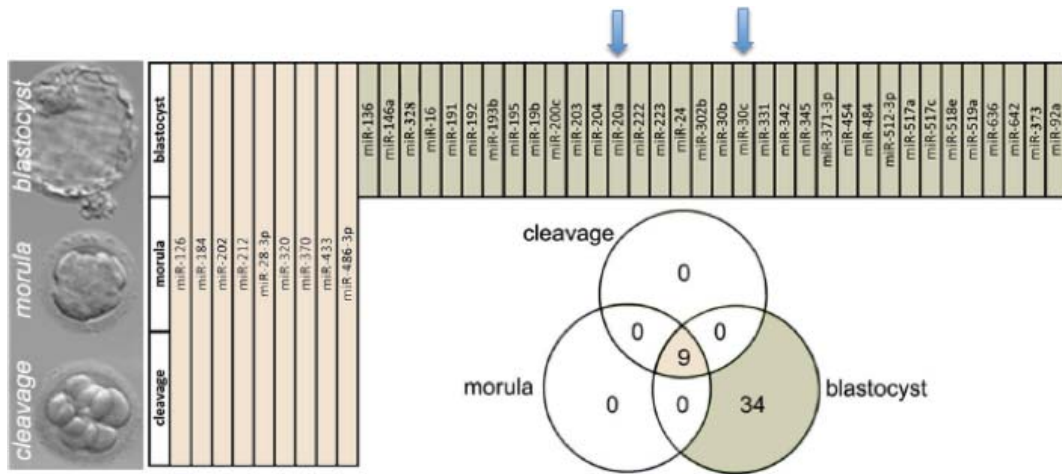


Figura 27. Expressió de microRNAs en estats preimplantacionals. Adaptació de Capalbo i col·l. (100). microRNA detectats en medi de cultiu d'embrions en estat preimplantacionals. 9 miRNAs són comuns en els 3 estats, 34 expressats només en l'estat de blastocist. Destaquen miR-20a i miR-30c, que pronostiquen una alta taxa d'implantació.

Actualment, no hi ha estudis dels microRNAs placentaris en relació amb l'obesitat materna ni el creixement pre i postnatal.

7.3.3. Regulació

La regulació dels microRNAs placentaris encara no és coneguda. La hipòxia placentària i els tòxics ambientals com el tabac o els disruptors endocrins tenen el seu paper en el desenvolupament fetal i placentari, i per tant poden afectar la diferenciació trofoblàstica, la funció metabòlica o la supervivència cel·lular i d'aquesta manera se'ls ha relacionat amb patologies obstètriques com el retard de creixement intrauterí o la preeclàmpsia. Així, el tabac s'ha vist que disminueix l'expressió d'alguns microRNAs placentaris com el miR-16, miR-21 i miR-146. La hipòxia altera gran número de microRNAs, podem destacar per exemple els miR-21 i miR-221 (102). El que no es veu afectat per efectes de la hipòxia són les proteïnes que intervenen en la síntesi dels microRNAs com Exportin5, Dicer o Ago2 (103).

L'alimentació també pot regular l'expressió de microRNAs que poden ser importants per al desenvolupament fetal; en aquest cas els estudis no s'han realitzat a nivell placentari, sinó a nivell d'òrgan específic o en sang com veurem més endavant.

7.4. Presència de microRNAs placentaris expressats en plasma

Chim i col. (2008) van demostrar la presència de microRNAs placentaris en plasma de gestants i van observar una ràpida disminució dels seus nivells just després del part. Concretament el miRNA-141, que va ser detectat en totes les placentes de l'estudi, la seva concentració en plasma augmenta a mesura que avança la gestació i presenta una disminució molt important a les 24 hores del part (figura 28). Aquest descobriment obria la porta al desenvolupament de tests diagnòstics prenatals no invasius (104).

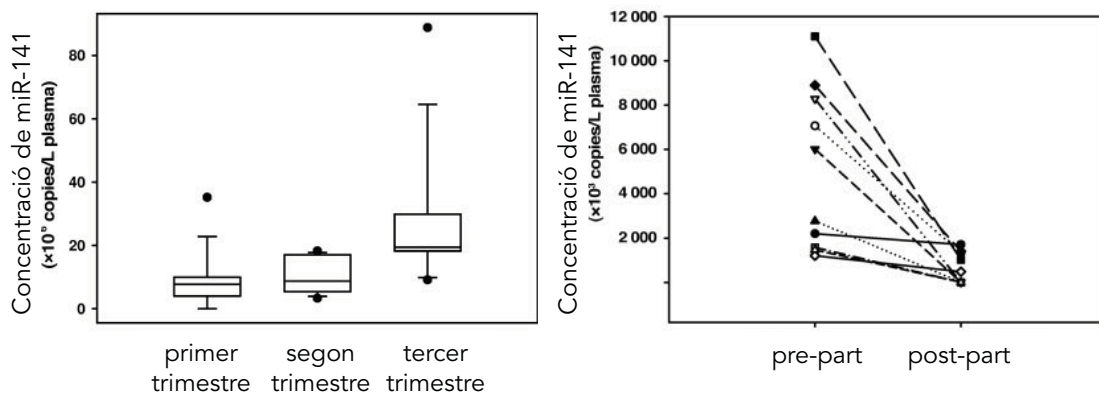


Figura 28. Expressió de microRNAs en plasma durant la gestació i a les 24 hores postpart. Adaptació de Chim i col. (104). L'expressió de miR-141 augmenta al llarg de la gestació. El Test de Wilcoxon revela una diferència significativa entre concentracions de miR-141 pre i postpart amb $p=0.002$.

La descoberta d'exosomes en sang provinents de placenta proporciona evidència de la funció paracrina dels trofoblasts placentaris, que utilitzen el transport mitjançant exosomes per comunicar-se amb altres cèl·lules maternes.

Així doncs, estudis recens mostren que els microRNAs juguen un paper important i necessari en el desenvolupament embrionari i desenvolupament tissular, i que estan implicats en el manteniment de la identitat de les cèl·lules embrionàries i en la

regulació de la seva diferenciació i automanteniment. Aquests microRNAs són altament específics del tipus cel·lular i de teixit, de manera que cada línia cel·lular de l'organisme té un patró d'expressió específic.

7.5. microRNAs i patologies

7.5.1. Obesitat i diabetis

7.5.1.1. microRNAs i població obesa

L'expressió de microRNAs en obesitat, a part de l'expressió en neoplàsies, ha estat una de les àrees més estudiades, tant en rates com en humans. En la figura 29 es mostren alguns dels microRNAs relacionats amb l'obesitat i la resistència a la insulina descrits en la literatura (figura 29):

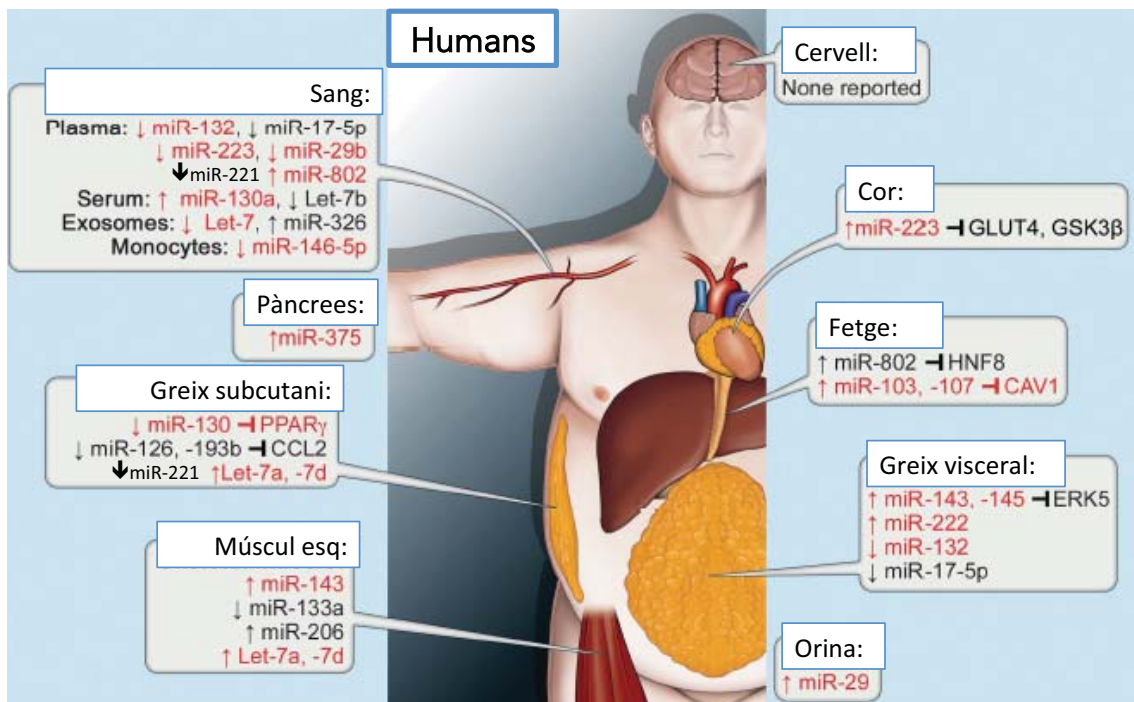


Figura 29. Expressió de microRNAs en obesitat/resistència a la insulina. Adaptació de Deiliulis i col. (105).

Concretament, podem destacar el miR-222, que regula la sensibilitat a la insulina en els adipòcits. L'expressió d'aquest microRNA s'ha vist augmentada en teixit adipós de dones amb diabetis gestacional (106). El nivells de miR-222 s'alteren ràpidament amb

l'administració d'insulina, fet que recolza la importància en la sensibilització a la insulina i per tant, podria ser un important biomarcador circulant de diabetis (107).

L'expressió del miR-221 està disminuïda en teixit subcutani de pacients obesos. A més, després d'una cirurgia bariàtrica amb la conseqüent pèrdua de pes, miR-221 torna a augmentar en plasma (108, 109).

Let-7, que va ser el primer microRNA descobert en humans, també és un potent regulador del metabolisme de la glucosa. S'ha vist que té com a dianes el IGF1R, el receptor d'insulina i el substrat del receptor d'insulina-2 (IRS-2) en el múscul esquelètic i teixit hepàtic, i a la proteïna Lin28, que regula la producció i sensibilitat a la insulina. A més, s'ha demostrat que la insulina regula els nivells de Let-7 retornant-los a nivells basals (110). Així doncs, Let-7 s'ha postulat com a biomarcador de la síndrome metabòlica i també s'ha demostrat la seva importància en l'expansió del teixit adipós, doncs la sobreexpressió d'aquest microRNA resulta en disminució de l'adipogènesis.

7.5.1.2. *microRNAs i gestants obeses*

Com hem dit anteriorment, l'exposició del fetus en desenvolupament a condicions metabòliques anormals com hiperglucèmia o hiperinsulinèmia altera l'expressió gènica i crea una predisposició a la obesitat i a la síndrome metabòlica. L'epigenètica de l'obesitat relacionada amb els microRNAs presenta un gran potencial d'estudi per a la predisposició transgeneracional.

Per tant, la nutrició materna o estat obesogènic matern podrien afectar l'expressió dels microRNA, tal com *Zhang* i col. (2009) van demostrar en ratolins. Una dieta rica en greixos pot regular l'expressió de diferents microRNAs en fetge, entre els quals s'inclouen els miR-122, let-7 i miR-483. El miR-483 participa en la regulació d'*Igf2* (*insulin-like growth factor 2*) que estimula el creixement i s'associa a alt pes dels nadons al néixer i creixement hepàtic excessiu amb augment del greix visceral; a més, el greix visceral segueix augmentat en l'edat adulta (111).

També en model animal, *Benatti* i col. (2014) demostren respostes hepàtiques adaptatives, causades per una expressió diferencial dels miR-370 i miR-122 hepàtics

en fills de mares amb dietes riques en àcids grassos durant la gestació i la lactància, aquests presenten intolerància a la glucosa i augment de resistència a la insulina (112).

A nivell matern, s'ha estudiat la importància dels microRNAs en l'adaptació de les cèl·lules β dels illots pancreàtics en els diferents estadis de la gestació i s'ha descrit una sobreexpressió de miR-144 i miR-451 i infraexpressió de miR-218 i miR-338-3p. Tots aquests microRNAs van tornar als seus nivells basals hores després del part. L'augment d'estradiol, provoca una disminució de miR-338-3p, que promou la proliferació de les cèl·lules β . La creació d'un anti-miR-338-3p evita la proliferació d'aquestes cèl·lules provocada per l'estradiol (113).

Finalment, en humans també hi ha alguns estudis, tot i que són escassos, que han demostrat els efectes dels microRNAs associats a la obesitat o efectes de la dieta durant la gestació i descendència. *Nardelli* i col. (2014) descriuen la diferent expressió de microRNAs en líquid amniòtic de mares obeses. Hipotetitzen que aquests microRNAs podrien afectar diferents vies relacionades amb el creixement fetal, però no demostren els efectes en el fetus (114).

En canvi, *Ghaffardii* i col. (2015) no troben diferències en l'expressió de microRNAs en sang de cordó umbilical (115).

Shi i col. (2014) demostren la sobreexpressió del miR-222 en teixit omental en cesàries de mares amb diabetis gestacional (106). Com hem vist anteriorment, el miR-222 regula negativament l'expressió de la sensibilitat a la insulina al teixit adipós a través de la regulació de ER α i GLUT4.

7.5.2. Implicacions clíniques dels microRNAs en patologia obstètrica

De totes les patologies metabòliques de l'embaràs, la preeclàmpsia i el retard de creixement intrauterí han estat les més estudiades, ambdues relacionades amb la perfusió placentària i per tant amb el procés de creació i desenvolupament de la mateixa. L'interès en trobar un biomarcador de preeclàmpsia recau en la importància

d'aquesta de cares al pronòstic tant matern com fetal, i la manca d'una eina suficientment sensible i/o específica per a un diagnòstic precoç en la gestació.

Pineles i col. (2007) van ser els primers a estudiar els microRNAs desregulats en placentes de gestants amb preeclàmpsia, entre els quals destaquen el miR-182, regulador d'isquèmia i hipòxia; i el miR-210 induït per la hipòxia (116). Des d'aleshores, molts han estat els equips, com els de *Zhu* i col. (2009) o *Enquobahrie* i col. (2012) que han estudiat l'expressió de microRNAs en placentes procedents de gestants amb preeclàmpsia (117, 118).

Sorprenentment, cada treball publicat presenta un panell diferent de microRNAs afectats en preeclàmpsia, pocs d'ells es repeteixen entre estudis. L'explicació podria ser l'ús de diferents panells o mostres d'ARN utilitzades. El miR-210 és el més identificat en tots els estudis, i està sobreexpressat en situacions d'hipòxia, tant en cèl·lules tumorals com en cèl·lules endotelials i cèl·lules del trofoblast. També té un paper molt important en el procés d'implantació i desenvolupament placentari (*figura 30*).

microRNA	Expressió	Dianes	Mecanisme d'actuació	Referència
miR-210	↑	HSD17B1, ISCU, EFNA3, HOXA9	Resposta a hipòxia Creixement vascular endotelial Migració i supervivència cel·lular	<i>Pineles</i> (2007), <i>Zhu</i> (2009), <i>Enquobahrie</i> (2011), <i>Ishibashi</i> (2011), <i>Zhang</i> (2015)
miR-223	↓	STAT3, FOXO1, E2F1GZMB	Tolerància immunitària i resposta inflamatòria	<i>Zhu</i> (2009), <i>Choi</i> (2013), <i>Li</i> (2013), <i>Xu</i> (2014)
miR-181a	↑	BIRC6, CBX5	Tolerància immunitària	<i>Zhu</i> (2009), <i>Wu</i> (2012), <i>Xu</i> (2014)
miR-144	↓	CUGBP2- COX2	Implantació i vasodilatació	<i>Zhu</i> (2009), <i>Wu</i> (2012), <i>Li</i> (2013)
miR-20a i miR-20b	↑	EFNB2/EPHB4	Invasió trofoblast	<i>Chen</i> (2012), <i>Wang</i> (2014)

Figura 30. Exemples dels microRNAs més validats en placenta i plasma en preeclàmpsia. (116-126)

Molts d'aquests estudis intenten explicar la relació entre l'alteració de la placentació i la pseudovasculogènesi de les artèries espirals amb la preeclàmpsia. Els miR-17, miR-20a i miR-20b comparteixen "seed sequence" i per tant sembla que la seva funció podria ser additiva. Entre altres gens i vies diana, destaquen *EFNB2* (*Ephrin-N2*) i *EPHB4* (*Ephrin receptor B4*), que presenten una gran importància en la invasió del trofoblast, facilitant la diferenciació a trofoblast extravellós per invadir la decidua i remodelar les artèries uterines. Les artèries espirals es transformen en vasos de baixa resistència facilitant el transport bidireccional mare-fill. La fallada en la remodelació arterial contribueix a la patogènesi de la preeclàmpsia. En placentes amb preeclàmpsia la família de miR-17 està sobreexpressada i *EFNB2/EPHB4* disminuïda (126) (figura 31).

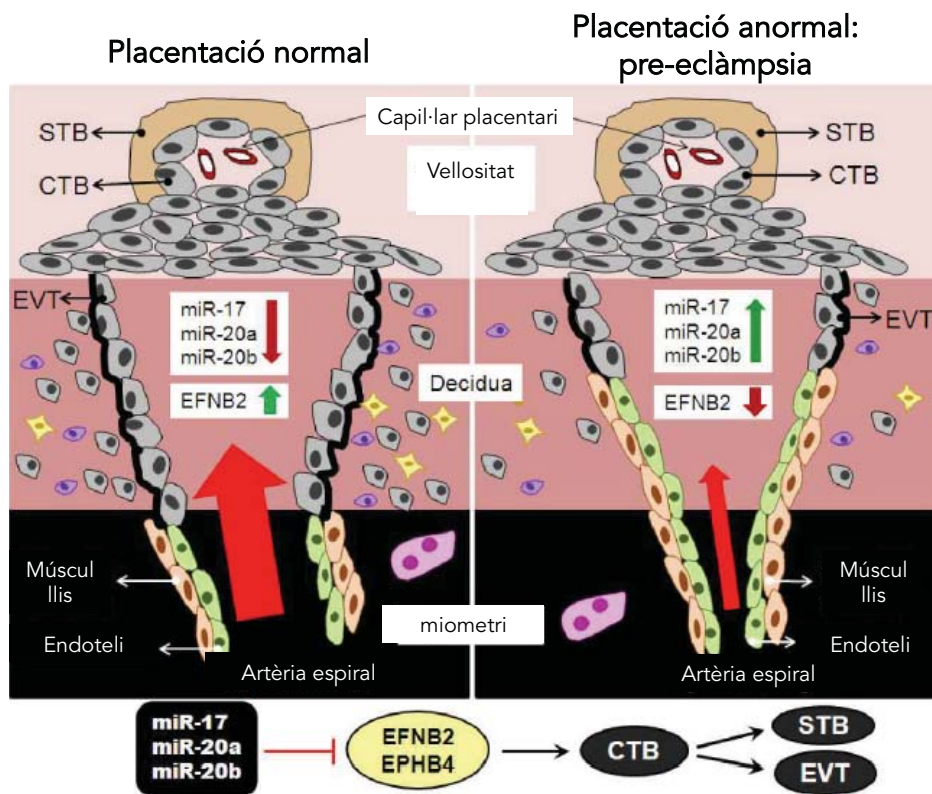


Figura 31. MicroRNAs associats a placentació anormal. Adaptació de Chen i col. (126). Els miR-17, miR-20a i miR-20b regulen *EFNB2* (*Ephrin-N2*) i *EPHB4* (*Ephrin receptor B4*), que presenten una gran importància en la invasió del trofoblast, facilitant la diferenciació a trofoblast extravellós per invadir la decidua i remodelar les artèries uterines. En placentes amb preeclàmpsia (dreta), hi ha una fallada en la remodelació arterial, la família de miR-17 està sobreexpressada i *EFNB2/EPHB4* disminuïda

Li i col. (2013) estudien l'expressió dels microRNAs alterats en preeclàmpsia en sang materna i observen una sobreexpressió dels miR-141, miR-221 i miR-29a i una disminució de miR-144. El miR-144 està desregulat en hipòxia i isquèmia, fet que es dona en la preeclàmpsia. A més, la seva diana és *COX-2-PGE2*, al qual se li ha assignat un efecte en la implantació i promou la inflamació i la tumorigènesi (123). Posteriorment *Hromadnikova* i col. (2014) se centren en el cluster C19MC en placenta i en sang materna de primer trimestre, i per tant previ al diagnòstic clínic de la malaltia. Demostren que el miR-520h té el millor valor predictiu, del 84.6% i una taxa de falsos positius del 7,1%; i el miR-518b un valor predictiu positiu del 73.3% amb un 14.3% de falsos positius (127).

El retard del creixement intrauterí (RCIU), que pot estar relacionat amb la preeclàmpsia, la dieta materna o altres factors de risc, també ha estat molt estudiat. Dels primers a estudiar els microRNAs relacionats amb el creixement fetal són *Maccani* i col. (2011) que demostren que la baixa expressió del miR-16 i/o el miR-21 s'associa amb baix pes al néixer. En el mateix estudi mostren *PTEN* com a diana del miR-21, demostrant que la sobreexpressió d'aquest microRNA en cèl·lules trofoblàstiques disminueix els nivells de *PTEN*. *PTEN* conegut com a supressor tumoral, i present a la placenta, inhibeix la migració i progressió cel·lular, i juga un paper modulador clau en la ruta del AKT-mTOR (128).

Així mateix, el miR-424, que és dependent d'oxigen, es troba sobreexpressat en placentes amb un desenvolupament vascular anormal i en RCIU. Altres, com el miR-518b o el miR-516b, estan disminuïts en placenta però la seva expressió en plasma no presenta variacions importants (70).

Menys estudiades han estat les patologies com la diabetis gestacional i la macrosomia. *Zhao* i col. (2011), van relacionar la diabetis gestacional (diagnosticada entre les setmanes 26 i 28 de gestació) amb microRNAs detectats en sang a l'inici del segon trimestre (setmanes 16 a 19), entre els que destaquen els miR-132, miR-29a i miR-222. *Insulin-induced gene 1 (Insig1)* és un dels gens diana del miR-29a, que juga

un paper important en l'homeòstasi de la glucosa, i va ser validat en el mateix estudi (129).

Pel que fa a la macrosomia també s'han relacionat els microRNAs desregulats en placenta i plasma però els resultats encara són poc concluent. Per exemple, s'ha descrit l'augment del miR-21 en placenta; o la disminució en plasma dels miR-20a, miR-376, miR-141-3p i miR-200c-3p (130-132).

7.7. microRNAs com a dianes terapèutiques

Després de demostrar el seu potencial com a reguladors cel·lulars i la seva expressió en teixit i en sang, s'ha descrit que els microRNAs poden ser bones eines terapèutiques. Aquest camp ha estat investigat sobretot el en món oncològic, ja que s'ha demostrat la seva funció en la iniciació i progressió tumoral així com en les metàstasis.

Per poder arribar a aprovar l'ús d'un microRNA terapèutic, cal primer identificar i validar la via del microRNA a estudi, realitzar estudis *in vitro* i *in vivo* en animals, estudiar la farmacocinètica i farmacodinàmica i finalment desenvolupar assajos clínics (133) (figura 32).

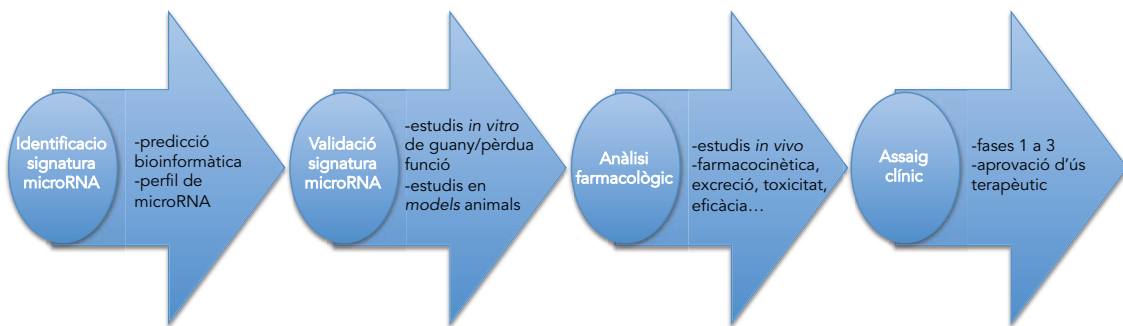


Figura 32. Desenvolupament de microRNA terapèutic. Adaptació de Christopher i col. (133)

L'objectiu de la teràpia amb microRNAs és manipular l'expressió dels microRNAs injectant *antisense-microRNAs* que puguin disminuir l'activitat del microRNA diana o *mimic-microRNAs* que reintrodueixin la funció perduda.

Estratègies terapèutiques:

a) inhibició mitjançant microRNAs-antisentit: es tracta d'oligonucleòtids que contenen seqüències complementàries del microRNA endogen que s'uneixen al microRNA madur i l'inhibeixen o que presenten una major afinitat pel mRNA diana. Anomenats també segons les modificacions bioquímiques: AMO (antisense oligonucleotide), LNA (locked nucleic acid anti-miRNAs), Antagomir o miRNAsponges.

A nivell oncològic, els microRNAs sobreexpressats es poden considerar oncogens i s'anomenen "oncomirs". Aquests han de ser inhibits per restaurar l'expressió i funció normal del seu gen diana supressor de tumors mitjançant microRNAs inhibidors.

b) reemplaçament del microRNA: introducció de microRNA artificial de doble cadena que mimetitza l'efecte del microRNA infraexpressat. Se'ls anomena *miRNA-mimics*.

En les neoplàsies, els microRNAs infraexpressats es consideren supressors de tumors, perquè inhibeixen els oncogens.

S'ha estudiat també el bloqueig dels microRNAs extracel·lular, a nivell d'exosomes.

Fora de l'àmbit oncològic, també estan en marxa estudis sobre la inhibició de la replicació en infecció per virus de l'hepatitis C, síntesis de colesterol i arteroesclerosi o regeneració de miocardi entre altres (*figura 33*).

microRNA objectiu	Malaltia	Tecnologia	Mecanisme	Estadi
miR-122	infecció VHC	anti-miRNA	Bloqueja la replicació de VHC	Fase IIa
miR-34	neoplàsies hepàtiques	mimic	Reducció de l'expressió d'oncogens, regressió tumoral	Fase I
miR-33	arterioesclerosi	anti-miRNA	Regula homeostasi del colesterol i àcids grassos	Preclínic finalitzat
miR-155	neoplàsies hematològiques	anti-miRNA	Redueix la proliferació cel·lular aberrant	Preclínic finalitzat
miR-15	infart de miocardi	anti-miRNA	Redueix la mortalitat cel·lular i promou la regeneració muscular cardíaca	Preclínic

Figura 33. Exemple de microRNAs terapèutics a estudi. Adaptació de Shah i col., Christopher i col. (133, 134)

HIPÒTESIS

L'obesitat pregestacional i gestacional s'associen a un perfil diferencial de microRNAs en plasma i placenta. Els nivells d'expressió d'aquests microRNAs s'associen amb paràmetres endocrinometabòlics de la mare durant l'embaràs i amb creixement pre i postnatal.

Les hipòtesis específiques del treball són les següents:

a) El perfil d'expressió dels microRNAs en plasma matern de segon trimestre de gestació i placenta al naixement és diferent en gestants sanes (sense trastorns metabòlics ni patologies de la gestació) comparades amb gestants amb obesitat pregestacional i obesitat gestacional.

b) Els microRNAs que presenten un patró d'expressió diferencial en obesitat materna (pregestacional i gestacional) s'associen a diferents paràmetres antropomètrics (pes, IMC) i metabòlics (perfil lipídic, glucosa i resistència a la insulina) durant la gestació.

c) Els microRNAs que presenten un patró d'expressió diferencial en obesitat materna (pregestacional i gestacional) s'associen al creixement pre i postnatal de la descendència (pes i longitud) durant el primer any de vida.

OBJECTIUS

Els objectius específics de la tesi són:

- 1) Determinar el perfil d'expressió de microRNAs en plasma de segon trimestre de gestació i placenta al naixement en una cohort que inclou embarassades sanes (Control), embarassades amb obesitat pregestacional (OBPre) i embarassades amb obesitat gestacional (OBGest).
- 2) Comparar el perfil de microRNAs en plasma matern i en placenta entre embarassades sanes (Control), embarassades amb obesitat pregestacional (OBPre) i mares amb obesitat gestacional (OBGest).
- 3) Correlacionar l'expressió dels diferents microRNA que presentin un patró diferencial en obesitat materna amb paràmetres materns durant la gestació. Aquests paràmetres inclouen mesures antropomètriques (pes i IMC a cada trimestre) i biomarcadors en sang de tolerància a la glucosa i resistència insulina (glucosa, hemoglobina glicada, test O'Sullivan, insulina, HOMA-IR, pèptid-C i adiponectina-APM) i biomarcadors de perfil lipídic (triglicèrids, colesterol).
- 4) Correlacionar l'expressió dels diferents microRNAs que presentin un patró diferencial en obesitat materna amb paràmetres de creixement prenatal (pes i longitud al naixement, pes placenta).
- 5) Correlacionar l'expressió dels diferents microRNAs que presentin un patró diferencial en obesitat materna amb paràmetres de creixement postnatal (pes i longitud als 1, 4, 6 i 12 mesos de vida).
- 6) Determinar *in silico* els mRNA diana i les possible rutes metabòliques relacionades amb els microRNAs que presentin un patró diferencial en obesitat materna i estiguin associats a creixement pre i postnatal.

MATERIAL I MÈTODES

1.- Disseny i subjectes d'estudi

Es tracta d'un estudi observacional longitudinal en una cohort poblacional de gestants – recent nascuts iniciat l'abril de 2013 fins al desembre de 2016.

La població d'estudi consisteix en 70 embarassades caucàsiques amb gestacions de baix risc (sanes o bé amb obesitat pregestacional i/o gestacional però sense altres complicacions gestacionals), amb parts a terme i amb nadons amb pes normal al néixer. Les pacients van ser incloses des del PASSIR Girona-Pla de l'Estany (Programa d'Atenció a la Salut Sexual i Reproductiva) (Catalunya, Espanya), concretament als ambulatoris participants a l'estudi que eren: CAP Güell i CAP Sarrià de Ter. Aquestes gestants van fer el control de la gestació així com les analítiques al seu ambulatori, i les tres analítiques així com les tres ecografies establertes en el control de gestació de baix risc a l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta.

Els criteris específics d'inclusió van ser:

- a) Mares caucàsiques de gestacions úniques i seguiment des del primer trimestre al PASSIR Girona – Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta; absència d'hàbit tabàquic, alcohol o altres drogues. Es valora la presència d'obesitat pregestacional i augment excessiu de pes durant la gestació.
- b) Nadons nascuts a terme a l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta, entre les 37 i les 42 setmanes de gestació, amb pes i longitud dins la mitjana +/- 1,5 desviacions estàndards.
- c) Possibilitat de recol·lecció de mostra placentària.
- d) Consentiment informat signat.

Els criteris d'exclusió van ser:

- a) Nadons amb baix pes al néixer (petit per edat gestacional o retard de creixement intrauterí: pes al néixer inferior a percentil 5 i/o Dopplers alterats)
- b) Diabetis gestacional (alteració de 2 o més valors en el TTOG)
- c) Hipertensió gestacional o preeclàmpsia (HTA associada a proteïnúria més enllà de les 20 setmanes de gestació)
- d) Malalties cròniques de la mare o fumadores

- e) Complicacions del part (sospita de pèrdua de benestar fetal)
- f) Malformacions congènites (cardiopatia, nefropatia...)

Les dones van ser agrupades segons el seu IMC pregestacional i l'augment de pes durant l'embaràs segons les recomanacions de l'*Institute of Medicine (IOM)* (figura 34) (135).

Grup	Nom	IMC pregestacional	Guany de pes durant la gestació
Control	Control	18.5-24.9	<16kg
Obesitat pregestacional	OBPre	>25	7-11.5
Obesitat gestacional	OBGest	18.5-24.9	>16

Figura 34. *Recomanacions de guany de pes durant l'embaràs en funció de l'IMC pregestacional segons l'IOM.* IMC: Índex de Massa Corporal. IOM: Institute of Medicine.

Cap de les gestants de l'estudi tenia un pes inferior al normal (IMC <18.5). Un IMC pregestacional >25, que correspon a sobrepès, va ser considerat dins del grup obesitat pregestacional. L'estudi no inclou cap pacient amb obesitat mòrbida (IMC >40).

2.- Variables d'estudi

2.1. Variables prenatales

El seguiment prenatal habitual, que consisteix en els seguiments clínics, ecogràfics i analítics (de sang i orina) protocol·litzats, es va dur a terme a totes les embarassades de l'estudi. Paral·lelament, es van fer dues visites de l'estudi al mateix hospital, coincidint amb el dia de l'anàlisi del segon i del tercer trimestre que consistien en una exploració física i un qüestionari d'antecedents personals, hàbits d'alimentació i exercici físic.

2.1.1. Variables clíniques

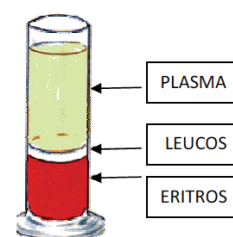
La informació sobre els antecedents mèdics personals i familiars es va obtenir de l'entrevista amb les mares/pares (que es realitzava el mateix dia de l'anàlisi del segon trimestre) pel personal de l'estudi. Aquell mateix dia es mesurava i pesava la pacient amb un tallímetre i una bàscula calibrades.

La informació sobre el seguiment de la gestació així com el pes i la talla pregestacional es va obtenir del carnet de l'embaràs i/o curs clínic informàtic, on queda reflectit el control de la gestació. L'IMC es va calcular segons pes (kg) dividit per alçada al quadrat (m^2) = kg/m^2 . L'augment de pes durant l'embaràs es va calcular restant el pes del moment d'estudi menys el pes pregestacional.

2.1.2. Variables analítiques

Coincidint amb l'anàlisi protocol·litzada del segon trimestre, que es realitzava a la sala d'extraccions del laboratori general de l'hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta entre les 26 i les 28 setmanes de gestació, es van recollir tubs extrems per realitzar les determinacions específiques de l'estudi. De cada gestant es van obtenir 3 tubs de sèrum i 2 tubs de plasma EDTA; els de l'anàlisi habitual, que inclou hemograma, bioquímica bàsica i test d'O'Sullivan (test de tolerància a la glucosa: valoració de la glucosa a l'hora de la ingesta d'una solució amb 50 grams de glucosa); i els tubs per al laboratori de recerca.

Un cop al laboratori de recerca, els tubs es van centrifugar immediatament a 4°C durant 15 minuts a 3000 rpm per a la separació de les diferents fases i per a la creació d'una seroteca a partir del tub de sèrum, i d'una plasmoteca i reserva de leucòcits



circulants, a partir del tub de plasma, EDTA. Totes les mostres resultants van ser al·lotades en tubs Effendorf® etiquetats i congelats a -80°C fins a la seva utilització.

La glucosa en sèrum va ser analitzada amb el mètode de l'hexoquinasa. La insulina en sèrum va ser mesurada per immunoquimioluminiscència (*IMMULITE 2000; Diagnostic Products, Los Angeles, CA*); el límit inferior de detecció va ser de 0.4 mIU/l i els

coeficients de variació intra- i interassaig van ser menors del 10%. Per estimar la sensibilitat a la insulina es va fer servir el *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-IR) segons la fórmula $(\text{glucosa (mg/dl)} \times \text{insulina (mUI/l)}) \times 0,0551 / 22,5$ (7).

L'hemoglobina glicada (HbA1c) va ser mesurada mitjançant cromatografia líquida (*Bio-Rad*, Muenchen, Germany) i un autoanalitzador (*Jokoh HS-10*). El pèptic-C va ser mesurat per immunoquimioluminiscència (*IMMULITE 2000; Diagnostic Products, Los Angeles, CA*); el límit de detecció va ser 0.05 ng/mL i el coeficient de variació va ser inferior del 10%. Els triglicèrids totals es van mesurar monitoritzant la reacció del glicerol-fosfat-oxidasa i peroxidasa. El colesterol d'alta densitat (c-HDL) va ser quantificat amb el mètode homogeni de detergent selectiu amb accelerador. L'adiponectina va ser analitzada mitjançant assajos per immunoabsorció lligat a enzims (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA*) tipus sandwich; el límit de detecció va ser de 0.8 ng/ml i el coeficient de variació inferior al 4%.

2.2. Variables del part i postpart

Tots els nadons van néixer a terme a l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta, bé per part vaginal o per cesària.

2.2.1. Variables del part

Els nadons van ser pesats i mesurats al néixer, usant bàscules i tallímetres calibrats.

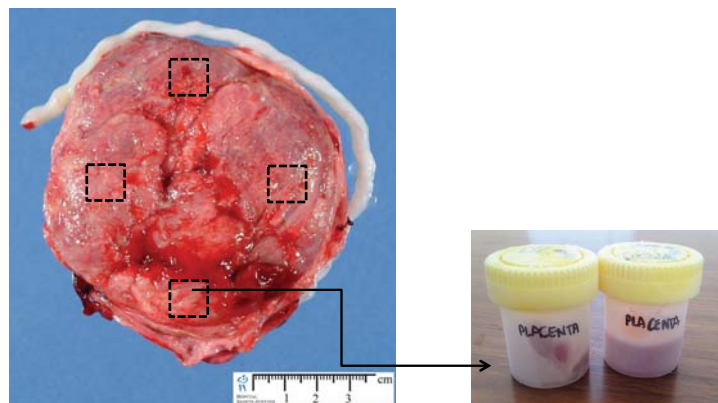


Figura 35. Biòpsia de placenta. Es va obtenir una mostra de cada quadrant de la cara materna de la placenta; que es va dipositar en *RNA-later*.

Les placentes també van ser pesades al moment del part just després del deslliurament. En el mateix moment es van obtenir les biòpsies de la cara materna de la placenta: 4 mostres, una per quadrant, d'1cm³ aproximadament, que es van dipositar en tubs amb *RNAlater*® (figura 35).

2.2.2. Variables del nadó

Es va fer un seguiment del recent nascut al llarg del primer any de vida i es va anotar el pes i l'alçada als 1, 4, 6 i 12 mesos de vida, així com un qüestionari d'alimentació. Aquests valors es van estandarditzar per edat gestacional i sexe (SDS). L'augment de pes es va calcular restant al pes en el moment d'estudi menys el pes al naixement. Seixanta nadons van realitzar el seguiment complet fins als 12 mesos de vida, 20 nadons de mares control, 20 nadons de mares OBPre i 20 nadons de mares OBGest.

3.- Expressió gènica

3.1. Extracció d'ARN

Per a la determinació dels microRNAs es va realitzar una extracció d'ARN total de les mostres de plasma i de placenta seguint protocols específics en cada cas (figura 43).

3.1.1. Extracció d'ARN de plasma

L'ARN total, incloent-hi els microRNAs, es va aïllar de les mostres de plasma amb el kit d'aïllament *mirVana*TM *PARIS*TM (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*) segons les instruccions del fabricant.

Es va partir de 300 µL de plasma, dipositats en un *Eppendorf*® *RNAse-free*. Aquest es va barrejar amb 300 µL de *Denaturing Solution* per a la homogeneïtzació de la mostra a temperatura ambient. Seguidament es van afegir 600 µL de la solució *Acid-Phenol: Cloroform* i aquesta nova mescla es va agitar amb *Vortex*® durant 60 segons, deixada en repòs entre 2 i 3 minuts, per ésser posteriorment centrifugada durant 10 minuts a 12000 rpm a temperatura ambient. Es van formar dues fases, la fase superficial aquosa

que contenia uns 450 µL de l'ARN dissolt, va ser transferida a un nou *Eppendorf*®. Es van afegir 563 µL d'etanol al 100% (corresponent a 1.25 vegades el volum de la mostra) a temperatura ambient a cada *Eppendorf*® i es van agitar vigorosament. Immediatament després es van pipetejar 700 µL de la solució lisat/etanol al *Filter Cartridge*, prèviament introduït en un tub de recol·lecció de 2 ml. Es va tapar la columna i es va centrifugar 30 segons a 10000 rpm. Es va recollir la solució restant i es va repetir aquest pas. Seguidament es van pipetejar 700 µL del tampó *Wash Solution 1* (prèviament diluïda amb 21 ml d'etanol 100%) a la columna i es va centrifugar 15 segons a 10.000 rpm per netejar la columna d'impureses. Es van pipetejar 500 µL de *Wash Solution 2/3* (prèviament diluïda amb 40ml d'etanol 100%) a la columna i es va centrifugar 15 segons a 10.000 rpm i es va descartar la solució residual. Posteriorment es fa centrifugar la columna seca a velocitat màxima durant 1 minut. Finalment es va situar la columna en un *Eppendorf*® correctament etiquetat i es va eludir amb 40 µL d'aigua *RNAse-free* preescalfada a 95°C, es va centrifugar 30 segons a 10.000 rpm per tal de resuspendre la fracció de RNA purificada. De la mostra final, 5µL es van aliquotar per a l'anàlisi de qualitat i la resta, uns 35 µL, es van aliquotar per als experiments posteriors.

3.1.2. Extracció d'ARN en placenta

L'ARN total, incloent-hi els microRNAs, es va aïllar de les mostres de placenta amb el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen; Madrid, Spain) segons les instruccions del fabricant (*figura 36*).

Es va partir de 100 mg de placenta, que sense descongelar, es va homogeneïtzar/lisar amb 700µL de *QIAzol*® i usant el politró *Ultra-turrax T25 basic* (*IKA-Werke, GMBH&Co, Germany*) durant 30 segons a 20000 rpm

Es van afegir 140 µL de cloroform a la solució, es va agitar vigorosament durant 15 segons i es va deixar reposar a temperatura ambient entre 2 i 3 minuts. Després de centrifugar la solució 15 minuts a 20000 rpm, es van poder apreciar 3 fases aïllades, es

va transferir la més superficial i aquosa, que contenia uns 500 μL d'ARN dissolt, a un nou *Eppendorf*®.

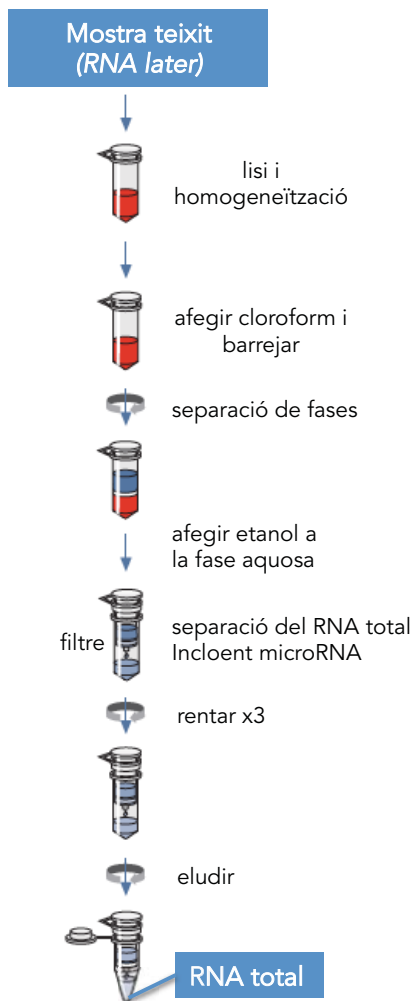


Figura 36. Esquema d'extracció de RNA total.

Es van afegir 500 μL (corresponent a 1 vegada el volum de la mostra) d'etanol 100% i es va barrejar vigorosament. Immediatament després es van pipetejar 700 μL de la solució a la *RNeasy® Mini Spin Column*, prèviament introduïda en un tub de recollida de 2 ml. Es va tancar la columna i es va centrifugar a 10000 rpm durant 15 segons a temperatura ambient. Es va repetir el pas anterior fins a 2 vegades més amb la solució restant. Seguidament es van pipetejar 350 μL del tampó *RWT* (prèviament diluït amb etanol 100% segons indicacions del fabricant) a la columna i es va centrifugar 15 segons a 10000 rpm. Després es van pipetejar 80 μL de *DNasa* a la membrana de la columna i es va incubar a temperatura ambient 15 minuts. A l'acte, es van pipetejar 350 μL del tampó *RWT* a la columna i es va centrifugar 15 segons a 10000 rpm per rentar-la de *DNasa*. Es va tancar la

columna i es va centrifugar 15 segons a 10000 rpm i es va descartar la solució residual. Posteriorment es van pipetejar 500 μL del tampó *RPE* (prèviament diluït amb etanol 100% segons indicacions del fabricant) a la columna i es va centrifugar 2 minuts a 10000 rpm i de nou es va descartar la solució residual. Finalment la columna seca es va centrifugar 1 minut a velocitat màxima.

La columna es va col·locar en un *Eppendorf*® correctament etiquetat i es va eluir amb 50 μL d'aigua *RNasa-free* i es va centrifugar 1 minut a 10.000 rpm a temperatura ambient per tal de resuspendre la fracció d'ARN ja purificat.

Es van aliquotar 4 μL per a l'anàlisi de qualitat i integritat i la resta, per als experiments posteriors.

3.2. Quantificació

La quantitat d'ARN aïllat en placenta es va determinar amb un espectrofotòmetre *Nanodrop ND - 1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) que analitza l'espectre d'absorció a 260 nanòmetres, que correspon a la longitud d'ona per als oligonucleòtids.

La quantitat d'ARN aïllat de plasma no es pot determinar per ser massa petita. Aquestes mostres requereixen un pas de preamplificació per assegurar tenir una quantitat suficient de microRNAs per poder ser detectats.

La integritat i puresa de cada mostra d'ARN es va comprovar amb un *Bioanalyzer® Agilent* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

3.3. Retrotranscripció d'ARN

L'ARN és una mostra extremadament làbil i no suporta més de 3 cicles de congelació/descongelació. El cDNA, ADN monocatenari sintetitzat a partir de l'ARN en suspensió, és una mostra més estable i resistent als cicles de congelació/descongelació, i per tant l'alternativa més adequada per allargar el temps de vida útil d'aquestes mostres. La retrotranscripció es va realitzar utilitzant el *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* que inclou encebadors, nucleòtids lliures i una retrotranscriptasa termosensible, entre d'altres, que fan possible la transcripció de cada una de les cadenes d'ARN a cDNA.

Es va retrotranscriure una mostra de 3 μL d'ARN total a cDNA en una reacció final de 7,5 μL que contenia: 0,8 μL de solució tamponada (RT Buffer), 0,2 μL de nucleòtids lliures (*dNTPs*), 1,5 μL d'enzim retrotranscriptasa (*MultiScribe™*), 0,1 μL d'inhibidor de RNases, 0,2 μL d'aigua destil·lada lliure d'ARNases, 0,9 μL de clorur de magnesi i 0,8 μL d'encebadors (*Megaplex™ RT primers*).

El protocol de PCR consistia en una primera etapa de *melting* o dissociació de seqüències complementàries i elongació de 40 cicles de: 2 minuts a 16°C, 1 minut a 42°C i 1 segon a 50°C; i una segona etapa de 5 minuts a 85°C per a la inactivació de l'enzim retrotranscriptasa i finalment la mostra es va conservar a 4°C.

3.4. Preamplificació de cDNA circulat, provinent de plasma

La mostra de cDNA provinent de plasma va precisar d'un pas previ de preamplificació abans del seu estudi que es va realitzar amb *TaqMan PreAmp Master Mix™* i *Megaplex™ PreAmp primers* (pool A i B) (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*).

Es va partir d'una mostra inicial de 3,75 µl de la mostra retrotranscrita, que es va incloure en una reacció final de 12,5 µl que contenia: 6,25 µl de *TaqMan PreAmp Master Mix™*, 1,25 µl d'aigua destil·lada RNasa i 1,25 µl de *Megaplex™ PreAmp primer*.

Els cicles tèrmics per a la preamplificació van consistir en 5 passos: 10 minuts a 95°C, 2 minuts a 55°C, 2 minuts a 72°C, un quart pas que es realitza 12 vegades: 5 segons a 95°C, seguits de 4 minuts a 60°C i finalment 10 minuts a 100°C. La conservació de la mostra es realitza a 4°C fins a la seva utilització.

El resultat de la preamplificació es va diluir amb 37,5 µl d'aigua, per tenir una mostra final de 50 µl (dilució ¼).

3.5. Perfil de microRNA: TLDA

Els perfils de microRNAs es van estudiar inicialment en 18 dones embarassades: 6 amb obesitat pregestacional (OBPre), 6 amb obesitat gestacional (OBGest) i 6 dones control (Control), seleccionades entre la població d'estudi, mares amb valors més propers a la mediana, i valorant la representació segons IMC matern, edat i sexe del nadó.

La identificació dels microRNAs es va dur a terme mitjançant targetes microfluídiques o bioxips de baixa densitat basats en sondes *TaqMan®* (*TaqMan Low Density Arrays, TLDA*) (figura 37).

Es va utilitzar una *TaqMan Human MicroRNA Card Set v3.0*, que consta de 2 TLDA:

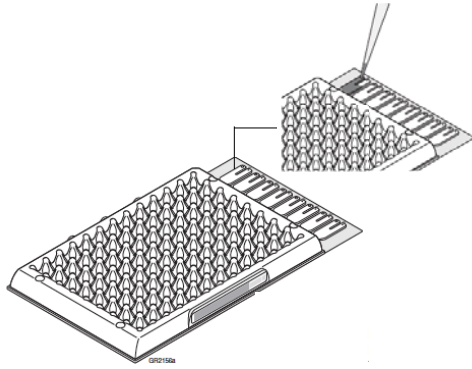


Figura 37. Imatge d'una placa de TLDA.

pool A i pool B, que permet la quantificació exacta de 723 microRNAs humans. El processament i lectura dels TLDA es va dur a terme amb un termociclador en temps real (*Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System*). L'anàlisi dels resultats es va realitzar en un centre extern: al Barcelona Supercomputing Center.

Abans de començar, el producte final de la preamplificació plasmàtica es va diluir per tal d'obtenir una concentració de cDNA adequada: 1/200 del cDNA pre-amplificat de plasma. Així cada 4 µl de la dilució ¼ es van diluir en 196 µl d'aigua destil·lada *RNasa-free* (1/50), obtenint 200 µl de solució final. Per cada array es necessitava un volum de 900 µl que incloïa 9 µl de la mostra diluïda, 450 µl de *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG*, i 441 µl d'aigua lliure de nucleases.

La mostra de cDNA de placenta també es va diluir a 1/50 amb aigua destil·lada *RNasa-free*. Per a cada array es realitzava un volum final de 900 µl que incloïa 6 µl de cDNA plasmàtic, 450 µl de *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG*, i 444 µl d'aigua lliure de nucleases.

Es van dispensar 100 µl de la mostra final de la mescla de PCR a cada finestreta de la *TaqMan® microRNA Array*. Seguidament es va segellar i centrifugar la matriu per a repartir la mostra per a tots els pouets i es va dipositar a l'aparell de RT-PCR per a la lectura i anàlisi posteriors.

Els resultats van ser analitzats mitjançant *Sequence Detection Systems Software* versió 2.3 (*Applied Biosystems*) i el *R package SL qpcrNorm* (*Bioconductor*) (figura 38).

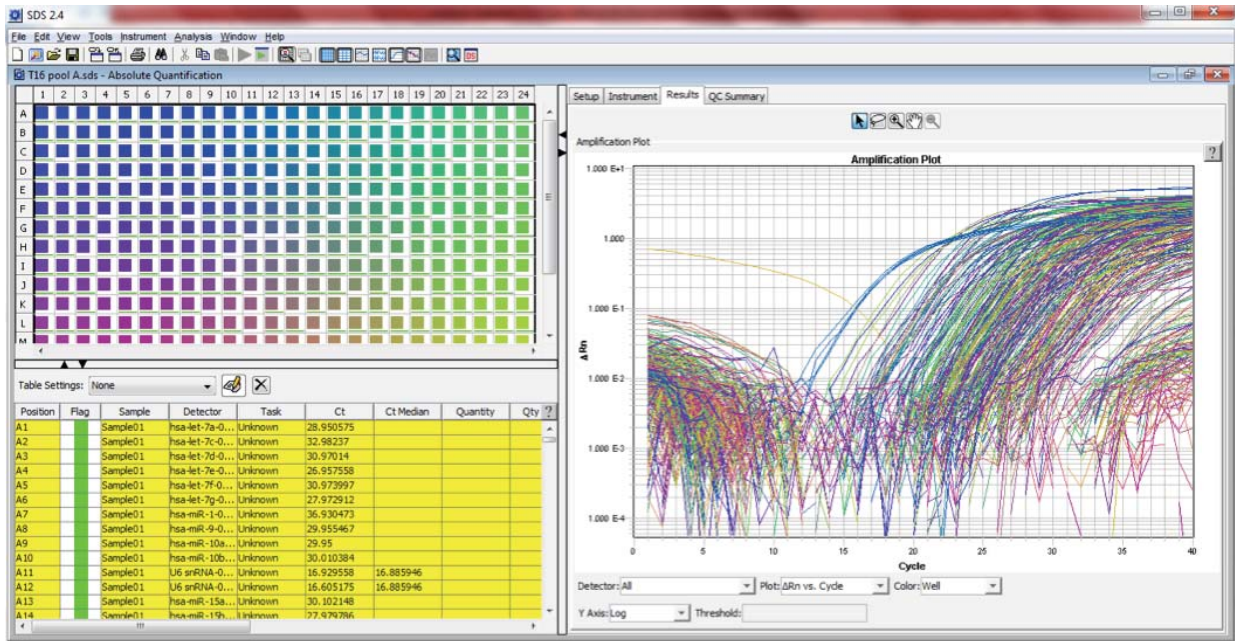


Figura 38. Resultats de TLDA. Els resultats s'analitzen mitjançant *Sequence Detection Systems Software* versió 2.3 (*Applied Biosystems*).

3.6. Anàlisi individual de microRNAs: RT-PCR

Els microRNAs que van mostrar diferències significatives entre els grups d'estudi ($p < 0,05$ i nivell de canvi > 2) es van estudiar en una cohort més àmplia amb l'objectiu de validar els canvis en la concentració dels microRNAs prèviament identificats. El grup d'estudi final va consistir en 70 embarassades de les quals 20 OBPre, 25 OBGest i 25 Controls, incloent-hi els subjectes utilitzats prèviament per a determinar el perfil de microRNAs.

La validació es va realitzar utilitzant *TaqMan® microARN Assays individuals* (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*) i RT-PCR mitjançant el *Sistema LightCycler 480 Real-Time PCR* (*Roche Diagnostics*).

Com hem vist a l'apartat anterior, abans de començar, el producte final de la preamplificació de cDNA plasmàtic es va diluir 1/200 per tal d'obtenir una concentració de cDNA adequada; i per al cDNA placentari es va fer una dilució 1/50.

Per a la qRT-PCR, 5 μ l de la mostra diluïda es van barrejar amb 0,5 μ l de *TaqMan® microARN Assays* i 4,5 μ l de *TaqMan® PCR Master Mix*. El procés de PCR consistia en un primer pas de 10 minuts a 95°C i segon pas que es van repetir 45 cicles de 15

segons a 15 segons seguit de 30 segons a 60°C. Finalment es van extreure i analitzar els resultats.

La RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*; reacció en cadena de la polimerasa amb retrotranscriptasa) permet estimar els nivells d'expressió relatius d'un gen determinat mitjançant canvis de temperatura que es repeteixen 45 cicles anomenats cicles tèrmics (Ct). El termociclador està dotat de sensors per mesurar fluorescència, que s'ha inclòs a la mostra, i detecta la longitud d'ona després de cada cicle d'amplificació. La detecció de cada microRNA es representa normalitzat, a través del valor llindar de cicle tèrmic per al total de mostres. El Ct de cada microRNA es determina pel número de cicles en els quals l'emissió d'intensitat del marcador fluorescent s'eleva per damunt del llindar mínim de detecció, relatiu al soroll de fons assignat prèviament, en la fase exponencial de la PCR. Així, cada mostra origina una corba sigmoïdal que determina el nombre de cicles necessaris per assolir un valor de fluorescència determinat. El valors de Ct són inversament proporcionals al nombre de seqüències microRNA de cada classe, doncs, com més còpies hi ha d'un gen a la mostra estudiada, menys cicles tèrmics es necessiten per assolir el valor de fluorescència determinat.

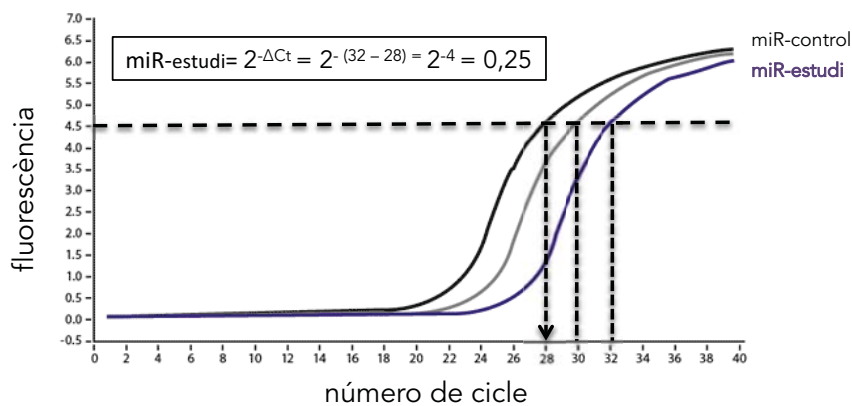


Figura 39. Expressió relativa mitjançant cicles tèrmics. Cada mostra a estudi origina una corba sigmoïdal que determina el nombre de cicles tèrmics necessaris per assolir un valor de fluorescència determinat. Com més còpies hi ha d'un gen a la mostra estudiada, menys cicles tèrmics es necessiten per assolir el valor de fluorescència determinat.

Els nivells relatius de microRNA es van calcular d'acord amb el mètode $2^{-\Delta Ct}$, on ΔCt equival a la diferència entre el Ct del microRNA d'estudi i el Ct del microRNA control o normalitzador (*figura 39*).

Atès que no hi ha consens sobre els microRNAs que s'han d'utilitzar com a normalitzadors, es va realitzar la normalització ΔCt utilitzant els 3 microRNAs més estables del nostre propi estudi (rang invariant). En el cas de les mostres de plasma van ser, del grup A: hsa-miR-28-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-146b-5p; i del grup B: hsa-miR-151a-3p, U6-snRNA, hsa-miR-766-3p (*figura 40*).

En les mostres de placenta, els 3 microRNAs placentaris més estables (rang invariant) i per tant utilitzats com a normalitzadors són, del pool A: hsa-miR-523, hsa-miR-532, hsa-miR-425-5p; i del pool B: hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-520d-3p (*figura 41*).

miRNAS	TaqMan ID	Pool	
hsa-miR-146b-5p	ID#001097	A	ctrl
hsa-miR-28-3p	ID#002446	A	ctrl
hsa-miR-93-5p	ID#001090	A	ctrl
hsa-miR-103a-3p	ID#000439	A	
hsa-miR-122-5p	ID#002245	A	
hsa-miR-128-3p	ID#002216	A	
hsa-miR-130a-3p	ID#000454	A	
hsa-miR-150-5p	ID#000473	A	
hsa-miR-193b-3p	ID#002673	A	
hsa-miR-221-3p	ID#000524	A	
hsa-miR-29c-3p	ID#000587	A	
hsa-miR-324-3p	ID#002161	A	
hsa-miR-340-5p	ID#002258	A	
hsa-miR-370-3p	ID#002275	A	
hsa-miR-375	ID#000564	A	
hsa-miR-423-5p	ID#002340	A	
hsa-miR-652-3p	ID#002352	A	
hsa-miR-885-5p	ID#002296	A	
hsa-miR-99b-5p	ID#000436	A	

miRNAS	TaqMan ID	Pool	
hsa-miR-151a-3p	ID#002254	B	ctrl
hsa-miR-766-3p	ID#001986	B	ctrl
U6 snRNA	ID#001973	B	ctrl
hsa-miR-30a-5p	ID#000417	B	
hsa-miR-625-3p	ID#002432	B	

Figura 40. Taqman® microARN Assays de plasma. Pool A i pool B, en blau els microRNAs controls de cada pool.

miRNAS	TaqMan ID	Pool	
hsa-miR-425-5p	ID#001516	A	ctrl
hsa-miR-523-3p	ID#002386	A	ctrl
hsa-miR-532-5p	ID#001518	A	ctrl
hsa-miR-185-5p	ID#002271	A	
hsa-miR-214-3p	ID#002306	A	
hsa-miR-23b-3p	ID#000400	A	
hsa-miR-296-5p	ID#000527	A	
hsa-miR-29b-3p	ID#000413	A	
hsa-miR-337-5p	ID#002156	A	
hsa-miR-339-5p	ID#002257	A	
hsa-miR-365a-3p	ID#001020	A	
hsa-miR-487a-3p	ID#001279	A	

miRNAS	miRBase ID	Pool	
hsa-miR-30e-3p	ID#000422	B	ctrl
hsa-miR-519b-3p	ID#002384	B	ctrl
hsa-miR-520d-3p	ID#002743	B	ctrl
hsa-miR-483-3p	ID#002339	B	
hsa-miR-100-3p	ID#002142	B	
hsa-miR-1269a	ID#002789	B	
hsa-miR-1271-5p	ID#002779	B	
hsa-miR-1285-3p	ID#002822	B	
hsa-miR-181a-3p	ID#000516	B	
hsa-miR-191-3p	ID#002678	B	
hsa-miR-27a-5p	ID#002445	B	
hsa-miR-520h	ID#001170	B	

Figura 41. Taqman® microARN Assays de placenta. Pool A i pool B, en blau els microRNAs controls de cada pool.

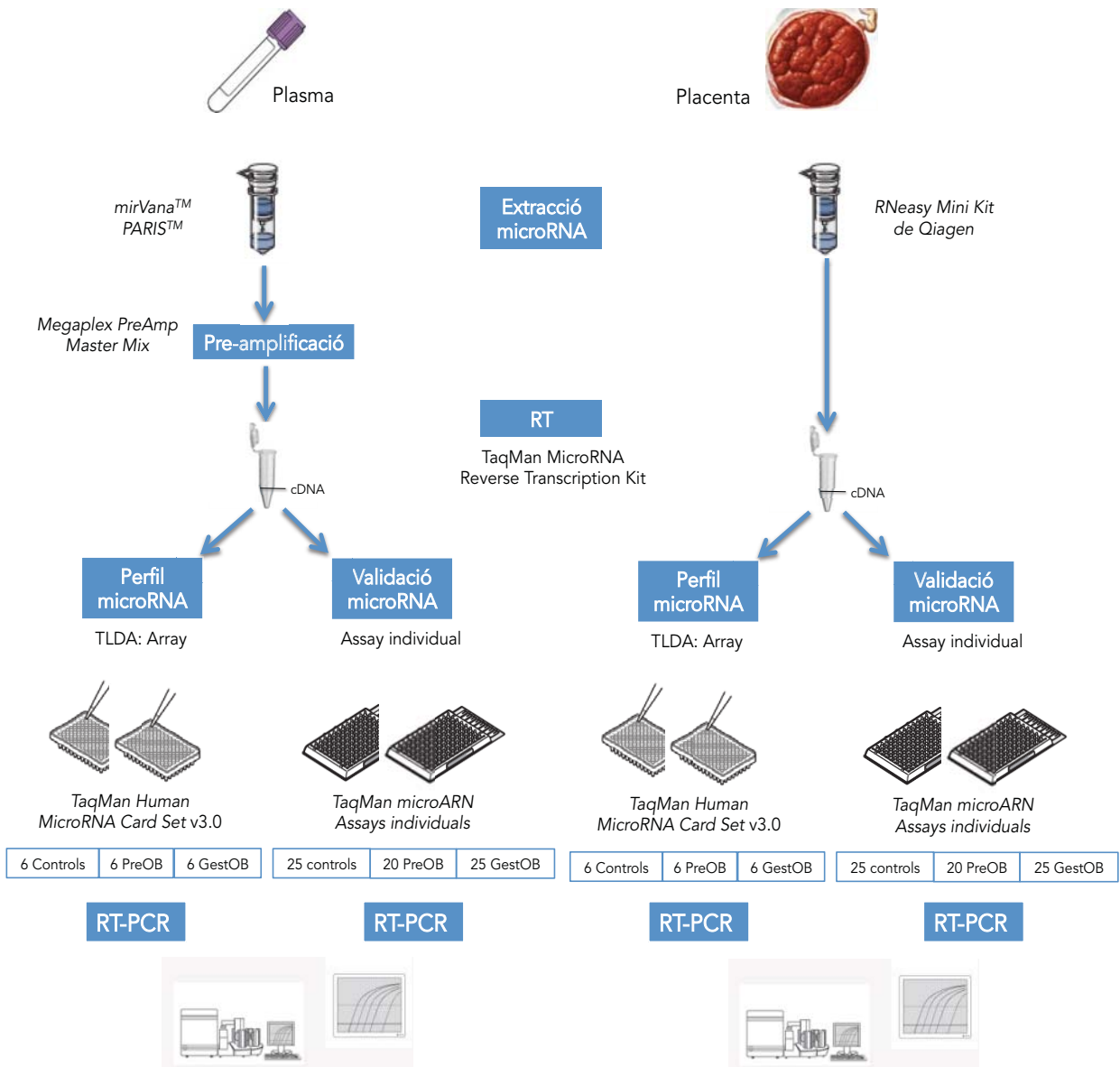


Figura 42. Esquema resum de l'estudi dels microRNAs. A l'esquerra, l'estudi de microRNAs circulants en plasma: extracció de microRNA total amb *mirVana™ PARIS™*, pre-amplificació amb *TaqMan® PreAmp Master Mix™* i retrotranscripció amb *TaqMan® microRNA Reverse Transcription Kit*. A la dreta, l'estudi de microRNAs en placenta: extracció de microRNA total amb *RNeasy Mini Kit de Qiagen* i directament retrotranscripció amb *TaqMan® microRNA Reverse Transcription Kit*. En les dues mostres es realitza inicialment un estudi del perfil de microRNAs mitjançant TLDA (*TaqMan® Low Density Array*) en una mostra de 18 dones (6 controls, 6 OBPre i 6 OBGest). Finalment es van validar els resultats en una cohort de 70 embarassades (25 controls, 20 OBPre i 25 OBGest) amb un estudi *TaqMan® microRNA assay individual* mitjançant RT-PCR.

3.7. Predicció de dianes de microRNA

La recerca de la possible implicació dels microRNAs més rellevants en diverses vies funcionals i gens diana es va realitzar mitjançant recerca bibliogràfica i en bases de dades, lliurement accessibles, on es recullen dades experimentats i *in silico* referents als mRNA diana i les rutes metabòliques en les que participen. Per a la realització d'aquesta tesi s'ha usat miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw>) que integra informació de diverses bases de dades: Kegg, Biocarta, Pathway Interaction Database, Reactome i Go Molecular Function.

4.- Anàlisi estadístic

Tots els paràmetres clínics, analítics i experimentals es van recollir en una base de dades tipus *Acces* (*Microsoft Office Acces, Microsoft Inc.*).

L'anàlisi estadística de les dades i les gràfiques es van realitzar amb el programa SPSS versió 19.0 (SPSS software, IBM, Inc.) i el programa *R* (<http://www.r-project.org/>). El *qPCRNorm* paquet *SL* (*Bioconductor*) també es va utilitzar per a l'anàlisi i la normalització de les dades microRNA.

Els resultats es van expressar com a mitjana \pm SEM (desviació estàndard de la mitjana). Les variables que no seguien una distribució normal van ser transformades logarítmicament.

Es va utilitzar el *Test de Student* per a mostres independents o l'ANOVA *One-Way* i posteriors testos *post hoc* per tal d'estudiar les diferències en les variables contínues entre els tres grups d'estudi. La relació entre les variables es va analitzar mitjançant correlació simple amb test de Pearson seguit d'anàlisi de regressió múltiple. El nivell de significació va ser de $p < 0.05$.

Acceptant un risc alfa de 0,05 i un risc beta de 0,2 en una prova bilateral, es necessitaven 21 subjectes a cada grup per detectar una diferència estadísticament significativa d'1 desviació estàndard de qualsevol variable quantitativa (metabòlica o

expressió de microRNA) entre qualsevol aparellament dels tres grups. Diferències d'1 desviació estàndard eren rellevants per a la majoria de les variables estudiades. La mostra d'estudi també va ser suficient per detectar una correlació estadísticament significativa entre qualsevol parell de variables quantitatives amb un coeficient de correlació de Pearson de 0,33 o superior.

5.- Aspectes ètics

El protocol d'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta. Així mateix, s'ajusta als principis ètics per a la investigació mèdica sobre éssers humans establerts per la *World Medical Association* de la Declaració de Helsinki i per la legislació vigent.

En tots els casos, els subjectes d'estudi han estat informats i inclosos a l'estudi previ consentiment informat per escrit. En cas dels nadons, les mares, com a tutor legal, han signat aquest consentiment.

S'ha assegurat la confidencialitat de la identificació dels subjectes d'estudi així com les dades personals i variables d'estudi segons la Llei Orgànica de Protecció de Dades 15/1999. per tal de mantenir la confidencialitat de l'estudi. Cada persona va rebre un codi que només el personal investigador de la unitat ha utilitzat per a l'anàlisi de dades i amb el qual no era possible conèixer la identitat de la persona que participava en l'estudi.

RESULTATS

1.- Característiques de la població d'estudi

La població d'estudi està constituïda per 70 embarassades, agrupades segons IMC pregestacional i augment de pes durant l'embaràs en un grup de 25 dones amb embarassos normals (Control), un grup de 20 dones amb obesitat pregestacional (OBPre) i un grup de 25 dones que presenten augment de pes excessiu durant la gestació, aquí anomenades obeses gestacionals (OBGest) (*taula 1*).

Entre els 3 grups d'estudi no hi ha diferències estadísticament significatives pel que fa a edat materna, sexe del nadó ni setmanes de gestació al moment del part. Tampoc hi ha diferències significatives en els valors que es relacionen amb la tolerància a la glucosa com el valor del test d'O'Sullivan, cal considerar que són grups purs en els que s'han exclòs les pacients diabètiques.

Pel que fa a altres paràmetres materns, hi ha clares diferències significatives tant en l'IMC pregestacional com en l'augment de pes durant la gestació, característiques que categoritzen els grups. Així mateix, hi ha diferències significatives en paràmetres relacionats amb l'obesitat com l'adiponectina d'alt pes molecular, que està significativament disminuïda en el grup OBPre com esperàvem, però no en les obeses gestacionals. Per contra, la HbA1c, la insulina, l'HOMA-IR així com els triglicèrids i el pèptid-C es troben augmentats en ambdós grups de gestants obeses, però només de forma significativa en el grup OBPre.

Entre els paràmetres de creixement neonatal només el pes al naixement està augmentat significativament en els dos grups d'estudi. Ni el pes ni l'augment de pes del nadó durant el primer any de vida presenten canvis en funció del grup. Cal tenir en compte que per a l'estudi s'han seleccionat només els nadons amb pes al néixer adequat segons edat gestacional. El rang de pesos dels nadons d'estudi són: del grup control entre 3020 i 3680 grams, del grup OBPre entre 2740 i 4070 grams i del grup OBGest entre 2540 i 4300 grams.

	Control n=25	OBPre n= 20	OBGest n= 25	valor p
Mare				
Edat (anys)	30.62 ± 1.01	31.64 ± 1.06	29.66 ± 0.92	ns
IMC pregestacional (Kg/m ²)	22.4 ± 0.2	29.7 ± 0.2 ^{b,d}	21.6 ± 0.3	<0.0001
IMC 1r trimestre (Kg/m ²)	23.04 ± 0.33	29.41 ± 0.73 ^{b,d}	23.25 ± 0.43	<0.0001
IMC 2n trimestre (Kg/m ²)	25.04 ± 0.38	30.87 ± 0.65 ^{b,d}	26.49 ± 0.35 ^a	<0.0001
IMC 3r trimestre (Kg/m ²)	26.71 ± 0.37	32.37 ± 0.61 ^{b,d}	29.20 ± 0.48 ^b	<0.0001
IMC al part (Kg/m ²)	27.0 ± 0.3	32.7 ± 0.7 ^{b,d}	29.8 ± 0.4 ^b	<0.0001
Augment de pes (Kg)	12.20 ± 0.51	7.91 ± 0.51 ^{b,d}	21.76 ± 1.10 ^b	<0.0001
Glucosa basal (mg/dL)	77.73 ± 0.95	83.95 ± 1.64 ^{b,c}	79.31 ± 1.32	0.006
Test O'Sullivan (mg/dL)	125.62 ± 5.86	131.55 ± 6.65	116.81 ± 6.22	ns
HbA1c (%)	4.87 ± 0.05	5.06 ± 0.07 ^a	5.02 ± 0.07	ns
Insulina (mIU/L)	4.76 ± 1.18	8.37 ± 1.57 ^a	6.27 ± 0.87	ns
HOMA-IR	0.93 ± 0.23	1.75 ± 0.32 ^a	1.25 ± 0.18	ns
Pèptid-C (ng/mL)	1.37 ± 0.09	2.24 ± 0.18 ^{b,c}	1.80 ± 0.12 ^b	<0.0001
TG (mg/dL)	142.46 ± 7.17	195.77 ± 13.94 ^b	170.48 ± 18.22	0.04
HDL-c (mg/dL)	71.81 ± 1.95	70.09 ± 2.55	71.24 ± 2.85	ns
Adiponectina-APM (mg/dL)	7.02 ± 0.52	5.08 ± 0.65 ^a	6.63 ± 0.83	ns
Nadó i placenta				
Sexe (% femení)	42.3%	45.5%	46.7%	ns
Edat gestacional (setm)	39.77 ± 0.16	39.95 ± 0.22	40.03 ± 0.24	ns
Pes naixement (g)	3272.12 ± 36.92	3441.14 ± 65.53 ^a	3506.90 ± 76.7 ^b	0.02
Pes naixement SDS	-0.07 ± 0.11	0.28 ± 0.17 ^a	0.54 ± 0.17 ^b	0.01
Longitud naixement (cm)	49.26 ± 0.25	50.22 ± 0.43	50.06 ± 0.38	ns
Longitud naixement SDS	-0.35 ± 0.15	0.13 ± 0.27	0.13 ± 0.21	ns
Pes placenta (g)	576.15 ± 16.70	650.00 ± 20.09 ^a	639.29 ± 30.72	ns
Pes 1 m. de vida (kg)	4.32 ± 0.09	4.27 ± 0.10	4.44 ± 0.09	ns
Δ pes 1 m. (kg)	1.05 ± 0.08	0.81 ± 0.08	0.88 ± 0.08	ns
Δ pes 1m SDS (z-score)	0.40 ± 0.17	-0.09 ± 0.19	-0.01 ± 0.15	ns
Pes 4 m. de vida (kg)	6.79 ± 0.13	6.72 ± 0.15	7.14 ± 0.21	ns
Δ pes 4 m. (kg)	3.52 ± 0.14	3.24 ± 0.13	3.57 ± 0.24	ns
Δ pes 4 m. SDS (z-score)	0.16 ± 0.22	-0.28 ± 0.18	0.02 ± 0.42	ns
Pes als 6 m. de vida (kg)	7.86 ± 0.16	7.74 ± 0.22	7.94 ± 0.14	ns
Δ de pes 6 m. (kg)	4.59 ± 0.16	4.31 ± 0.17	4.43 ± 0.13	ns
Δ pes 6 m. SDS (z-score)	0.17 ± 0.22	-0.18 ± 0.17	-0.22 ± 0.20	ns
Pes als 12 m. de vida (kg)	9.92 ± 0.22	9.67 ± 0.30	9.84 ± 0.18	ns
Δ de pes 12 m. (kg)	6.67 ± 0.23	6.23 ± 0.25	6.32 ± 0.16	ns
Δ pes 12 m. SDS (z-score)	0.25 ± 0.24	-0.26 ± 0.17	-0.42 ± 0.18	ns

Taula1. Característiques de la població d'estudi. Les dades es mostren com a mitjana ± SEM. IMC: índex de massa corporal; HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: model homeostàtic per a l'avaluació de la resistència a la insulina. TG: triglicèrids. HDL-c: colesterol-lipoproteïna d'alta densitat. Adiponectina-APM: adiponectina d'alt pes molecular. Δ:augment. Ns: no significatiu. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a p ≤ 0.05 i ^b p ≤ 0.005 vs grup control; ^c p ≤ 0.05 i ^d p ≤ 0.005 vs les dones OBGest.

2.- MicroRNAs circulants en obesitat pregestacional i gestacional

2.1. Identificació del perfil dels microRNAs en plasma

Dels 723 microRNAs humans presents a l'array utilitzat: TLDA (*TaqMan® Arrays* microRNA humà) es va detectar la presència de 248 microRNAs en plasma de gestants en segon trimestre d'embaràs.

Es van detectar 174 microRNAs compartits pels tres grups d'estudi (Control, OBPre i OBGest). En plasma de dones gestants del grup Control es van detectar 207 microRNAs (83.47%), dels quals 8 eren específics d'aquest grup: miR-33a, miR-138, miR-205, miR-214, miR-211, miR-381, miR-519b, miR-543. Es van detectar 201 microRNAs (81.04%) en el plasma de gestants OBPre, dels quals 13 eren específics d'aquest grup: miR-15a, miR-23a, miR-107, miR-212, miR-213, miR-337, miR-338-3p, miR-424, miR-452, miR-518d, miR-551b, miR-618, miR-639. Finalment, es van detectar 218 microRNAs (89,90%) en el plasma de gestants OBGest, dels quals 23 eren específics del grup: miR-9, miR-18a, miR-19b, miR-20a, miR-22, miR-24-2, miR-26a, miR-26b, miR-27a, miR-136, miR-144, miR-191, miR-195, miR-302a, miR-330, miR-372, miR-454, miR-520d-3p, miR-520g, miR-522, miR-550, miR-572, miR-636 (*figura 43*).

Dels 174 microRNAs compartits pels tres grups, 18 microRNAs mostraven una expressió augmentada o disminuïda almenys 2 vegades en plasma de OBPre i OBGest comparat amb el grup control ($p < 0.05$). Aquests 18 microRNAs van ser elegits com a candidats per estar diferencialment regulats en l'obesitat materna i es van validar en tota la població d'estudi (*taula 2*).

2.2. Validació de microRNAs plasmàtics diferencials en l'obesitat materna

Aquests 18 microRNAs van ser elegits com a candidats per ser microRNAs diferencialment regulats per l'obesitat materna i van ser validats per RT-PCR en una població més àmplia que consta de 70 dones embarassades (25 Control, 20 OBPre i 25 OBGest) (*taula 2*).

13 del 18 microRNAs van ser validats com a expressats de forma diferencial entre les dones control i les dones OBPre i OBGest. Entre ells, els miR-29c ($p = 0.01$), miR-99b ($p = 0.008$), miR-103 ($p < 0.0001$), miR-221 ($p = 0.001$), miR-340 ($p = 0.01$) es trobaven disminuïts, i els miR-30a-5p ($p = 0.007$), miR-130 ($p = 0.02$) i miR-150 ($p = 0.004$) es trobaven incrementats en el grup OBGest en comparació amb el grup Control. Els miR-122 ($p = 0.017$ i $p = 0.03$), miR-324-3p ($p = 0.002$ i $p < 0.0001$), miR-375 ($p = 0.007$ i $p = 0.04$) i miR-652 ($p = 0.04$ i $p < 0.0001$) es trobaven disminuïts i el miR-625 ($p = 0.009$ i $p = 0.04$) es trobava incrementat tant en el grup PreOB com en grup GestOB en comparació amb el grup Control. Les gestants del grup PreOB van mostrar nivells de miR-221 ($p = 0.02$) augmentats i nivells de miR-130 ($p = 0.01$) disminuïts en comparació amb el grup OBGest (taula 2, figura 44).

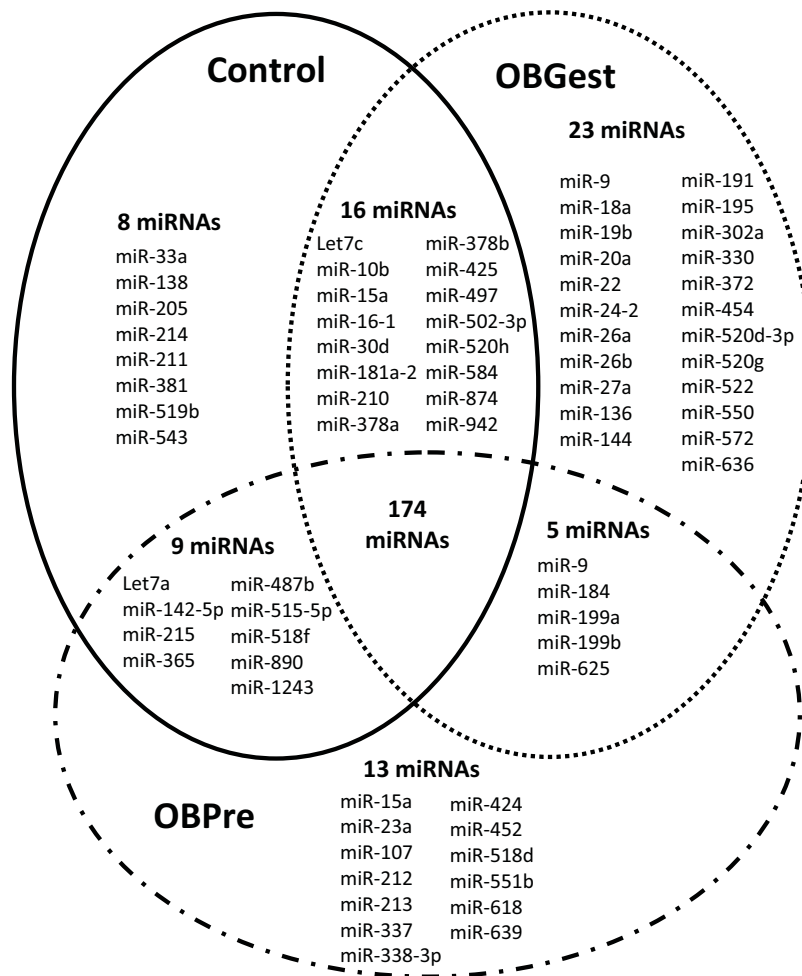


Figura 43. Diagrama de Venn, on es mostren els microRNAs expressats en plasma del segon trimestre de gestació dels diferents grups d'estudi. OBPre: obesitat pregestacional; OBGest: obesitat gestacional; C: Control.

	Control n=25	OBPre n=20	OBGest n=25	valor p
microRNA				
miR-29c	1.04 ± 0.06	0.89 ± 0.06	0.79 ± 0.06^b	0.05
miR-30a-5p	2.86 ± 0.40	3.82 ± 0.81	5.40 ± 1.08^b	0.02
miR-99b	0.53 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.37 ± 0.03^b	0.05
miR-103	1.66 ± 0.10	1.38 ± 0.17	1.01 ± 0.08^c	0.002
miR-122	1.26 ± 0.29	0.61 ± 0.11^b	0.87 ± 0.26^a	0.02
miR-128a	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.01	ns
miR-130a	0.68 ± 0.06	0.63 ± 0.08^d	1.11 ± 0.12^a	0.02
miR-150	3.81 ± 0.48	5.61 ± 1.23	6.68 ± 0.86^b	0.01
miR-193b	0.20 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.22 ± 0.04	ns
miR-221	5.13 ± 0.51	5.53 ± 0.92^d	3.11 ± 0.34^c	0.007
miR-324-3p	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.01^b	0.07 ± 0.01^c	<0.0001
miR-340	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01^b	0.05
miR-370	0.69 ± 0.15	0.48 ± 0.09	0.48 ± 0.09	ns
miR-375	0.25 ± 0.05	0.12 ± 0.02^b	0.16 ± 0.02^a	0.005
miR-423-5p	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.27 ± 0.03	ns
miR-625	0.23 ± 0.03	0.42 ± 0.07^b	0.30 ± 0.03^a	0.002
miR-652	0.63 ± 0.05	0.53 ± 0.08^a	0.37 ± 0.06^c	0.001
miR-885-5p	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.23 ± 0.03	Ns

Taula 2. Expressió relativa dels microRNAs expressats en plasma matern durant el segon trimestre de gestació. Els valors de microRNA s'expressen com a expressió relativa (2- Δ CT). En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius ^a p≤0.05, ^b p≤0.01 i ^c p≤0.001 vs grup control; ^dp≤0.01 OBPre vs OBGest

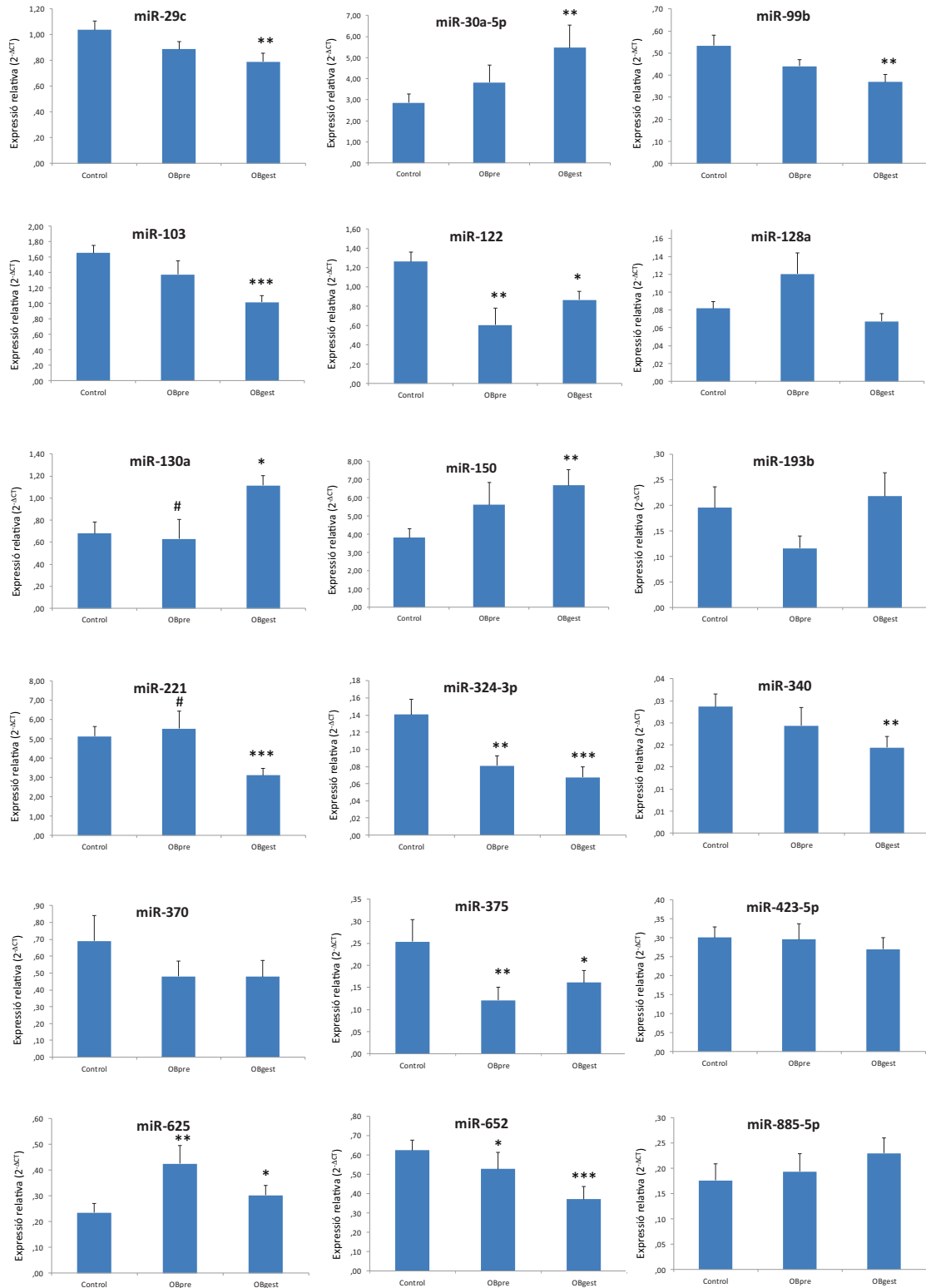


Figura 44. Gràfics de barres on es mostra l'expressió relativa dels microRNAs expressats en plasma matern durant el segon trimestre de gestació. OBPre: obesitat pregestacional; OBgest: obesitat gestacional; Control.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ i *** $p \leq 0.001$ vs control; # $p \leq 0.02$ vs OBPre.

En les anàlisis de corba ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), es va observar que el miR-375 tenia una bona precisió discriminatòria per a l'obesitat pregestacional (AUC: àrea sota la corba de 0.76). Al seu torn, el miR-103 (AUC = 0.77). El miR-130a (AUC = 0.75), el miR-324-3p (AUC = 0.76) i el miR-652 (AUC = 0.81) van mostrar una bona precisió discriminatòria per a l'obesitat gestacional; i el miR-30-5p (AUC = 0.74) i el miR-221 (AUC = 0.73) van tenir una precisió discriminatòria acceptable per a l'obesitat gestacional (136) (figura 45).

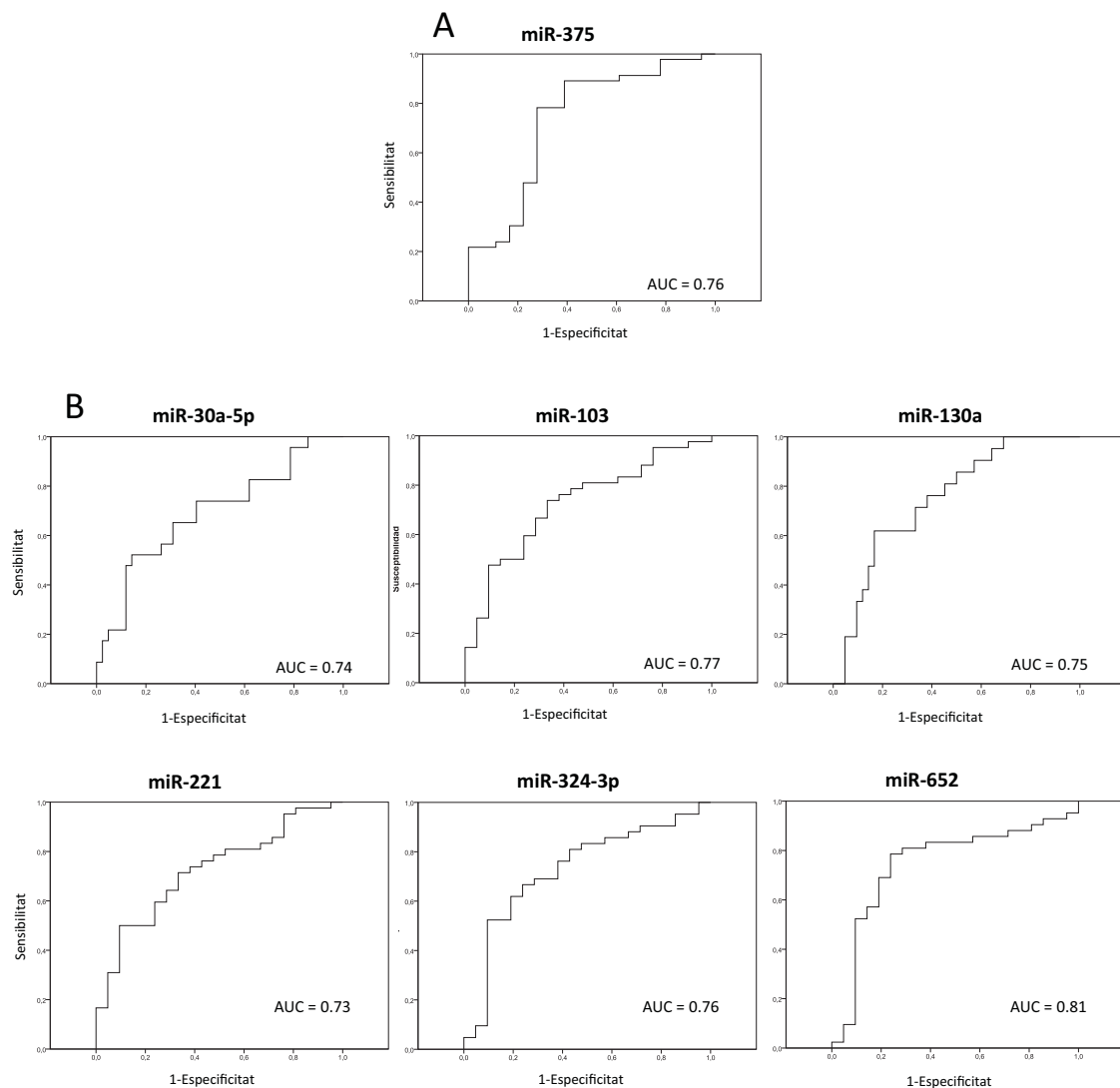


Figura 45. Corbes ROC per a la precisió discriminatòria dels microRNAs en plasma matern durant el segon trimestre de gestació. A) Obesitat Gestacional. B) Obesitat Pregestacional. miR-375, en obesitat gestacional; i miR-103, miR-130, miR-324-3p i miR-652, en obesitat pregestacional, presenten una bona precisió discriminatòria, amb una AUC (àrea sota la corba) superior al 75%. miR-30-5p i miR-221 presenten una acceptable precisió discriminatòria per a obesitat gestacional, amb una AUC entre 70 i 75%.

2.3. Associació de microRNAs plasmàtics amb paràmetres metabòlics materns

Les concentracions plasmàtiques de quasi tots els microRNAs estudiats es van associar significativament amb l'augment de pes durant l'embaràs i amb diversos paràmetres metabòlics, incloent la tolerància a la glucosa, la sensibilitat de la insulina i la concentració de lípids sèrics.

microRNA	Augment de pes gestacional	Glucosa	HbA1c	HOMA-IR	Pèptid-C	TG	HDL-c
miR-29c	-0.198	-0.031	-0.005	-0.026	-0.202	-0.073	0.182
miR-30a-5p	0.341^b	0.038	0.242	-0.021	-0.004	0.100	-0.051
miR-99b	-0.261^a	-0.071	0.114	0.017	-0.138	0.083	0.032
miR-103	-0.367^b	-0.229	-0.164	-0.057	-0.197	-0.195	0.126
miR-122	-0.118	-0.156	0.081	-0.344^b	-0.327^b	-0.275^a	0.250^a
miR-128-a	-0.375^b	-0.085	-0.045	0.023	0.080	-0.054	0.138
miR-130a	0.408^c	-0.097	0.148	-0.081	-0.028	0.055	-0.081
miR-150	0.262^a	0.124	0.091	0.048	0.123	0.229	-0.092
miR-193b	0.069	-0.052	-0.027	-0.178	-0.242	-0.209	0.118
miR-221	-0.383^b	-0.251^a	-0.272^a	0.018	-0.053	-0.169	0.034
miR-324-3p	-0.299^b	-0.011	-0.061	-0.196	-0.277^a	-0.254^a	0.265^a
miR-340	-0.160	-0.303^b	-0.407^c	0.023	-0.166	-0.165	0.031
miR-370	-0.155	-0.136	-0.056	-0.172	-0.175	-0.150	-0.039
miR-375	-0.003	-0.152	-0.062	-0.336^b	-0.413^c	-0.332^b	0.251^a
miR-423-5p	-0.152	-0.273^a	-0.118	-0.266^a	-0.167	-0.154	0.074
miR-625	-0.012	-0.058	-0.022	-0.027	-0.030	0.087	0.023
miR-652	-0.317^b	-0.252^a	-0.317^b	-0.159	-0.299^b	-0.295^b	0.201
miR-885-5p	0.170	-0.038	0.148	-0.185	-0.084	-0.052	0.112

Taula 3. Correlacions entre l'expressió relativa dels microRNA i els paràmetres endocrinometabòlics materns. Dades obtingudes per anàlisi de correlació de Pearson. HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: model homeostàtic per a l'avaluació de la resistència a la insulina TG: triglicèrids. HDL-c: colesterol-lipoproteïna d'alta densitat. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a $p \leq 0.05$; ^b $p \leq 0.01$; ^c $p \leq 0.001$ vs Control.

El miR-30-5p ($r = 0.341$, $p = 0.005$), el miR-130a ($r = 0.408$, $p = 0.001$) i el miR-150 ($r = 0.262$, $p = 0.03$) es van associar significativament amb un major guany de pes durant l'embaràs; mentre que el miR-99b ($r = -0.261$, $p = 0.03$), el miR-103 ($r = -0.367$, $p = 0.003$), el miR-128 ($r = -0.375$, $p = 0.002$), el miR-221 ($r = -0.383$, $p = 0.002$), el miR-324-3p ($r = -0.299$, $p = 0.01$) i miR-652 ($r = -0.317$, $p = 0.01$) es van associar significativament amb un menor augment de pes durant l'embaràs (taula 3) (Figura 46). Tots ells, a excepció del miR-150, es van mantenir significativament associats amb l'augment de pes durant l'embaràs en l'anàlisi de regressió múltiple ajustat per

variables de confusió, incloent-hi sexe del nadó, edat materna, l'IMC pregestacional, HOMA-IR i lípids (*taula 4*).

Nivells disminuïts de miR-221 ($r = -0.251, p = 0.04$ i $r = -0.272, p = 0.02$), miR-340 ($r = -0.303, p = 0.01$ i $r = -0.407, p = 0.001$) i miR-652 ($r = -0.252, p = 0.04$ i $r = -0.317, p = 0.01$) es van associar amb intolerància a la glucosa, incloent-hi nivells alts de glucosa i HbA1c respectivament (*taula 3 i figura 47*). Nivells disminuïts de miR-122 ($r = -0.344, p = 0.005$ i $r = -0.327, p = 0.008$) i de miR-375 ($r = -0.336, p = 0.006$ i $r = -0.413, p = 0.001$) es van associar amb una menor sensibilitat a la insulina, que es mostra com a HOMA-IR i pèptid-C més alts. Nivells disminuïts de miR-122 ($r = -0.275, p = 0.02$ i $r = -0.250, p = 0.05$), de miR-324-3p ($r = -0.254, p = 0.04$ i $r = -0.265, p = 0.03$), i de miR-375 ($r = -0.332, p = 0.007$ i $r = -0.251, p = 0.02$), es van associar amb una major concentració de triglicèrids i una menor concentració de HDL-c (*taula 3 i figura 48*). La majoria d'aquestes associacions van romandre significatives en l'anàlisi de regressió múltiple ajustada per variables de confusió incloent-hi sexe del nadó, edat materna, l'IMC pregestacional, HOMA-IR i lípids (*taula 4*).

	Δ de pes gestacional		Glucosa		HbA1c		HOMA-IR		Pèptid-C		TG	
	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>
miR-30a-5p	0.234	0.01	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.688	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.315	0.001	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.544											
miR-99b	-0.283	0.001	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.761	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.321	0.001	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.586											
miR-103	-0.264	0.003	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.711	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.284	0.002	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.574											
miR-122	--	--	--	--	--	--	-0.269	0.01	-0.242	0.02	-0.267	0.03
IMC pregestacional	--	--	--	--	--	--	0.587	0.000	0.691	0.000	--	--
Guany de pes	--	--	--	--	--	--	0.408	0.006	0.361	0.01	--	--
R ² ajustat							0.314		0.381		0.071	
miR-128-a	-0.196	0.03	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.695	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.298	0.002	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.541											
miR-130a	0.211	0.02	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.682	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.306	0.002	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.546											
miR-221	-0.203	0.02	-0.358	0.003	-0.290	0.02	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.693	0.000	0.457	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.297	0.002	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.544		0.249		0.084							
miR-324-3p	-0.244	0.007	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	-0.733	0.000	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HOMA-IR	0.258	0.007	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.563											
miR-340	--	--	-0.315	0.007	-0.461	0.000	--	--	--	--	--	--
IMC pregestacional	--	--	0.362	0.002	--	--	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat			0.226		0.213							
miR-375	--	--	--	--	--	--	-0.199	0.05	-0.252	0.02	-0.348	0.005
IMC pregestacional	--	--	--	--	--	--	0.553	0.001	0.627	0.000	--	--
Guany de pes	--	--	--	--	--	--	0.416	0.007	0.344	0.01	--	--
R ² ajustat							0.280		0.381		0.121	
miR-423-5p	--	--	-0.316	0.007	--	--	-0.244	0.02	--	--	--	--
IMC pregestacional	--	--	0.383	0.001	--	--	0.634	0.000	--	--	--	--
Guany de pes	--	--	--	--	--	--	0.433	0.004	--	--	--	--
R ² ajustat			0.229				0.303					
miR-652	-0.182	0.04	-0.312	0.008	-0.364	0.003	--	--	-0.287	0.01	--	--
IMC pregestacional	-0.715	0.000	0.400	0.001	--	--	--	--	0.704	0.000	--	--
HOMA-IR	0.271	0.006	--	--	--	--	--	--	0.301	0.03	--	--
R ² ajustat	0.537		0.226		0.132				0.396			

Taula 4. Anàlisi de regressió multivariant dels paràmetres endocrinometabòlics materns com a variable dependent en totes les dones embarassades de l'estudi. Dades obtingudes per anàlisi de regressió múltiple esglaonada. HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: model homeostàtic per a l'avaluació de la resistència a la insulina TG: triglicèrids. HDL-c: HDL colesterol. Variables no predictores: sexe del nadó, edat materna, l'IMC pregestacional, HOMA-IR i lípids

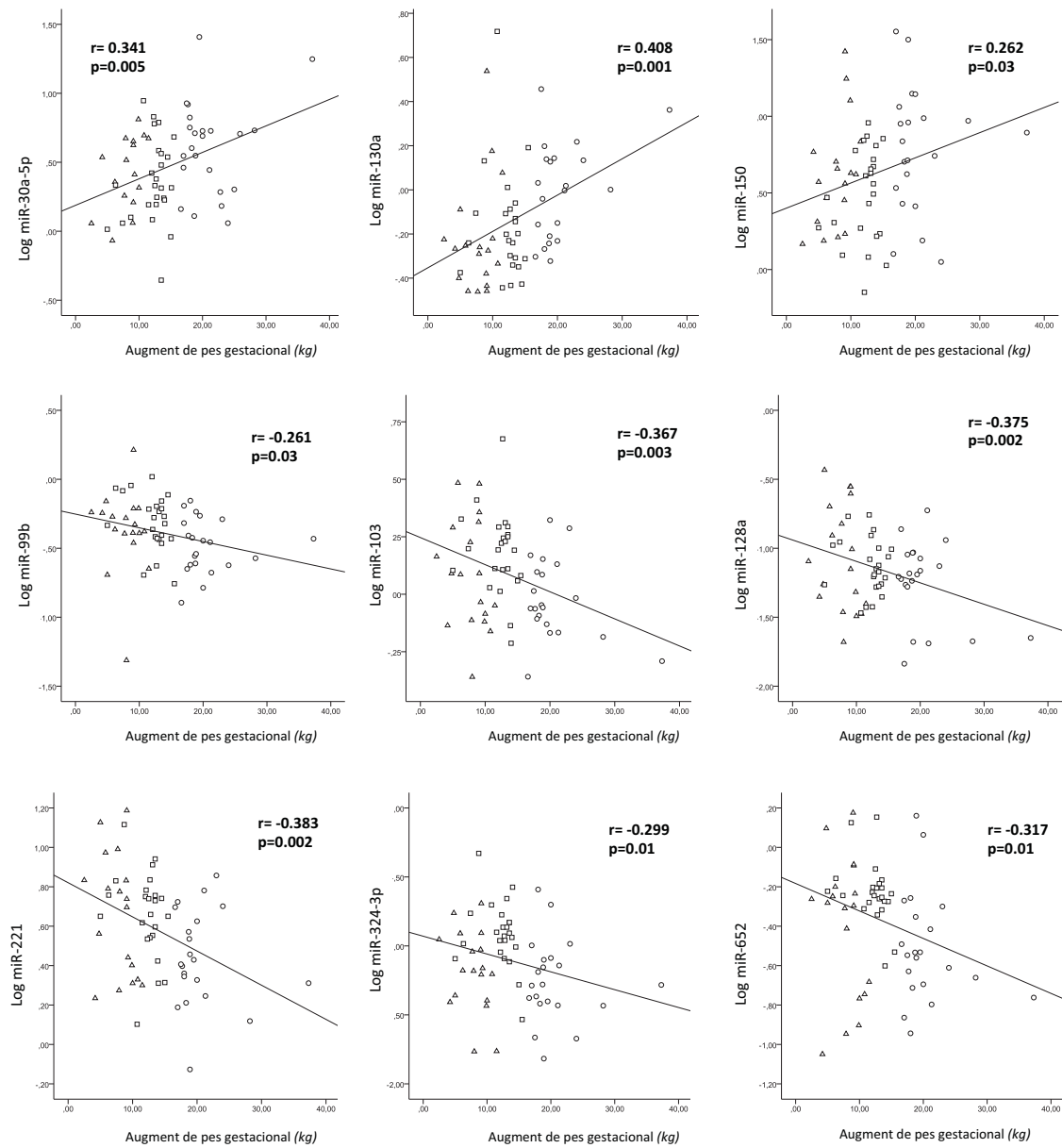


Figura 46. Gràfics de dispersió del guany de pes durant la gestació amb els microRNAs seleccionats expressats en plasma matern durant el segon trimestre. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

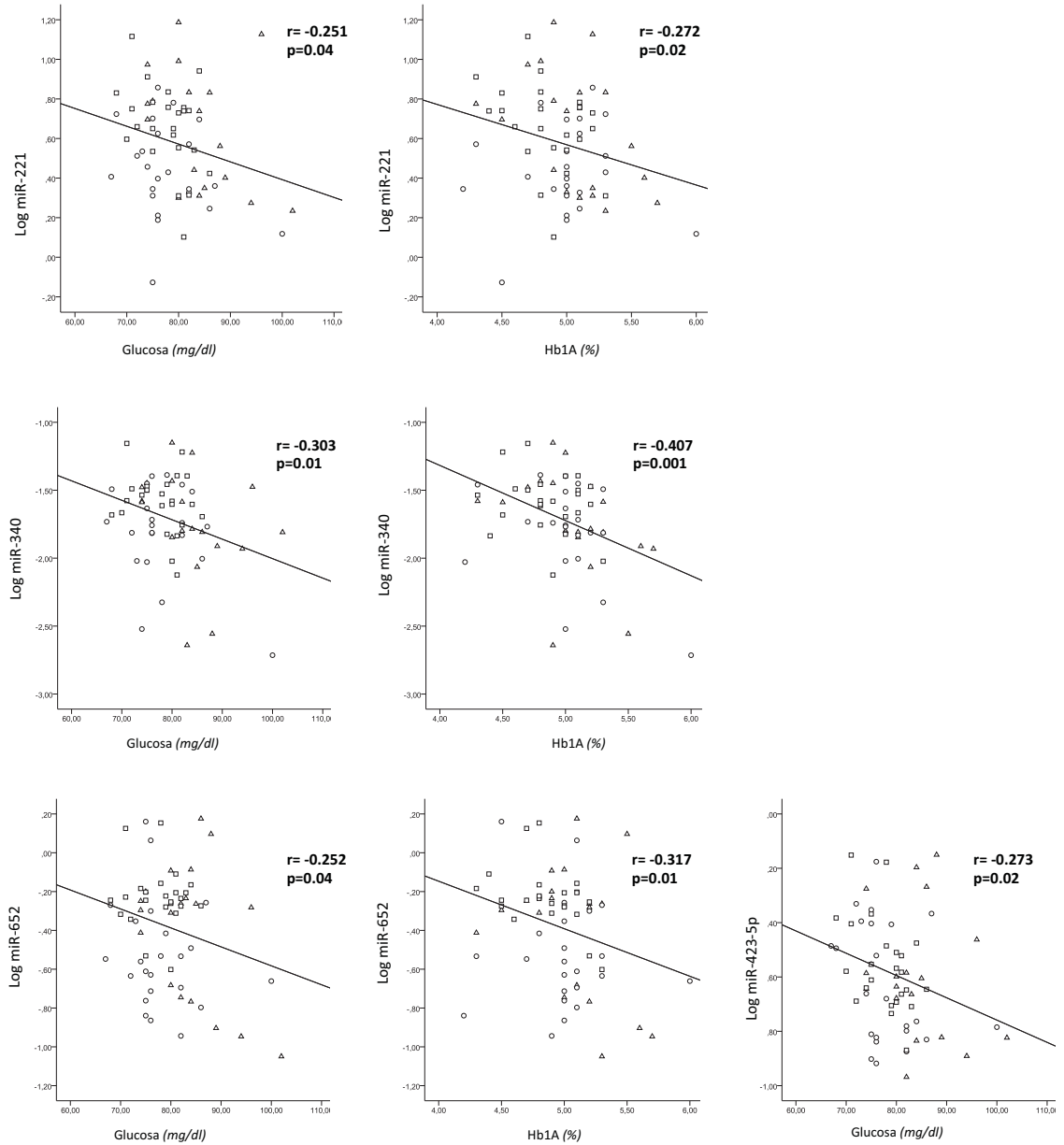


Figura 47. Gràfics de dispersió de la glucosa i de la HbA1c durant la gestació amb els microRNAs seleccionats expressats en plasma matern durant el segon trimestre. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen de l'anàlisi de Pearson.

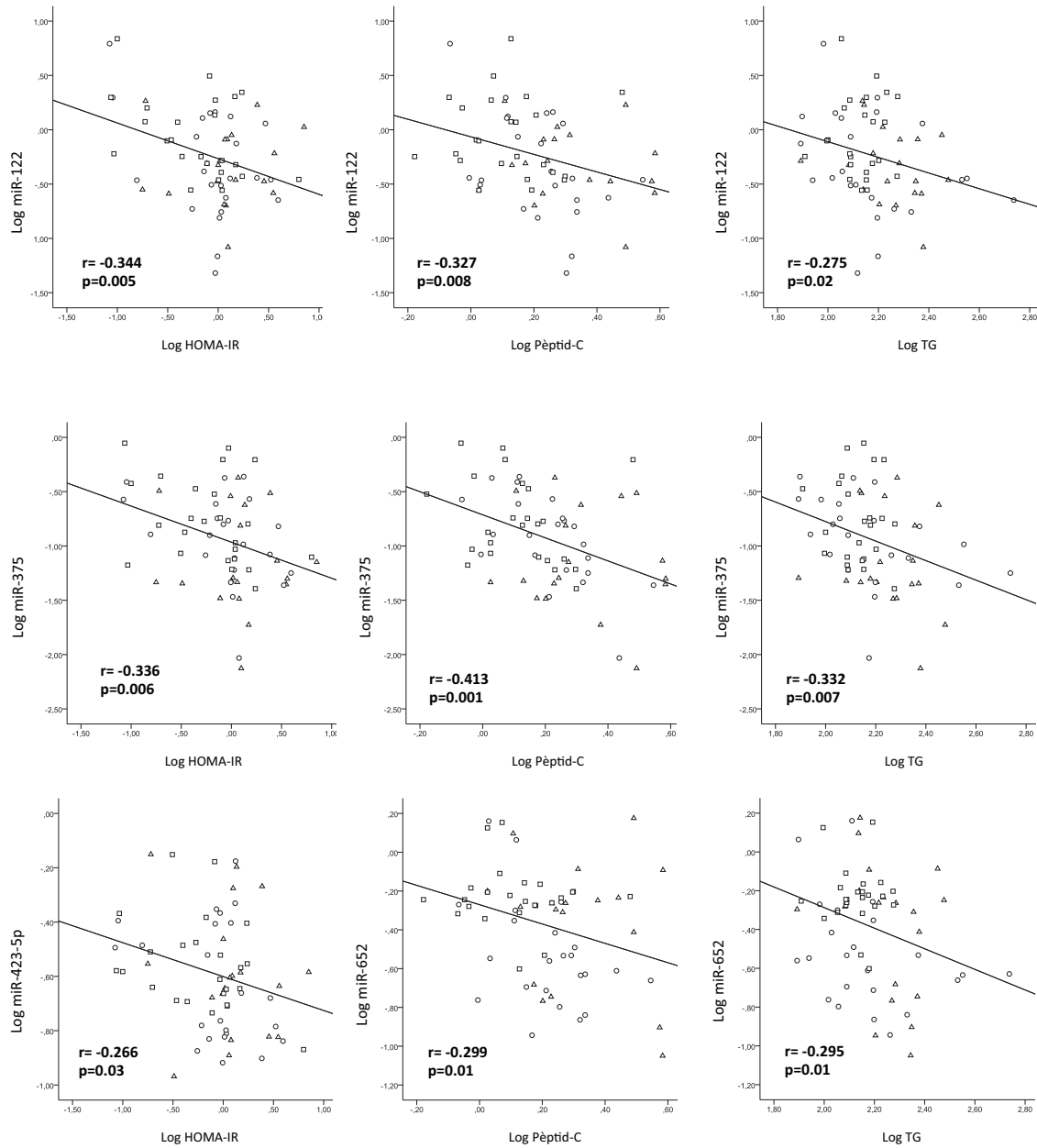


Figura 48. Gràfics de dispersió dels paràmetres metabòlics durant la gestació amb els microRNAs seleccionats expressats en plasma matern durant el segon trimestre. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen de l'anàlisi de Pearson.

2.4. Associació dels microRNAs plasmàtics amb paràmetres de creixement pre i postnatal

Les concentracions plasmàtiques d'una sèrie de microRNAs es van associar significativament amb paràmetres de creixement en el moment del part i fins als 12 mesos de vida (taula 5).

microRNA	Pes placenta	Pes naixement-SDS	Longitud naixement-SDS	Pes 1 mes [#]	Pes 4 mesos [#]	Pes 6 mesos [#]	Pes 12 mesos [#]
miR-29c	-0.117	-0.077	0.012	-0.219	-0.309^a	-0.419^b	-0.368^a
miR-30a-5p	-0.053	0.095	-0.044	0.023	-0.002	0.154	0.096
miR-99b	0.112	0.011	0.092	-0.036	-0.019	-0.069	0.053
miR-103	-0.055	-0.163	0.004	-0.156	-0.220	-0.238	-0.169
miR-122	-0.040	-0.163	0.002	0.014	-0.126	-0.089	-0.239
miR-128a	0.020	-0.069	0.014	-0.312^a	-0.296^a	-0.332^a	-0.315^a
miR-130a	-0.127	-0.126	-0.006	-0.017	-0.159	-0.160	-0.234
miR-150	0.088	0.189	0.126	0.104	0.092	-0.014	-0.189
miR-193b	0.168	0.039	0.099	-0.075	-0.169	-0.182	-0.231
miR-221	-0.006	-0.140	-0.162	-0.140	-0.230	-0.307^a	-0.127
miR-324-3p	-0.144	-0.125	0.008	-0.094	-0.111	-0.215	-0.156
miR-340	-0.245^a	-0.107	-0.218	0.041	-0.096	-0.173	0.113
miR-370	0.235	-0.031	0.025	0.020	0.132	0.094	0.144
miR-375	-0.051	-0.132	-0.064	0.078	-0.128	-0.180	-0.180
miR-423-5p	-0.122	-0.248^a	-0.081	-0.125	-0.210	-0.157	-0.240
miR-625	0.001	0.088	0.057	-0.033	-0.166	-0.113	-0.050
miR-652	-0.287^a	-0.267^a	-0.179	-0.095	-0.227	-0.246	-0.371^a
miR-885-5p	0.040	-0.064	0.036	-0.113	-0.170	-0.125	-0.273

Taula 5. Correlacions entre l'expressió relativa dels microRNA i paràmetres de creixement pre i postnatal. Dades obtingudes per anàlisi de correlació de Pearson. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a $p \leq 0.05$; ^b $p \leq 0.01$; ^c $p \leq 0.001$ vs Control. # n=60

Nivells disminuïts de miR-340 ($r = -0.245$, $p = 0.05$) i de miR-652 ($r = -0.287$, $p = 0.02$) es van associar a un major pes de la placenta. Nivells disminuïts de miR-423-5p ($r = -0.248$, $p = 0.04$) i de miR-652 ($r = -0.267$, $p = 0.03$) es van associar amb major pes al naixement (SDS) (taula 5 i figura 49).

En el seguiment dels nadons, nivells disminuïts de miR-29c es van associar a un major pes als 4 mesos ($r = -0.309$, $p = 0.03$), 6 mesos ($r = -0.419$, $p = 0.002$) i 12 mesos de vida ($r = -0.368$, $p = 0.05$). La disminució de nivells de miR-128a es va associar a l'augment de pes al primer mes ($r = -0.312$, $p = 0.02$), quart mes ($r = -0.296$, $p = 0.03$), sisè mes d'edat ($r = -0.332$, $p = 0.01$) i primer any de vida ($r = -0.315$, $p = 0.05$). La disminució del nivell de miR-221 es va associar a una disminució de pes als 6 mesos

d'edat ($r = -0.307$, $p = 0.007$). També miR-652 es va relacionar negativament amb el pes del primer any de vida ($r = -0.371$, $p = 0.002$) (taula 5 i figura 50).

En l'anàlisi de regressió múltiple ajustat per sexe del nadó, edat materna, l'IMC pregestacional, HOMA-IR i lípids, el miR-340 ($\beta = -0.270$, $p = 0.01$) i el miR-652 ($\beta = -0.274$, $p = 0.02$) van ser predictors independents del pes de la placenta i, juntament amb el pes al naixement, expliquen gairebé el 35% de la seva variància. Tant el miR-652 ($\beta = -0.288$, $p = 0.01$) com el miR-423-5p ($\beta = -0.269$, $p = 0.02$) van ser predictors independents de pes en néixer i, juntament amb l'edat gestacional, expliquen gairebé el 20% de la seva variància. En una anàlisi similar, miR-128 ($\beta = -0.474$, $p = 0.001$) i miR-221 ($\beta = -0.302$, $p = 0.05$) van ser predictors independents de pes als 6 mesos i, juntament amb el pes al naixement, expliquen el 29,3% i el 17,2 % de la seva variància, respectivament (taula 6).

	Pes placenta		Pes al naixement		Pes als 6 mesos [#]	
	β	p	β	p	β	p
miR-128a	--	--	--	--	-0.474	0.001
Pes néixer	--	--	--	--	-0.322	0.023
R ² ajustat					0.293	
miR-221	--	--	--	--	-0.302	0.05
Pes al néixer	--	--	--	--	0.414	0.006
R ² ajustat					0.172	
miR-340	-0.270	0.01	--	--	--	--
Pes al néixer	0.501	<0.0001	--	--	--	--
R ² ajustat	0.350					
miR-423-5p	--	--	-0.269	0.02	--	--
Edat gestacional	--	--	0.262	0.03	--	--
R ² ajustat			0.169			
miR-652	-0.274	0.02	-0.288	0.01	--	--
Edat gestacional	0.440	<0.0001	0.253	0.03	--	--
R ² ajustat	0.353		0.179			

Taula 6. Anàlisi de regressió multivariant amb els paràmetres de creixement pre i postnatal com a variables dependents en totes les dones embarassades de l'estudi. Dades obtingudes per anàlisis de regressió múltiple esglaonada. Variables no predictores: sexe del nadó, edat materna, l'IMC pregestacional, HOMA-IR i lípids. #=60

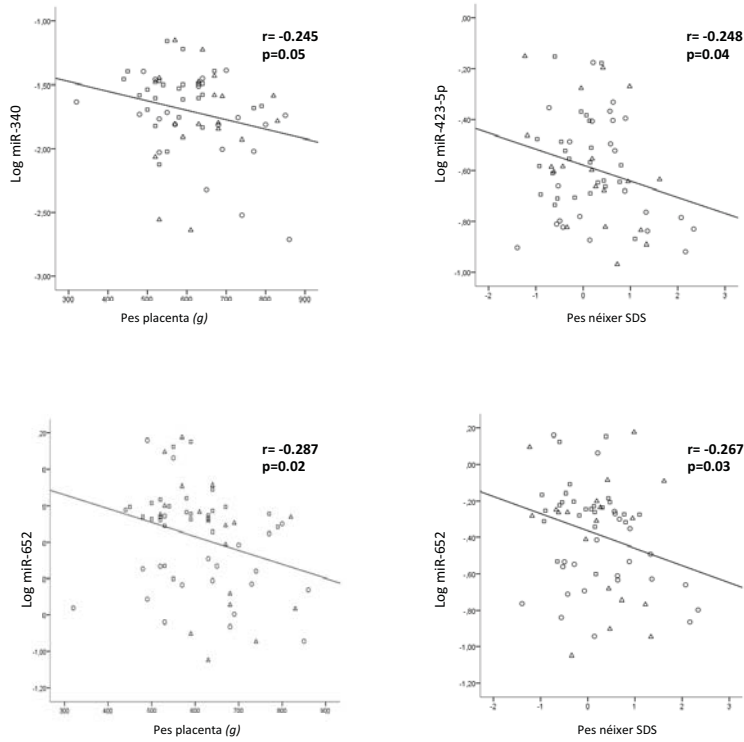


Figura 49. Gràfics de dispersió de paràmetres de creixement prenatal amb els microRNAs seleccionats expressats en plasma matern durant el segon trimestre. Triangles: (OBPre) obesitat pregestacional; cercles: (OBGest) obesitat gestacional; quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

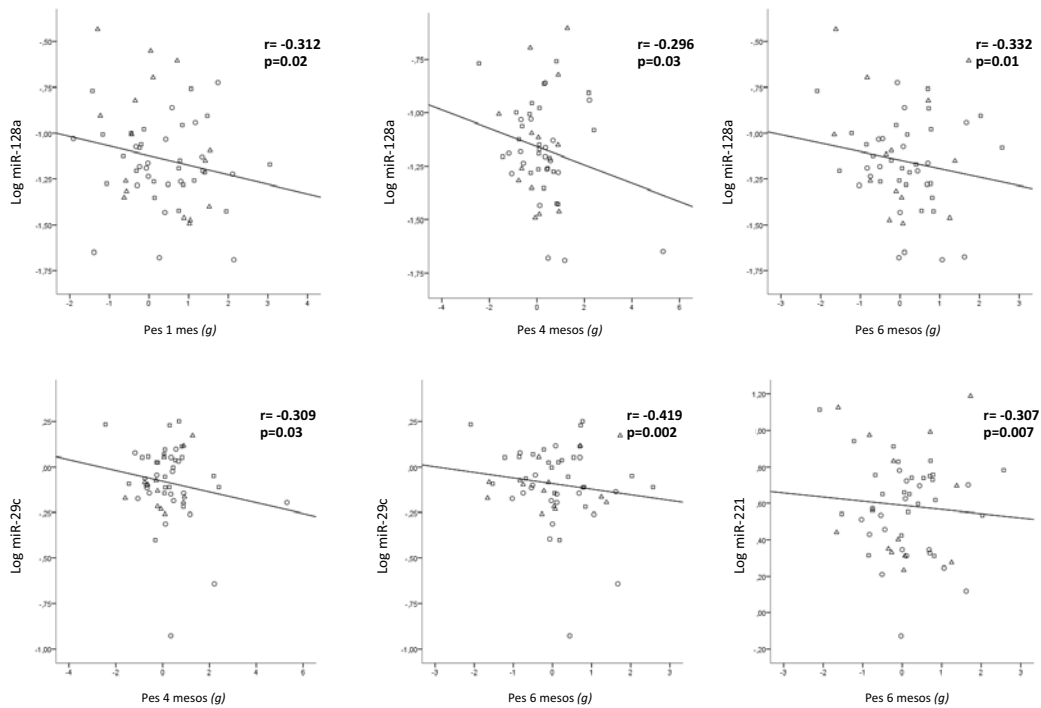


Figura 50. Gràfics de dispersió dels paràmetres de creixement postnatal amb els microRNAs seleccionats expressats en plasma matern durant el segon trimestre. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

2.5. Anàlisi *in silico* de vies metabòliques relacionades amb els microRNAs plasmàtics associats al creixement pre i postnatal

Donada l'associació de miR-128a, miR-221, miR-340, miR-423-5p i miR-652 amb paràmetres de creixement, es va realitzar una anàlisi *in silico* per determinar quins són els seus gens diana, i a quines vies metabòliques estan associats. El programa informàtic miRSystem va indicar que, amb exclusió de les vies del càncer, aquests cinc microRNAs comparteixen gens diana relacionats amb les rutes WNT, MAPK, mTOR i les vies de la insulina (taula 7).

Tots 5 microRNAs convergeixen en dues vies: la integració del metabolisme energètic i la regulació de la secreció d'insulina.

Database	Via	Gens (total de gens de la via)	-ln (valor p)
miR-128a			
Pathway Interaction	IGF1-Pathway	8 (29)	10.88
Reactome	IRS-mediated-signaling	12 (81)	8.97
Reactome	Signaling by Insulin Receptor	14 (109)	8.69
KEGG	mTOR signaling pathway	9 (52)	8,24
KEGG	Insulin Signaling Pathway	15 (137)	7.54
miR-221			
KEGG	WNT Signaling pathway	11 (150)	8,19
Reactome	Regulation of insulin secretion	7 (98)	5,60
Reactome	Integration of energy metabolism	8 (125)	5,57
Biocarta	Biocarta MAPK pathway	6 (87)	4,84
KEGG	Type II Diabetes mellitus	4 (47)	4,25
miR-340			
KEGG	WNT signaling pathway	11 (150)	7,42
KEGG	MAPK signaling	115 (272)	6,69
Pathway Interaction	mTOR signaling pathway	7 (68)	7,04
Pathway interaction	Insulin pathway	5 (44)	5,82
miR-423-5p			
KEGG	MAPK signaling	5 (272)	5,27
KEGG	Insulin signaling pathway	2 (137)	2,35
miR-652			
Pathway Interaction	Insulin mediated glucosa transport	1 (29)	4
Pathway Interaction	mTOR signaling pathway	1 (68)	4
Reactome	Regulation insulin secretion	1 (98)	2,83
Reactome	Integration of energy metabolism	1 (125)	2,6
Reactome	Diabetes Pathway	1 (229)	2,06

Taula 7. Rutes metabòliques que contenen els gens diana dels microRNAs expressats en plasma matern en segon trimestre de gestació associats amb paràmetres de creixement pre i postnatal. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

3.- MicroRNAs placentaris en obesitat pregestacional i gestacional

3.1. Identificació del perfil dels microRNAs en placenta

Dels 723 microRNAs humans detectats per TLDAS (*TaqMan® Arrays microRNA* humà) 486 microRNAs es van expressar en les placentes humanes d'aquest estudi.

Es van detectar 404 microRNAs en tots els grups d'estudi (Control, OBPre i OBGest). 445 microRNAs (91.56%) es van expressar en les placentes del grup de mares Control, dels quals 14 s'expressaven específicament en aquest grup: miR-16-1-3p, miR-92b-5p, miR-208-3p, miR-325, miR-513-5p, miR-567, miR-577, miR-581, miR-582-5p, miR-648, miR-653-5p, miR-887-3p, miR-1225-3p, miR-1226-5p. 444 microRNAs (91.36%) es van expressar en les placentes de dones OBPre, dels quals 13 es van expressar específicament en aquest grup de placentes: miR-26a-2-3p, miR-144-3p, miR-188-3p, miR-200b-5p, miR-298, miR-302d-3p, miR-380-3p, miR-488-5p, miR-557, miR-626, miR-672, miR-1292-5p i miR-1826 I finalment, 445 microRNAs (91.56%) es van expressar en placentes de dones amb OBGest, dels quals 15 es van expressar específicament en les placentes d'aquest grup: miR-124-5p, miR-139-3p, miR-149-3p, miR-194-3p, miR-367-5p, miR-541-5p, miR-548d-3p, miR-586, miR-590-3p, miR-609, miR-633, miR-658, miR-659-3p, miR-891b, miR-1227-3p (*figura 51*).

Entre els 404 microRNAs detectats en tots els grups estudiats, ens vam centrar en els 18 que mostraven una expressió augmentada o disminuïda almenys 2 vegades en plasma de dones OBPre i OBGest comparat amb el grup de dones control ($p < 0.05$): miR-23b-3p, miR-27a-5p, miR-29b-3p, miR-100-3p, miR-181a-3p, miR-185-5p, miR-191-3p, miR-214-3p, miR-296-5p, miR-337-5p, miR-339-5p, miR-365a-3p, miR-483-3p, miR-487a-3p, miR-520h, miR-1269a, el miR-1271-5p, miR-1285-3p.

3.2. Validació de microRNAs placentaris diferencials en l'obesitat materna

Aquests 18 microRNAs van ser elegits com a candidats per ser microRNAs diferencialment regulats per l'obesitat materna i van ser validats per RT-PCR en una

població més àmplia que consta de 70 dones embarassades (25 dones Control, 20 dones OBPre i 25 dones OBGest)(taula 8).

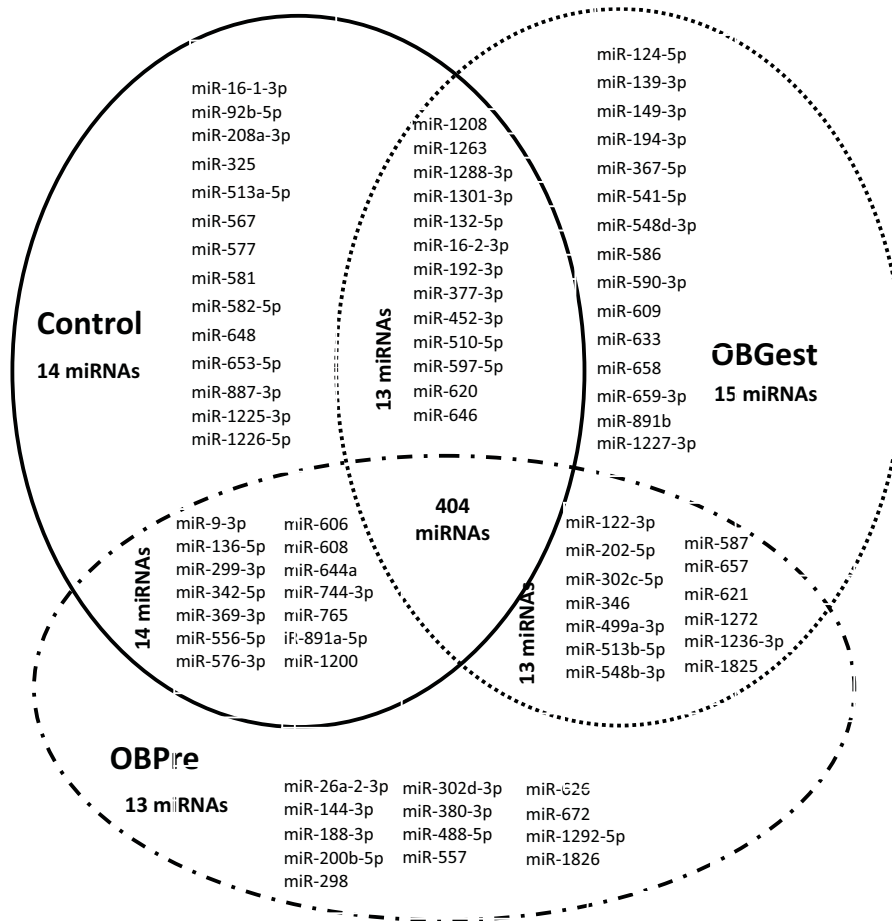


Figura 51. Diagrama de Venn, on es mostren els microRNAs expressats en placenta dels diferents grups d'estudi. OBPre: obesitat pregestacional; OBGest: obesitat gestacional; Control.

8 dels 18 microRNAs van ser validats com a expressats de forma diferencial entre les dones Control i les dones amb OBPre i OBGest. Entre ells, els miR-100-3p, miR-185-5p i miR-487a-3p estaven disminuïts en el grup OBGest en comparació amb el grup Control; i els miR-181, miR-214-3p, miR-296-5p, miR-1269a i miR-1285-3p es trobaven disminuïts tant en el grup OBPre com en el grup OBGest en comparació amb el grup Control ($p < 0.03$) (taula 8, figura 52).

	Control n=25	OBPre n=20	OBGest n=25	valor p
microRNA				
miR-23b-3p	0.42 ± 0.26	0.32 ± 0.21	0.31 ± 0.30	ns
miR-27a-5p	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	ns
miR-29b-3p	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03	ns
miR-100-3p	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.007 ± 0.007^a	0.04
miR-181a-3p	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01^a	0.02 ± 0.01^a	0.01
miR-185-5p	0.55 ± 0.30	0.44 ± 0.40	0.35 ± 0.22^a	0.008
miR-191-3p	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	ns
miR-214-3p	5.51 ± 4.41	3.12 ± 1.89^a	2.92 ± 2.23^a	0.002
miR-296-5p	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01^a	0.02 ± 0.01^a	0.04
miR-337-5p	0.24 ± 0.10	0.23 ± 0.18	0.21 ± 0.13	ns
miR-339-5p	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.07	0.11 ± 0.08	ns
miR-365a-3p	0.50 ± 0.34	0.49 ± 0.35	0.63 ± 0.54	ns
miR-483-3p	0.03 ± 0.07	0.05 ± 0.03	0.08 ± 0.17	ns
miR-487a-3p	0.41 ± 0.43	0.30 ± 0.18	0.22 ± 0.13^a	0.04
miR-520h	2.29 ± 1.57	1.74 ± 0.94	1.99 ± 1.21	ns
miR-1269a	0.05 ± 0.06	0.01 ± 0.01^a	0.02 ± 0.03^a	0.005
miR-1271-5p	0.01 ± 0.01	0.009 ± 0.005	0.01 ± 0.009	ns
miR-1285-3p	0.18 ± 0.19	0.06 ± 0.05^b	0.08 ± 0.05^a	0.002

Taula 8. Expressió relativa dels microRNAs detectats en placenta. Els valors de microRNA es mostren com a expressió relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^ap≤0.05 i ^bp≤0.005 vs grup control.

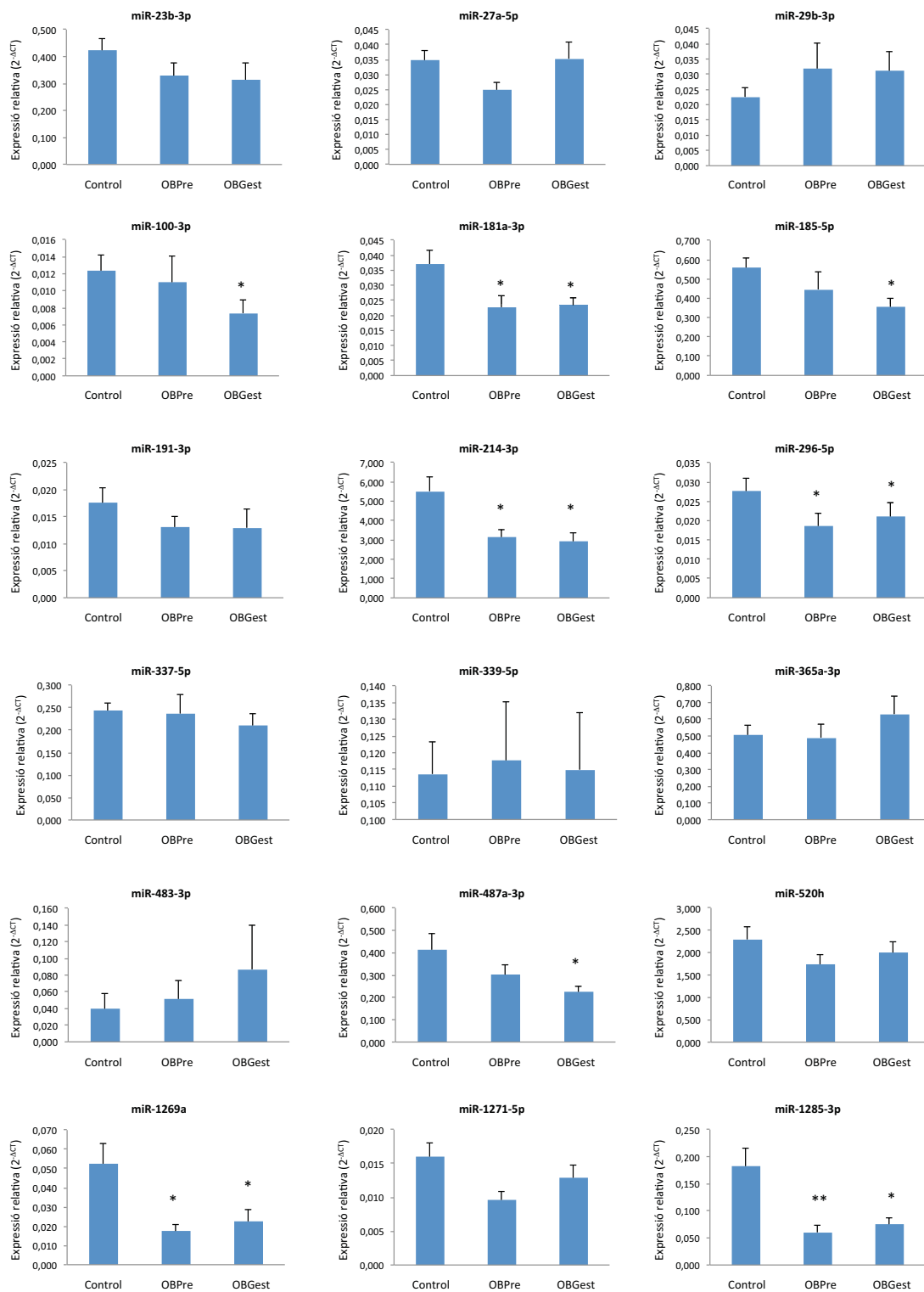


Figura 52. Gràfics de barres on es mostra l'expressió relativa dels microRNAs detectats en placenta. OBPre: obesitat pregestacional; OBGest: obesitat gestacional; Control. * $p \leq 0.05$ vs control i ** $p \leq 0.01$ vs control.

3.3. Associació de microRNAs placentaris amb paràmetres metabòlics materns

Diversos microRNAs placentaris desregulats en l'obesitat materna s'associen amb paràmetres metabòlics materns, incloent-hi una associació negativa amb l'índex de massa corporal, l'HOMA-IR, el pèptid C i positiva amb l'adiponectina-APM i HDL-c (taula 9).

microRNA	IMC part	Adiponectina-APM	HDL-c	HOMA-IR	Pèptid-C
miR-100-3p	-0.129	0.085	0.114	-0.011	-0.066
miR-181a-3p	-0.276^b	0.274^b	0.237^a	-0.299^b	-0.296^b
miR-185-5p	-0.065	0.271^b	0.060	-0.138	-0.135
miR-214-3p	-0.207	0.265^a	0.105	-0.208	-0.119
miR-296-5p	-0.234^a	0.418^c	0.276^a	-0.351^b	-0.323
miR-487a-3p	-0.135	0.290^b	0.044	-0.086	-0.110
miR-1269a	-0.228^a	0.336^b	0.270^a	-0.271^b	-0.186
miR-1285-3p	-0.238^a	0.246^a	0.226^a	-0.290^b	-0.200

Taula 9. Correlacions entre l'expressió relativa dels microRNA placentaris i els paràmetres endocrinometabòlics materns. Dades obtingudes per anàlisi de correlació de Pearson. IMC: índex massa corporal. Adiponectina-APM: adiponectina d'alt pes molecular. HDL-c: colesterol lipoproteïna d'alta densitat. HOMA-IR: model homeostàtic per a l'avaluació de la resistència a la insulina. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a $p \leq 0.05$; ^b $p \leq 0.01$; ^c $p \leq 0.001$ vs Control.

El miR-1269a ($r = -0.228$, $p = 0.05$), el miR-1285-3p ($r = -0.238$, $p = 0.04$), el miR-181a-3p ($r = -0.276$, $p = 0.01$) i el miR-296-5p ($r = 0.234$, $p = 0.05$) es van associar significativament amb un menor IMC. D'aquests, s'associen a HDL-colesterol els miR-1269a ($r = 0.270$, $p = 0.02$), miR-1285-3p ($r = 0.226$, $p = 0.05$), miR-181a-3p ($r = 0.237$, $p = 0.04$) i el miR-296-5p ($r = 0.276$, $p = 0.03$); i negativament als nivells de HOMA-IR els miR-1269a ($r = -0.271$, $p = 0.01$), miR-1285-3p ($r = -0.290$, $p = 0.01$), miR-181a-3p ($r = -0.299$, $p = 0.007$) i el miR-296-5p ($r = -0.351$, $p = 0.006$); el miR-181a-3p ($r = -0.296$, $p = 0.01$) i miR-296-5p ($r = -0.323$, $p = 0.001$) també s'associen negativament amb els nivells de pèptid-C.

Tots ells a excepció de miR-100-3p es van associar també de forma significativa amb els nivells d'adiponectina d'APM: miR-1269a ($r = 0.336$, $p = 0.003$), el miR-1285-3p ($r = 0.246$, $p = 0.03$), el miR-181a-3p ($r = 0.274$, $p = 0.01$) i el miR-296-5p ($r = 0.418$, $p =$

0.001), a més de miR-185-5p ($r = 0.271$, $p = 0.01$), el miR-214-3p ($r = 0.265$, $p = 0.02$) i el miR-487a-3p ($r = 0.290$, $p = 0.01$).

Aquestes associacions van seguir essent significatives en l'anàlisi de regressió múltiple ajustat per variables de confusió com sexe del nadó, edat materna, edat gestacional, IMC pre-gestacional i increment de pes matern (taula 10).

miRNAs	Adiponectina-APM		HDL-c		HOMA-IR		Pèptid-C	
	β	p	β	p	β	P	β	p
miR-1269a	0.353	0.001	0.295	0.007	-0.271	0.01	--	--
Δ pes mare	0.281	0.01	0.284	0.01	--	--	--	--
Edat mare	--	--	0.257	0.01	--	--	--	--
R ² ajustat	0.226		0.227		0.129			
miR-1285-3p	0.331	0.003	--	--	-0.290	0.01	--	--
Δ pes mare	0.328	0.003	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.244				0.129			
miR-181a-3p	0.227	0.04	--	--	-0.309	0.007	--	--
Δ pes mare	0.300	0.008	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.149				0.150			
miR-185-5p	0.316	0.005	0.237	0.02	--	--	--	--
Δ pes mare	0.332	0.003	0.335	0.003	--	--	--	--
Edat mare	--	--	0.252	0.02	--	--	--	--
R ² ajustat	0.205		0.229					
miR-214-3p	0.332	0.003	--	--	--	--	--	--
Δ pes mare	0.347	0.002	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.211							
miR-296-5p	0.362	0.003	0.288	0.01	-0.351	0.006	-0.323	0.01
Δ pes mare	0.300	0.01	0.309	0.01	--	--	--	--
Edat mare	--	--	0.298	0.01	--	--	--	--
R ² ajustat	0.315		0.288		0.133		0.158	
miR-487a-3p	0.314	0.005	--	--	--	--	--	--
Edat gest.	0.327	0.004	--	--	--	--	--	--
R ² ajustat	0.205							

Taula 10. Anàlisi de regressió multivariant amb els paràmetres endocrinometabòlics materns com a variable dependent en totes les dones de l'estudi. Dades obtingudes per anàlisi de regressió múltiple esglaonada. IMC: índex de massa corporal. Adiponectina-APM: adiponectina d'alt pes molecular. HDL-colesterol: lipoproteïna d'alta densitat, colesterol. HOMA-IR: model homeostàtic per a l'avaluació de la resistència a la insulina. Δ .pes mare: increment de pes matern. Edat gest.: edat gestacional. Variables no predictores: sexe del nadó, edat materna, edat gestacional, IMC pre-gestacional i increment de pes matern.

3.4. Associació dels microRNAs placentaris amb paràmetres de creixement pre i postnatal

Alguns dels microRNAs placentaris desregulats en l'obesitat materna també es van associar significativament amb paràmetres de creixement prenatal i postnatal durant els 12 mesos de seguiment dels nadons.

Es van observar associacions significatives de miR-100-3p ($r = -0.343$ i $p = 0.003$), del miR-1269a ($r = -0.233$ i $p = 0.03$), del miR-1285-3p ($r = -0.345$ i $p = 0.003$), del miR-296-5p ($r = -0.329$ i $p = 0.006$) i del miR-487a-3p ($r = -0.330$ i $p = 0.003$) amb el pes en naixement-SDS (taula 11, figura 53). A més, el miR-100-3p s'associava amb l'augment de pes SDS als 1, 4 i 12 mesos de vida ($r = 0.300$ i $p = 0.02$, $r = 0.252$ i $p = 0.04$ i $r = 0.294$ i $p = 0.02$ respectivament); el miR-296-5p s'associava amb l'increment de pes SDS als 4 i 12 mesos de vida ($r = 0.410$ i $p = 0.001$ i $r = 0.373$ i $p = 0.002$) i el miR-487a-3p amb l'augment de pes als 1, 4 i 12 mesos ($r = 0.260$ i $p = 0.03$, $r = 0.308$ i $p = 0.01$ i $r = 0.259$ i $p = 0.03$ respectivament). Els miR-1269a, miR-1285 i miR-181a-3p s'associaven també amb l'augment de pes SDS el primer mes de vida ($r = 0.250$ i $p = 0.04$), ($r = 0.321$ i $p = 0.01$) i ($r = 0.249$ i $p = 0.04$) (taula 11, figura 54).

microRNA	Pes placenta	Pes naixement-SDS	Longitud naixement-SDS	Δ de pes-SDS 1m#	Δ de pes-SDS 4m#	Δ de pes-SDS 12m#
miR-100-3p	-0.189	-0.343^b	-0.278^a	0.300^a	0.252^a	0.294^a
miR-1269a	-0.272^b	-0.233^a	-0.240^a	0.250^a	0.133	0.069
miR-1285-3p	-0.159	-0.345^b	-0.296^b	0.321^b	0.156	0.185
miR-181a-3p	-0.124	-0.185	-0.158	0.249^a	0.048	0.108
miR-185-5p	-0.033	-0.107	-0.050	0.216	0.114	0.226
miR-214-3p	0.040	-0.198	-0.114	0.107	0.234	0.236
miR-296-5p	-0.193	-0.329^b	-0.134	0.114	0.410^c	0.373^b
miR-487a-3p	-0.298^b	-0.330^b	-0.263^b	0.260^a	0.308^b	0.259^a

Taula 11. Correlacions entre l'expressió relativa de microRNA placentaris i els paràmetres de creixement pre i postnatal. Dades obtingudes per anàlisi de correlació de Pearson. Ns: no significatiu. Δ: increment. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a $p \leq 0.05$; ^b $p \leq 0.01$; ^c $p \leq 0.001$ vs Control. #: n=60

En l'anàlisi de regressió múltiple ajustat per sexe del nadó, edat materna, edat gestacional, IMC pregestacional i increment de pes matern, el miR-487a-3p era un predictor independent de pes de la placenta i explicava el 13% de la seva variància. El

miR-100-3p, el miR-1285-3p, el miR-296-5p i el miR-487a-3p van ser predictors independents de pes el néixer i van explicar gairebé el 30% de la seva variància. El miR-100-3p, el miR-1285-3p i el miR-487a-3p van ser predictors independents de la longitud en néixer i van explicar gairebé el 30% de la seva variància. El miR-100-3p, el miR-1285-3p i el miR-487a-3p van ser predictors independents del guany de pes el primer mes de vida i van explicar gairebé el 15% de la seva variància. El miR-100-3p, el miR-296-5p i el miR-487a-3p van ser predictors independents del guany de pes als 4 i 12 mesos de vida i van explicar gairebé el 20% de la seva variància (*taula 12*).

microRNAs	Pes placenta		Pes naixement-SDS		Longitud naixement-SDS		Δ de pes-SDS 1m#		Δ de pes-SDS 4m#		Δ de pes-SDS 12m#	
	β	p	β	P	β	p	β	p	β	p	β	p
miR-100	--	--	-0.300	0.008	-0.246	0.02	0.291	0.02	0.213	0.04	0.294	0.02
Edat gest.	--	--	0.314	0.006	0.236	0.03	--	--	--	--	--	--
IMC pregest.	--	--	--	--	0.334	0.01	--	--	--	--	--	--
Sexe	--	--	--	--	-0.258	0.02	--	--	--	--	--	--
R² ajustat			0.303		0.294		0.145		0.118		0.179	
miR-1285	--	--	-0.311	0.003	-0.298	0.006	0.321	0.008	--	--	--	--
Edat gest.	--	--	0.319	0.003	0.257	0.01	--	--	--	--	--	--
Sexe	--	--	-0.209	0.04	-0.239	0.02	--	--	--	--	--	--
R² ajustat			0.294		0.295		0.151					
miR-296	--	--	-0.222	0.01	--	--	--	--	0.413	<0.0001	0.377	<0.0001
Edat gest.	--	--	0.490	<0.0001	--	--	--	--	--	--	--	--
Sexe	--	--	-0.184	0.04	--	--	--	--	--	--	--	--
R² ajustat			0.307						0.213		0.198	
miR-487	-0.246	0.03	-0.273	0.01	-0.218	0.03	0.328	0.04	0.423	0.004	0.400	0.006
Edat gest.	0.231	0.04	0.333	0.002	0.318	0.003	--	--	--	--	--	--
Sexe	--	--	--	--	-0.258	0.01	--	--	--	--	--	--
R² ajustat	0.133		0.312		0.304		0.105		0.179		0.160	

Taula 12. Anàlisi de regressió multivariant amb els paràmetres de creixement pre i posnatal com a variables dependents en totes les dones de l'estudi. Dades obtingudes per anàlisi de regressió múltiple esglaonada. IMC: índex de massa corporal. Edat gest.: edat gestacional. Variables no predictores: sexe del nadó, edat materna, edat gestacional, IMC pregestacional i increment de pes matern. . #: n=60

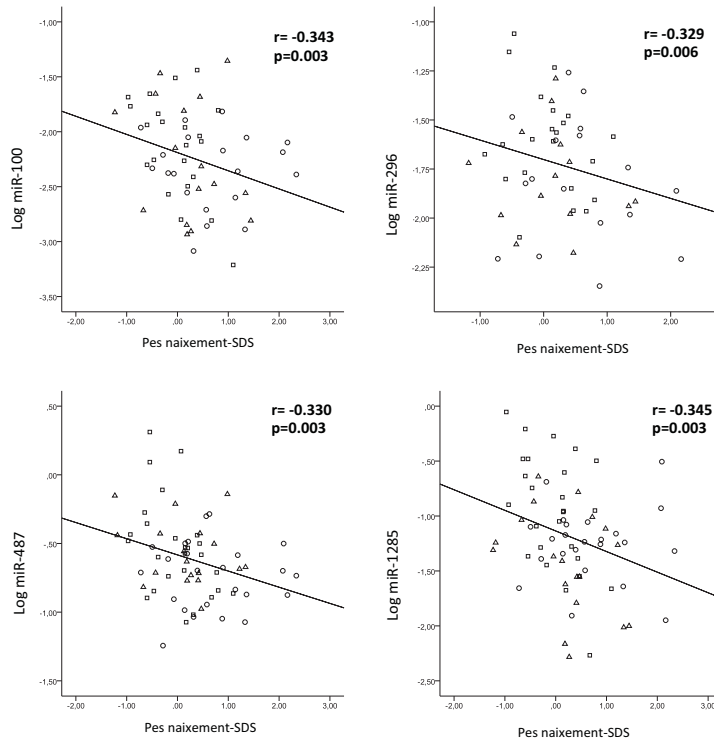


Figura 53. Gràfics de dispersió dels paràmetres de creixement prenatal amb els microRNAs seleccionats expressats en placenta. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

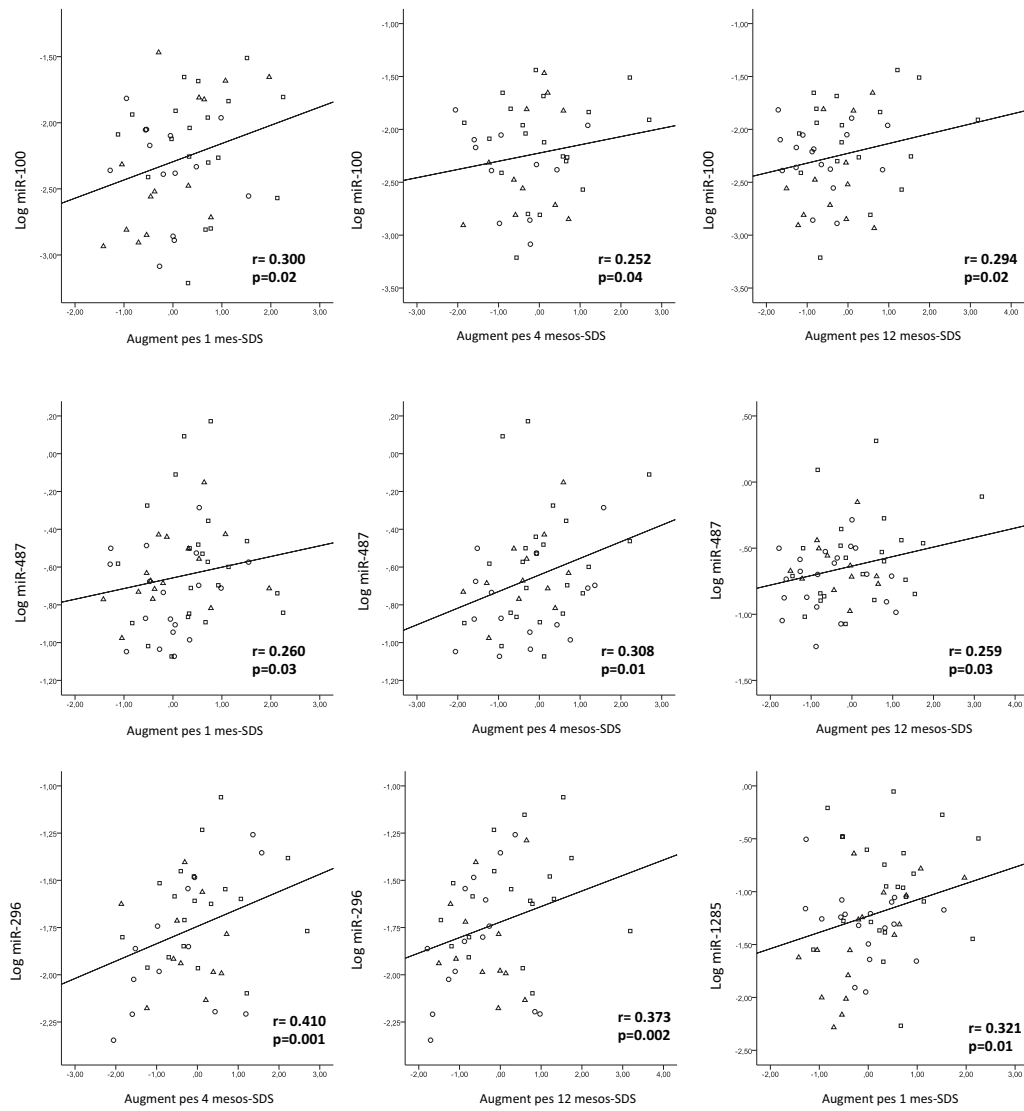


Figura 54. Gràfics de dispersió dels paràmetres de creixement postnatal amb els microRNAs seleccionats expressats en placenta. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

3.5. Anàlisi *in silico* de vies metabòliques associades amb els microRNAs placentaris associats al creixement pre i postnatal

Igual que en l'apartat anterior, es va realitzar l'anàlisi *in silico* per determinar els gens diana dels microRNAs relacionats amb paràmetres de creixement (el miR-100-3p, el miR-1285-3p, el miR-296-5p i el miR-487a-3p), i en quines vies metabòliques estan implicats. El programa informàtic miRSystem va indicar que, amb exclusió de les vies del càncer, aquests quatre microRNAs estaven implicats en les rutes de WNT, MAPK, mTOR i les vies de la insulina/IGF-1 de senyalització (taula 13).

Les vies en les quals conflueixen els 4 miRNAs són: la via de senyalització de MAPK i la via de senyalització de WNT.

Database	Via	Gens (total de gens de la via)	-ln (valor p)
miR-100-3p			
Reactome	Insulin receptor-signaling	3 (81)	7.08
Reactome	mTOR-signaling	2 (27)	6.68
KEGG	WNT-signaling	3 (150)	5.53
KEGG	MAPK-signaling	3 (272)	3.99
Reactome	Integration of energy metabolism	2 (125)	3,58
miR-1285-3p			
KEGG	WNT signaling	1 (150)	4,98
KEGG	MAPK signaling	1 (272)	4,39
miR-296			
KEGG	MAPK signaling	6 (272)	7,93
KEGG	Regulation of insulin secretion	2 (98)	3,16
Reactome	Integration of energy metabolism	2 (125)	2,77
KEGG	Insulin signaling	2 (137)	2,62
KEGG	WNT signaling	2 (150)	2,49
miR-487a-3p			
KEGG	WNT signaling	8 (150)	9.74
Pathway interaction	mTOR signaling	5(68)	7.97
KEGG	Insulin signaling pathway	6 (137)	6.64
Reactome	IRS mediated signaling	4 (81)	5,22
Pathway interaction	Pancreatic secretion	4 (103)	4,43
Reactome	IGF-1 Pathway	2 (29)	3,65

Taula 13. Rutes metabòliques que contenen els gens diana dels microRNAs expressats en placenta associats amb paràmetres de creixement pre i postnatal. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

4.- Presència dels microRNAs placentaris en plasma matern

4.1. Presència en plasma dels microRNAs placentaris específics de cada grup d'estudi

Donada la importància dels microRNAs circulants, vam estudiar si els microRNAs expressats en placenta es trobaven també en plasma matern. Per a tal fi, vam comparar el perfil de microRNAs obtingut amb TLDA en plasma i en placenta.

En primer lloc, ens vam centrar en els microRNAs placentaris específics de cada grup d'estudi, els que només s'expressen en placentes del grup control, els que només s'expressen en el grup OBPre i els que només s'expressen en el grup OBGest, i vam estudiar la seva presència en plasma al segon trimestre de gestació (*figura 51*). Vam observar que la majoria d'aquests són microRNAs específics de la placenta i no es troben presents en les mostres de plasma de segon trimestre, a excepció del miR-16-1-3p que és específic del grup control; dels miR-139-3p i miR-590-3p específics del grup OBGest i del miR-144-3p específic del grup OBPre (*taula 14 A, B, C*).

microRNA	Control (n=6)		OBPre (n=6)		OBGest (n=6)		Cromosoma
	Placenta	Plasma	Placenta	Plasma	Placenta	Plasma	
miR-16-1-3p	-8,70	-6,29	ND	-7,06	ND	-6,52	Cr.13
miR-92b-5p	-6,74	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.1
miR-208a-3p	-6,94	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.14
miR-325	-8,17	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.X
miR-513a-5p	-5,21	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.X
miR-567	-7,85	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.3
miR-577	-7,85	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.4
miR-581	-5,23	ND	ND	ND	ND	-10,02	Cr.5
miR-582-5p	-8,82	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.5
miR-648	-5,77	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.22
miR-653-5p	-6,93	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.7
miR-887-3p	-7,69	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.5
miR-1225-3p	-8,60	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.16
miR-1226-5p	-8,81	ND	ND	ND	ND	ND	Cr.3
microRNA	Control (n=6)		OBPre (n=6)		OBGest (n=6)		Cromosoma
microRNA	Placenta	Plasma	Placenta	Plasma	Placenta	Plasma	
miR-26a-2-3p	ND	ND	-5,16	ND	ND	ND	Cr.12
miR-144-3p	ND	-7,28	4,99	-8,17	ND	-6,80	Cr.17
miR-188-3p	ND	ND	-7,14	ND	ND	ND	Cr.X
miR-200b-5p	ND	ND	-4,39	ND	ND	ND	Cr.1
miR-298	ND	ND	-8,09	ND	ND	ND	Cr.20
miR-302d-3p	ND	ND	-7,74	ND	ND	ND	Cr.4
miR-380-3p	ND	ND	-7,07	ND	ND	ND	Cr.14
miR-488-5p	ND	ND	-8,09	ND	ND	ND	Cr.1
miR-557	ND	ND	-8,08	ND	ND	ND	Cr.1
miR-626	ND	ND	-7,51	ND	ND	ND	Cr.15
miR-672	ND	ND	0,93	ND	ND	ND	Cr.X
miR-1292-5p	ND	ND	-6,81	ND	ND	ND	Cr.20
miR-1826	ND	ND	-7,49	ND	ND	ND	ND
microRNA	Control (n=6)		OBPre (n=6)		OBGest (n=6)		Cromosoma
microRNA	Placenta	Plasma	Placenta	Plasma	Placenta	Plasma	
miR-124-5p	ND	ND	ND	ND	-7,44	ND	Cr.8
miR-139-3p	ND	-2,09	ND	-2,29	-8,93	-2,67	ND
miR-149-3p	ND	ND	ND	ND	-3,63	ND	Cr.2
miR-194-3p	ND	ND	ND	ND	-8,95	ND	Cr.11
miR-367-5p	ND	ND	ND	ND	-7,97	ND	Cr.4
miR-541-5p	ND	-3,50	ND	-5,81	-8,46	ND	Cr.14
miR-548d-3p	ND	ND	ND	ND	2,45	ND	Cr.8
miR-586	ND	ND	ND	ND	-8,62	ND	Cr.6
miR-590-3p	ND	-8,27	ND	-9,13	-8,63	-7,51	Cr.7
miR-609	ND	ND	ND	ND	-8,15	ND	Cr.10
miR-633	ND	ND	ND	ND	-0,41	ND	Cr.17
miR-658	ND	ND	ND	-6,68	0,19	ND	Cr.22
miR-659-3p	ND	ND	ND	ND	-6,14	ND	Cr.22
miR-891b	ND	ND	ND	ND	-8,84	ND	Cr.X
miR-1227-3p	ND	-6,58	ND	ND	-9,19	ND	Cr.19

Taula 14. Presència en plasma de segon trimestre de gestació dels microRNA expressats específicament en placenta de cada grup d'estudi A) grup control; B) OBPre, C) OBGest. S'expressa el cromosoma on s'ha identificat el gen que transcriu pel microRNA. Els valors s'expressen com a log2. ND: no detectat.

4.2. Presència en plasma dels microRNAs placentaris amb perfil diferencial en obesitat materna

Seguidament es va estudiar la presència en plasma dels microRNAs placentaris elegits com a candidats per ser diferencialment regulats en l'obesitat materna (taula 8). D'aquests 18 microRNAs placentaris, els miR-27a-5p, miR-100-3p, miR-181a-3p, miR-1269a, miR-1271-5p i miR-1285-3p no es van detectar en les mostres de plasma. El miR-23b-3p i el miR-483-3p només es van detectar en plasma del grup Control.

Entre els microRNAs detectats en plasma, el miR-296-5p es trobava disminuït en el grup OBPre i OB Gest en comparació amb el grup control ($p = 0.001$ i $p = 0.04$) i el miR-520h augmentat en ambdós grups en comparació amb el grup control ($p = 0.01$ i $p = 0.004$) (taula 15).

	Control n=25	OBPre n= 20	OB Gest n= 25	valor p
microRNAs				
miR-23b-3p	0.161 ± 0.145	ND	ND	--
miR-27a-5p	ND	ND	ND	--
miR-29b-3p	0.028 ± 0.013	0.036 ± 0.032	0.029 ± 0.012	ns
miR-100-3p	ND	ND	ND	--
miR-181a-3p	ND	ND	ND	--
miR-185-5p	0.769 ± 0.544	0.641 ± 0.347	0.961 ± 0.579	ns
miR-191-3p	0.021 ± 0.008	0.030 ± 0.011	0.021 ± 0.011	ns
miR-214-3p	0.695 ± 1.720	0.577 ± 0.670	1.086 ± 1.721	ns
miR-296-5p	0.149 ± 0.860	0.075 ± 0.047^b	0.099 ± 0.064^a	0.04
miR-337-5p	0.049 ± 0.012	0.046 ± 0.046	0.042 ± 0.035	ns
miR-339-5p	0.370 ± 0.168	0.399 ± 0.208	0.325 ± 0.153	ns
miR-365a-3p	0.036 ± 0.033	0.027 ± 0.026	0.043 ± 0.027	ns
miR-483-3p	0.175 ± 0.178	ND	ND	--
miR-487a-3p	0.042 ± 0.091	0.042 ± 0.040	0.048 ± 0.091	ns
miR-520h	0.130 ± 0.102	0.222 ± 0.130^a	0.317 ± 0.147^b	0.008
miR-1269a	ND	ND	ND	--
miR-1271-5p	ND	ND	ND	--
miR-1285-3p	ND	ND	ND	--

Taula 15. Presència en plasma dels microRNAs placentaris amb perfil diferencial en obesitat materna. Les dades es mostren com a mitjana ± SEM. Els valors de microRNA s'expressen com a expressió relativa ($2^{-\Delta\text{CT}}$). ND: no detectat. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a $p \leq 0.05$, ^b $p \leq 0.005$ vs grup control

A continuació vam estudiar l'associació entre la concentració d'aquests microRNAs en plasma i paràmetres de creixement pre i postnatal. Els resultats van mostrar que la concentració del miR-296-5p circulant en plasma en el segon trimestre, s'associava amb l'expressió del miR-296-5p placentari ($r = 0.310$, $p = 0.008$) (figura 55). També es van observar associacions del miR-296-5p plasmàtic amb el pes de la placenta ($r = -0.258$, $p = 0.03$), el pes al naixement-SDS ($r = -0.297$, $p = 0.01$), la longitud-SDS al néixer ($r = -0.315$, $p = 0.008$) i l'augment de pes-SDS als 12 mesos d'edat ($r = 0.325$, $p = 0.01$) (taula 16, figura 56).

Les associacions amb el pes de la placenta ($\beta = -0.260$, $p = 0.03$), el pes al naixement ($\beta = -0.252$, $p = 0.03$), la longitud al naixement ($\beta = -0.326$, $p = 0.006$) i l'augment de pes als 12 mesos ($\beta = 0.206$, $p = 0.02$) es va mantenir en l'anàlisi multivariada ajustada per paràmetres materns i neonatals (taula 17).

Així, el miR-296-5p circulant va ser un predictor independent del pes de la placenta, del pes i la longitud al naixement i del pes als 12 mesos de vida, explicant gairebé el 20% de la seva variança (taula 17).

microRNA plasma	miR-296 Placenta	Pes placenta	Pes naixement-SDS	Longitud naixement-SDS	Δ de pes-SDS 1m#	Δ de pes-SDS 4m#	Δ de pes-SDS 12m#
miR-296 -5p	0.310^b	-0.258^a	-0.297^a	-0.315^b	0.091	0.218	0.325^a
miR-520h		0.096	0.027	0.094	-0.157	-0.028	-0.080

Taula 16. Correlació de l'expressió de microRNAs en mostres de plasma en segons trimestre de gestació amb paràmetres de creixement pre i postnatal en totes les dones incloses a l'estudi. Δ : increment. Dades obtingudes per anàlisi de correlació de Pearson. En negreta es destaquen els valors estadísticament significatius. ^a $p \leq 0.05$, ^b $p \leq 0.005$ vs grup control. #: $n=60$

microRNAs	Pes placenta		Pes naixement		Longitud naixement		Δ pes 12 m#	
	β	p	β	p	β	p	β	p
miR-296-5p plasma	-0.349	0.001	-0.216	0.03	-0.217	0.04	0.206	0.02
Increment pes mare	0.235	0.028	--	--	--	--	--	--
Edat mare	0.210	0.056	--	--	--	--	--	--
Edat gestacional	--	--	0.342	0.001	-0.311	0.004	--	--
R ² ajustat	0.217		0.243		0.191		0.123	

Taula 17 Anàlisi de regressió multivariant miR-296 amb paràmetres de creixement pre i postnatal com a variables dependents. Dades obtingudes per anàlisi de regressió múltiple esglaonada. IMC: índex de massa corporal. Variables no predictores: sexe del nadó, edat materna, edat gestacional, IMC pregestacional i increment de pes matern. #:n=60

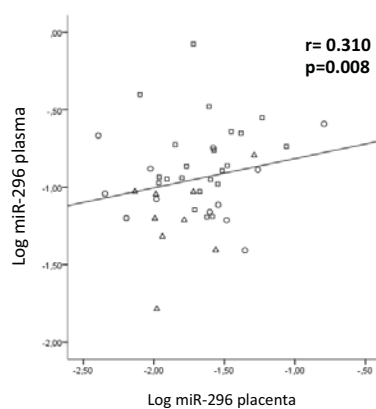


Figura 55. Gràfic de dispersió de la relació entre miR-296-5p en plasma i miR-296 en placenta. Triangles: (OBPre) obesitat pregestacional; cercles: (OBGest) obesitat gestacional; quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

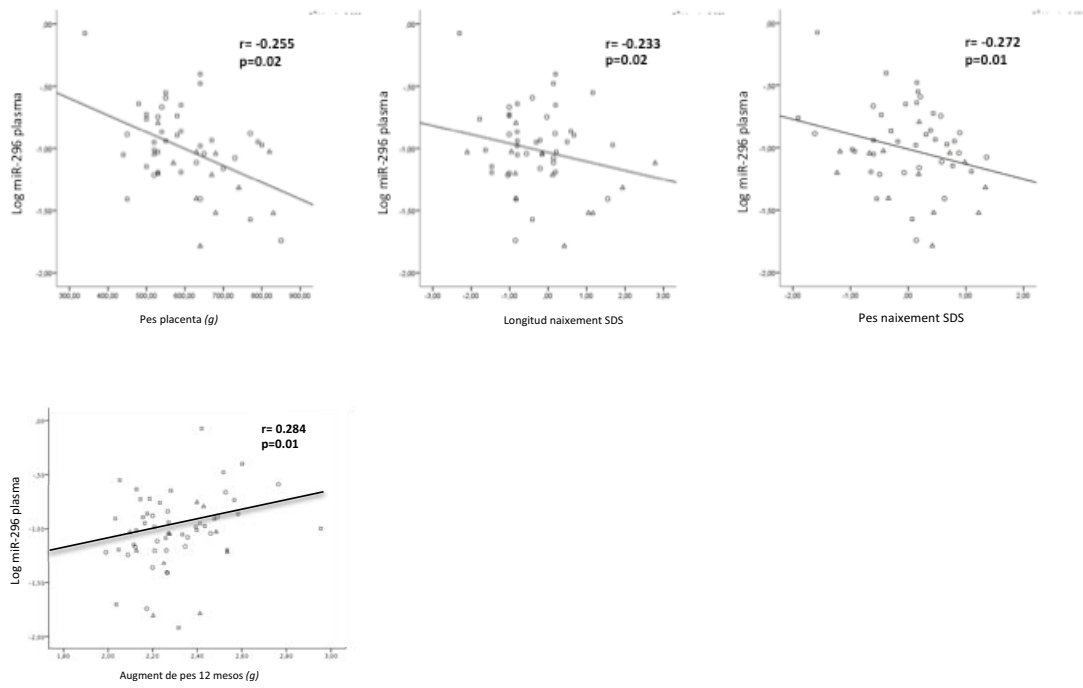


Figura 56. Gràfics de dispersió dels paràmetres de creixement postnatal amb el miR-296-5p circulant. Triangles: obesitat pregestacional (OBPre); cercles: obesitat gestacional (OBGest); quadrats: Control. El valor de r i p provenen d'anàlisi de Pearson.

DISCUSSIÓ

Aquesta tesi doctoral presenta, per primera vegada segons el nostre coneixement, el perfil de microRNAs en plasma i placenta en gestants amb obesitat pregestacional i obesitat gestacional en comparació amb gestants de pes normal. Aquests microRNAs s'han relacionat amb paràmetres metabòlics materns i amb paràmetres de creixement prenatal i postnatal. Els resultats indiquen que els microRNAs desregulats en obesitat materna poden tenir un paper important com a reguladors del creixement pre i postnatal.

1.- Grups d'estudi

Aquest treball de tesi doctoral s'ha pogut dur a terme gràcies a la creació de l'anomenada "*Cohort Prenatal Girona*". Aquesta consisteix en la creació d'una cohort i d'una seroteca basada en dades de l'embaràs i seguiment dels fills els primers anys de vida per estudiar factors de risc de desenvolupar malalties metabòliques i cardiovasculars, així com de malalties relacionades amb el creixement. La col·lecció de mostres forma part del Biobanc de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi) i inclou dades de la mare, dades de la gestació, del nou-nat i del pare així com mostres biològiques de les gestants, dels pares i del moment del part com placenta i sang de cordó.

Les mostres obtingudes i analitzades en aquesta tesi són les que pertanyen al grup control i al grup d'obeses pregestacionals i obesés gestacionals, descartant altres patologies cròniques o pròpies de la gestació com la diabetis, i es limiten a mostres de sang de segon trimestre i teixit placentari.

2.- microRNAs en plasma

2.1. Perfil de microRNAs plasmàtics en obesitat

En aquest treball s'ha utilitzat la tecnologia TaqMan mitjançant TLDA per estudiar el perfil de microRNAs circulants en embarassades amb obesitat pregestacional i gestacional. Dels 723 microRNAs estudiats, 248 han estat identificats en plasma de

segon trimestre de gestació en els diferents grups d'estudi. 8 microRNAs s'expressen únicament en el grup control, 23 en el grup d'obesitat gestacional i 17 en el grup d'obesitat pregestacional. 174 microRNAs s'expressen en tots els grups d'estudi i d'aquests, 13 s'expressen diferencialment en l'obesitat materna en comparació amb el grup control.

Els nostres resultats mostren que 8 d'aquests 13 microRNAs s'expressen diferencialment en OBGest i 5 microRNAs s'expressen diferencialment tant en OBGest com en OBPre en comparació amb el Control. Cap microRNA s'expressa diferencialment només en les embarassades amb obesitat pregestacional, fet que suggereix que és l'augment de pes durant la gestació (l'obesitat gestacional) el que juga un paper preeminent en la regulació de microRNAs circulants en el segon trimestre de la gestació.

Entre els microRNAs expressats diferencialment en obesitat materna, el miR-30a-5p i miR-130a, estaven augmentats en OBGest i es van associar significativament amb un augment de pes excessiu durant l'embaràs. En l'anàlisi de les corbes ROC, aquests microRNAs van mostrar una bona o acceptable exactitud discriminatòria per a l'obesitat gestacional. Els miR-103 i miR-221, que estaven disminuïts en OBGest, i els miR-324-3p i miR-652, que estaven disminuïts tant en OBGest i OBPre, es van associar amb menor guany de pes gestacional, i amb una acceptable o bona exactitud discriminatòria per l'obesitat gestacional.

La relació entre alguns d'aquests microRNAs amb la obesitat ja havia estat descrita anteriorment. El miR-30a-5p presenta una expressió disminuïda en teixit adipós de ratolins sotmesos a una dieta rica en greixos i a més ha estat identificat com a microRNA proangiogènica (137). El miR-103 està disminuït en homes i dones obeses i associat amb les vies reguladores de la insulina (138). El miR-130a, que està augmentat en estats proinflamatoris, és un regulador de l'adipogènesi i disminueix l'expressió de la seva diana: PPAR γ (*peroxisome proliferator activator receptor gamma*) (139).

I finalment, el miR-221 està infraexpressat en nens obesos així com en adults amb obesitat mòrbida, i s'associa també amb l'estat inflamatori implícit de l'obesitat (109) (140).

La resta dels microRNAs circulants expressats diferencialment en obesitat materna en el nostre treball no s'havien relacionat fins ara amb processos d'adipogènesi o obesitat, però sí amb processos proinflamatoris. El miR-324-3p s'ha descrit com a inductor del factor de transcripció proinflamatori NF- κ B i s'ha relacionat amb la inflamació i mort cel·lular a nivell del sistema nerviós central; i el miR-652 té un paper en els processos proinflamatoris associats amb la cirrosi hepàtica (141, 142). El fet que aquests dos microRNAs estiguin reduïts tant en OBGest com en OBPre i la seva relació amb la inflamació podria explicar que tinguin una certa importància en els estats d'inflamació aguda i crònica (2).

2.2. Associació amb paràmetres metabòlics materns

Els microRNAs són reconeguts com a nous reguladors epigenètics del metabolisme i de la homeòstasi energètica. Els nostres resultats mostren que alguns dels microRNAs estudiats s'associen amb paràmetres metabòlics durant la gestació. Així nivells disminuïts dels miR-221, miR-340 i miR-652 es van associar amb intolerància a la glucosa (nivells de glucosa i hemoglobina glicada augmentats) i els miR-122 i miR-375 es van associar amb sensibilitat disminuïda a la insulina (HOMA-IR i pèptic C més elevats). Nivells disminuïts de miR-1221, miR-324-3p i miR-375 també s'associen a nivell elevats de triglicèrids i disminuïts de colesterol HDL.

Algunes d'aquestes associacions havien estat descrites anteriorment fora de l'embaràs. El miR-122 és un regulador important del metabolisme dels lípids. La inhibició d'aquest microRNA en ratolins a nivell hepàtic redueix els nivells de colesterol i àcids grassos i millora l'esteatosi hepàtica. Aquest microRNA ha estat descrit com a una diana terapèutica en la síndrome metabòlica (143).

El miR-221, a part d'estar vinculat amb l'obesitat (140), juga un paper en la disfunció endotelial induïda per la diabetis. *Li i col.* (2009) han demostrat que la utilització de

molècules *antisense-miR-221* redueix els nivells de miR-221 i inhibeix els efectes nocius que la hiperglucèmia persistent deguda a la diabetis causa en les cèl·lules endotelials. Per tant conclouen que la manipulació de la via del miR-221 podria ser una estratègia en el tractament de la disfunció vascular en pacients diabètics (144).

El miR-340 ha estat identificat en malaltia cardiovascular i s'uneix a gens de senyalització del receptor d' IGF-1, que activa vies relacionades amb la regulació de la glucosa (145). A nivell oncològic, s'ha relacionat el miR-340 amb estat proinflamatori, però també amb el transport de glucosa que estimularia el creixement cel·lular (146). El miR-375 també ha estat relacionat amb l'homeòstasi de la glucosa. La seva sobreexpressió suprimeix la secreció d'insulina induïda per la glucosa, i per tant la inhibició del miR-375 millora la secreció d'insulina (147).

El miR-423-5p es troba disminuït en pacients amb diabetis tipus 2 i s'associa amb la tolerància a la glucosa en dejú (107).

L'associació del miR-652 amb paràmetres metabòlics no s'ha descrit anteriorment. No obstant això, la seva relació amb la malaltia hepàtica crònica podria suggerir un possible paper en l'homeòstasi energètica (142).

2.3. Associació amb creixement pre i postnatal

Hi ha evidència suficient per considerar que la nutrició materna durant la gestació influeix en el risc de desenvolupar obesitat en l'infància i l'edat adulta. Tot i que la majoria d'estudis s'han realitzat en estats de desnutrició i en nadons petits per edat gestacional, també s'ha demostrat com l'obesitat materna, o l'excés de guany de pes durant l'embaràs, influeix en el pes del nadó al néixer i l'estat obesogènic a llarg termini (148, 149).

Aquesta influència no es pot explicar únicament amb factors genètics i estil de vida, s'ha de considerar també les modificacions epigenètiques de l'embaràs, que poden tenir efectes sobre el metabolisme, l'adipositat i el control de la gana. Les alteracions de microRNAs en el descendent de mares obesas o sobrealimentades durant la gestació ja ha estat demostrat en diferents models animals; Zhang i col. en ratolins i

Nicholas i col. en ovelles, estudien com la sobrealimentació durant la gestació afecta l'expressió de microRNAs hepàtics relacionats amb la via de senyalització de la insulina (111, 150).

En aquest treball, s'han identificat 6 microRNAs circulants que es relacionen amb el creixement pre i postnatal. Cap d'ells ha estat prèviament relacionat amb el creixement en éssers humans ni en rates (*figura 57*).

En el nostre estudi, els miR-340, miR-423-5p i miR-652 s'associen amb paràmetres de creixement prenatal i són predictors independents del pes de la placenta i/o del pes al néixer. Aquests microRNAs es relacionen també amb paràmetres metabòlics de l'embaràs. Ja és conegut l'impacte de l'obesitat materna sobre el creixement de la placenta i el creixement fetal (151). La nostra hipòtesi és que aquests tres microRNAs podrien estar implicats en el creixement prenatal a través de la regulació de la funció placentària.

Per altra banda, els miR-29c, miR-128a i miR-221 van ser predictors independents del pes als 6 mesos de vida. Tots tres microRNAs han estat descrits anteriorment a la bibliografia, relacionant-los amb creixement i proliferació cel·lular, però cap d'ells en gestació ni creixement infantil.

El miR-29c modula la senyalització intracel·lular de la insulina en els adipòcits, fetge i múscul de rates diabètiques (152). A més, la seva sobreexpressió en endometri s'associa amb l'avortament del fetus en model porcí (153). I a nivell oncològic, el miR-29c inhibeix la migració, invasió i metàstasi de carcinoma de nasofaringe (154). El miR-128a s'ha descrit com a un supressor de tumors, inhibidor de proliferació cel·lular i inductor d'apoptosis sobretot en tumors cerebrals (155). En model animal, s'ha demostrat que el miR-221 és un modulador crític de la proliferació cel·lular en el carcinoma hepàtic (156).

La relació d'aquests microRNAs amb la proliferació cel·lular podria suggerir doncs un possible paper d'aquests microRNAs en el creixement postnatal.

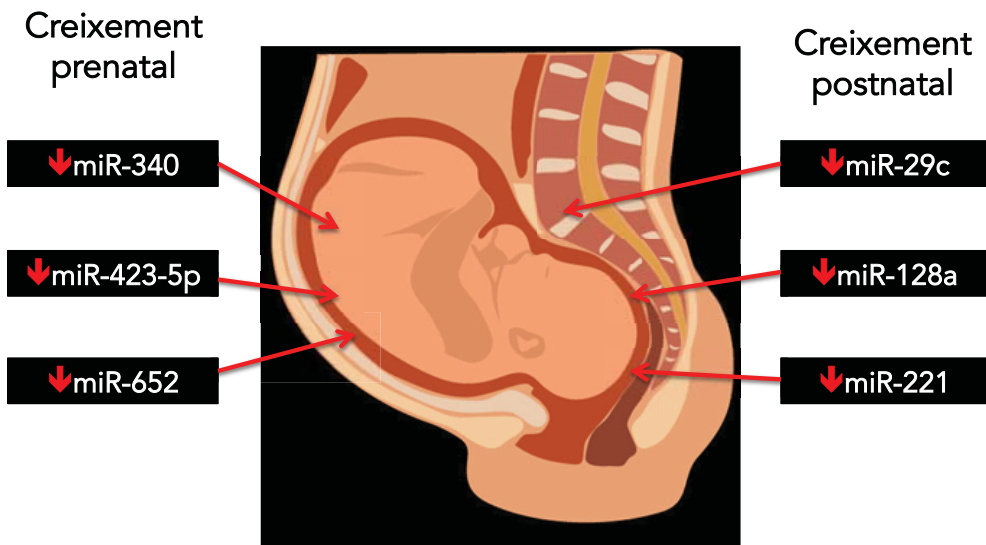


Figura 57. *microRNAs* circulants relacionats amb el creixement prenatal (esquerra) i postnatal (dreta). Els miR-340, miR-423-5p i miR-652 es relacionen negativament (fletxes vermelles) amb el creixement prenatal. Els miR-29c, miR-128a i miR-221 es relacionen negativament (fletxes vermelles) amb el creixement postnatal.

2.4. Associació a vies funcionals

L'anàlisi *in-silico* dels 5 *microRNAs* relacionats amb paràmetres de creixement demostra que tots ells convergeixen en dues vies comunes: la regulació de la secreció d'insulina i la integració del metabolisme energètic. En l'anàlisi individual, tots ells participen en diverses rutes del metabolisme de la glucosa/insulina i algunes vies de creixement i proliferació cel·lular. En la majoria casos, com hem vist, ja se'ls ha relacionat amb una funció en l'obesitat o diabetis, fet que suggereix una implicació important a nivell d'obesitat i/o diabetis gestacional i, possiblement i indirecta, amb el creixement fetal (*figura 58*).

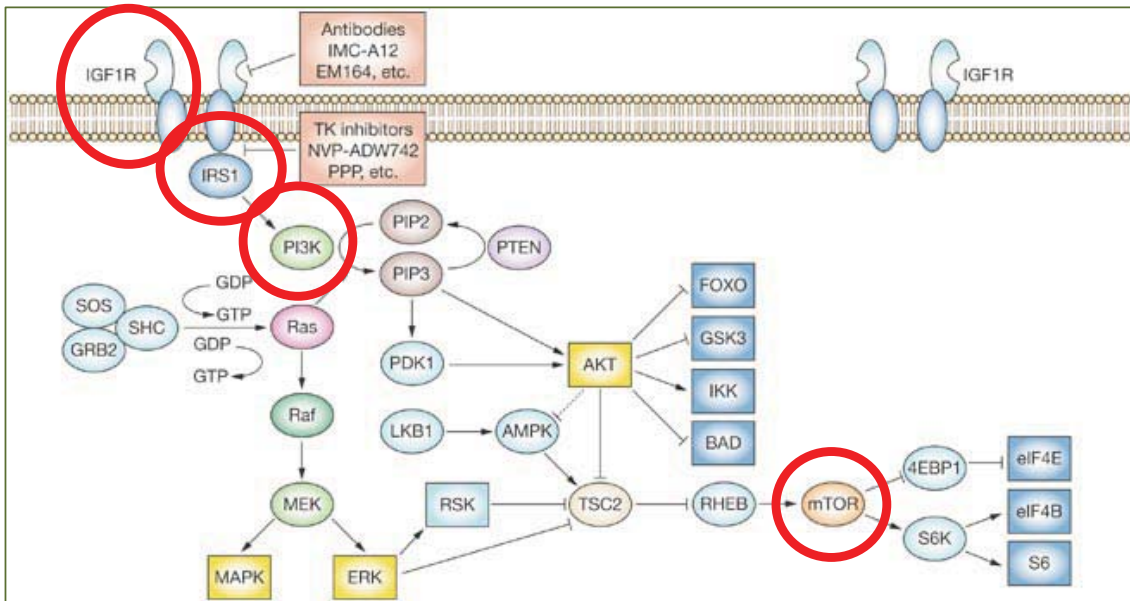


Figura 58. Vies de senyalització relacionades amb els microRNAs plasmàtics associats amb obesitat materna. Les vies de regulació de secreció d'insulina, IRS o IGF1R o mTOR són algunes de les vies de senyalització associades als microRNAs alterats en obesitat gestacional i que tenen una implicació en la regulació cel·lular.

3.- microRNAs en placenta

3.1. Perfil de microRNA placentaris en obesitat

Fins a la data, s'han descrit més de 500 microRNAs expressats en placenta humana, ja sigui en teixit de placenta o en cèl·lules aïllades del trofoblast (157-160). En aquest treball hem detectat l'expressió de 486 microRNAs en placenta de segon trimestre de la gestació, dels quals 14 eren presents només en el grup control, 15 en el grup de mares amb OBGest i 13 al grup de mares amb OBPre. 404 microRNAs van ser presents en tots els grups d'estudi. D'aquests microRNAs placentaris comuns, 18 van ser expressats diferencialment en placentes de dones amb obesitat en comparació amb el grup control. 8 d'ells s'expressaven de forma disminuïda, 5 en el grup de dones OBPre i OBGest i 3 només en el grup de dones amb OBGes. Al igual que en l'estudi d'expressió de microRNAs en plasma, cap microRNA va ser diferentment expressat en el grup de dones amb OBPre. Alguns d'aquests microRNAs ja s'havien relacionat anteriorment amb l'obesitat o la diabetis. El miR-100 està infraexpressat en teixit adipós de pacients obesos i regula les vies IGFR i mTOR a nivell d'adipogènesis (161). El miR-181 també participa en la regulació de l'adipogènesis en model animal, activant la via de senyalització WNT (162). Finalment, el miR-185 es postula com a regulador de les malalties periodontals en pacients obesos (163).

3.2. Associació amb paràmetres metabòlics materns relacionats amb l'obesitat

Els nostres resultats mostren que la majoria dels microRNAs placentaris identificats com a diferencials en l'obesitat materna en placenta s'associen amb paràmetres metabòlics durant la gestació. Així, la majoria s'associa amb d'adiponectina d'alt pes molecular, i amb colesterol HDL, HOMA-IR i pèptid C.

D'aquests, el miR-185 és el més estudiat. Els diversos estudis demostren que s'associa amb diabetis o alteracions lipídiques, i que està infraexpressat en comparació a pacients sense alteracions metabòliques. Bao i col. (2015) demostren que el miR-185 està disminuït en rates diabètiques, i que disminueix la secreció d'insulina i creixement

de cèl·lules pancreàtiques mitjançant la regulació del seu gen diana *SOCS3*. La creació d'un *microRNA-mimic del miR-185* permet inhibir aquests efectes i millorar l'estat diabetogènic de la rata (164). Wang et al. (2014) demostren el seu efecte a nivell hepàtic i com afecta al metabolisme lipídic i a la resistència a la insulina (165). Tots ells conclouen que el miR-185 podria ser un bon biomarcador i una possible diana terapèutica en diabetis (166-168).

3.3. Associació amb creixement pre i postnatal

Dels microRNAs placentaris expressats diferencialment en l'obesitat materna, els miR-100-3p, miR-296-5p, miR-487a-3p i miR-1285-3p es van associar amb un menor pes al néixer però a un major augment de pes als 1, 4 i/o 12 mesos de vida (figura 59).

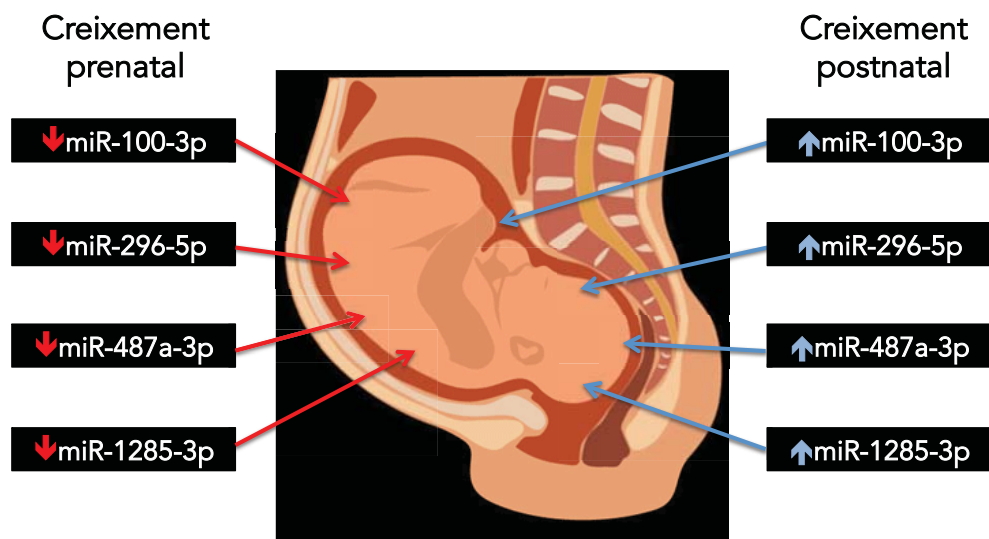


Figura 59. *microRNAs placentaris relacionats amb el creixement prenatal (esquerra) i postnatal (dreta).* Els miR-100-3p, miR-296-5p, miR-487a-3p i miR-1285-3p es relacionen negativament (fletxes vermelles) amb el creixement prenatal; i es relacionen positivament (fletxes blaves) amb el creixement postnatal.

El miR-100 ha estat descrit anteriorment en placenta i està infraexpressat en placentes de fetus amb restricció del creixement intrauterí (169). Estudis *in vitro* han demostrat que regula les vies de senyalització IGFR i mTOR i té efectes sobre l'adipogènesi (161). També el miR-296 està alterat en gestacions amb preeclàmpsia, en aquest cas sobreexpressat, tant en placenta com en plasma (122, 170, 171).

El miR-487 ha estat descrit anteriorment en embaràs, és produït predominantment per la placenta, i es detecta només en mostres de plasma de primer trimestre (172). El miR-1285 ha estat relacionat amb els efectes de la suplementació amb betaïna durant la gestació, que atenua la lipogènesi hepàtica en els garrins nous nats (173). També en porcs, el miR-1285 regula les vies AMPK i mTOR en les cèl·lules de Sertoli, i es postula que podria ser una diana terapèutica per a la millora de l'esperma porcí (174).

3.4. Associació a vies funcionals

Segons l'anàlisi *in silico* utilitzant la base de dades miRSystem, els microRNAs placentaris expressats diferencialment en obesitat materna s'han relacionat amb les vies de senyalització WNT, MAPK, IGF-1 i mTOR (175) (figura 60).

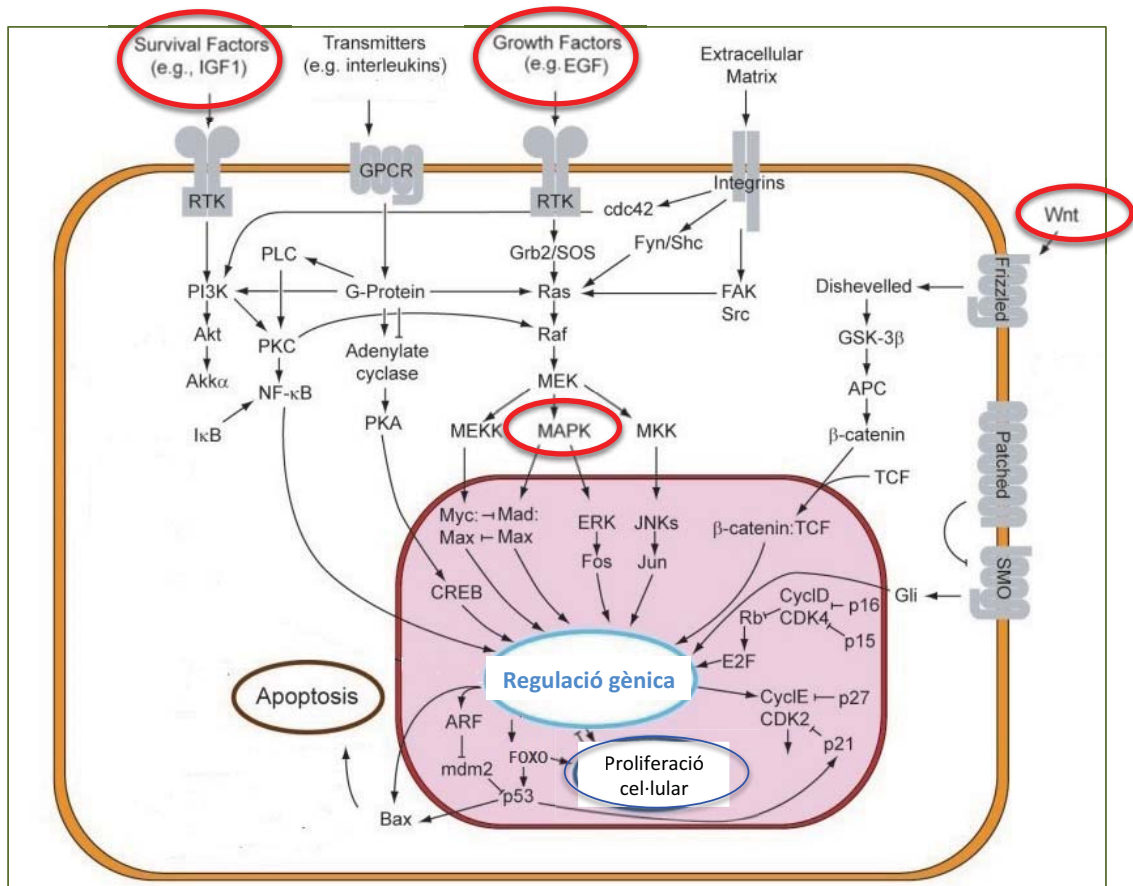


Figura 60. Vies de senyalització a les quals s'associen els microRNAs placentaris associats a obesitat materna. Les vies de senyalització Wnt i MAPK són algunes de les vies de senyalització associades als microRNAs alterats en obesitat gestacional i que tenen una implicació en la regulació cel·lular.

Les vies mTOR i insulina/IGF-1 en placenta, són reguladores positives del transport d'aminoàcids, estan sobreactivades en mares obeses i s'associen amb sobrecreixement fetal (61).

La via de les MAPK també s'ha demostrat que controla la invasió del trofoblast humà, i per tant regula el creixement fetal. La via WNT també té un paper en el desenvolupament humà i en l'organogènesi (176, 177).

Per tant, i d'acord amb la bibliografia revisada, podem parlar d'un possible paper dels miR-100-3p, miR-1285-3p, miR-296-5p i miR-487a-3p en la modulació del creixement pre i postnatal.

3.5. Localització cromosòmica

Un fet remarcable pel que fa als microRNAs de placenta humana, és la procedència de dos grups genòmics localitzats en el cromosoma 19 (clúster 19 (C19MC)) i el cromosoma 14 (clúster 14 (C14MC)) (92). D'acord amb aquesta observació, els microRNAs placentaris expressats diferencialment en el nostre estudi provenen un 15% del cromosoma 19 i un 11% del cromosoma 14.

Hromadnikova i col. (2104) descriuen com el perfil d'expressió de C19MC en placenta relacionat amb estats hipertensius de l'embaràs es pot detectar en plasma de primer trimestre de gestació i per tant pot predir complicacions obstètriques (127, 178). No obstant això, entre els microRNAs placentaris associats a l'obesitat materna observats en el nostre estudi, només el miR-520h es troba en el clúster 19 C19MC. El miR-520h s'incrementa en plasma de segon trimestre d'OBPre i OBGest en comparació amb les dones del grup control. Per contra, no es van observar diferències significatives en la seva expressió en teixit placentari.

4.- Presència de microRNAs específics de placenta en el plasma matern

Els microRNAs específics de placenta poden ser alliberats a la circulació i per tant ser detectats en plasma matern (104). La seva concentració i perfils en plasma poden reflectir l'estat fisiològic o patològic de la gestació i això els fa possibles candidats com a biomarcadors per a la detecció de complicacions de l'embaràs vinculats a patologies placentàries (123).

En el nostre treball, la majoria dels microRNAs expressats en placenta de forma específica en cada grup d'estudi no estaven presents en les mostres de plasma, a excepció del miR-16-1-3p, detectat tant en placenta com en plasma del grup control; dels miR-124-5p i miR-590-3p específics del grup OBGest i del miR-144-3p que va ser expressats també en plasma de OBPre. Per tant, als que es detecten en plasma se'ls podria adjudicar una funció endocrina mentre que als que no hi són presents se'ls podria adjudicar una funció autocrina i/o paracrina. De tots ells, el miR-144-3p ja ha estat descrit com a potencial marcador diagnòstic de complicacions associades a l'embaràs com la preeclàmpsia (123). A més, s'ha relacionat amb el metabolisme de la glucosa mitjançant la regulació de les vies de senyalització GLUT1 i IRS1 (180, 181). El miR-590-3p ha estat descrit com a regulador de l'expressió de la via de la lactat-deshidrogenasa A (LDH-A). L'expressió de LDH-A està augmentada en DM2, i la supressió de la seva expressió mitjançant la transferència de miR-590-3p millora el metabolisme de la glucosa en model en animal (182). Per contra, els miR-16-1-3p i miR-124-5p no han estat relacionats fins ara amb obesitat ni creixement, però sí que s'ha descrit la seva funció a nivell oncològic (183, 184).

Seguidament, hem estudiat la presència en plasma dels microRNAs placentaris amb expressió diferencial en obesitat materna, i s'ha observat que pocs dels microRNAs placentaris estudiats es van detectar en el plasma. Entre ells, el miR-296-5p està disminuït en plasma de gestants OBPre i OBGest en comparació amb les Controls, igual que en les mostres de placenta. S'observa, per tant, una associació dels microRNAs en plasma i placenta, suggerint que els microRNAs placentaris poden ser secretats a la sang.

A més, el miR-296-5p circulant s'associa amb el pes de la placenta, el pes i longitud en néixer i l'augment de pes als 12 mesos. Concretament, el miR-296-5p juntament amb l'edat gestacional explicarien el 24,3% del pes del nadó al néixer, i per si sol, explicaria un 12% de l'augment de pes als 12 mesos de vida. Aquests resultats reforcen el possible paper del miR-296-5p a nivell de placenta en la regulació del creixement pre i postnatal. Cal remarcar que el miR-296-5p, tant en placenta com en plasma, presenta una relació oposada pel que fa al creixement, doncs l'associació amb el pes al néixer és negativa mentre que amb l'augment de pes postnatal és positiva. Així, a més expressió de miR-296-5p al segon trimestre, menys pes al néixer, i més augment de pes als 12 mesos de vida. Això suggereix que pot ser un biomarcador en sang, a mitjans de la gestació, per a la seqüència de restricció prenatal i posterior creixement recuperador o *catch-up* (figura 61). Aquesta seqüència es relaciona amb la resistència a la insulina, l'augment d'adipositat i els efectes associats. El nostre equip de recerca ha estudiat àmpliament els efectes d'aquest creixement recuperador entre els que s'inclouen: adipositat central, hiperinsulinèmia, hipoadiponictèmia i hiperleptinèmia, dislipèmia i maduració òssia accelerada (185-187).

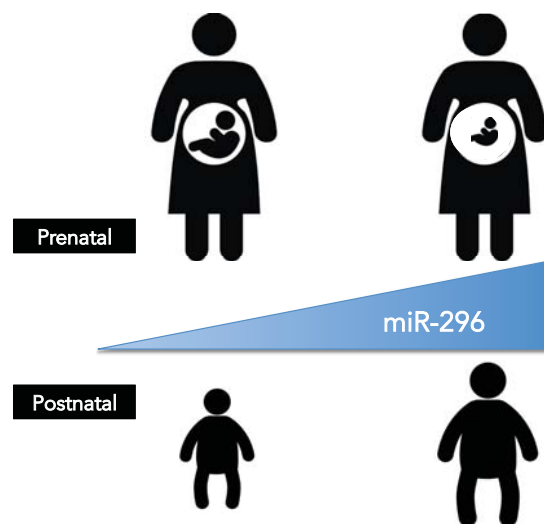


Figura 61. Efectes de miR-296-5p sobre el creixement pre i postnatal. El miR-296 podria tenir un efecte en la programació fetal, doncs l'augment d'aquest en placenta i en plasma de segon trimestre de mares obeses s'associa a menor pes al naixement, i posteriorment a un major augment de pes als 12 mesos de vida, suggerint així un possible efecte sobre el creixement recuperador, *catch-up*.

Estudis futurs poden ajudar a determinar si un valor de miR-296-5p en placenta i/o plasma elevat pot ser predictiu del *catch-up* postnatal, i contribuir a guiar obstetres i pediatres per tal d'evitar aquesta seqüència i els seus efectes a llarg termini.

La discrepància entre l'expressió de microRNAs de placenta i la seva detecció en plasma s'ha descrit també en altres trastorns de l'embaràs (188). Però la falta de correlació entre ambdós mostres és intrigant. Aquest fet podria reflectir processos en els que la disfunció placentària atenua la biogènesi de microRNAs i/o altera l'alliberament de microRNAs al plasma mitjanant o no exosomes. Calen més investigacions al respecte per comprendre millor com els microRNAs específics de placenta s'alliberen a la circulació materna. No obstant això, l'efecte sobre el creixement fetal dels microRNAs que no s'alliberen al plasma matern pot ser exercit a través d'una regulació paracrina entre el trofoblast i les cèl·lules fetals a través de la circulació fetal, o per una regulació autocrina dels mateixos trofoblasts mitjançant l'alliberació de proteïnes que participen en la regulació del creixement fetal.

5.- Discussió general

Els estudis epidemiològics i experimentals de les últimes dècades han revelat un paper important del desenvolupament prenatal i postnatal precoç en les malalties cròniques i prevalents de l'adult com l'obesitat, la diabetes tipus 2 i les malalties cardiovasculars. Tot i que els factors ambientals expliquen en gran part l'augment de població obesa, els factors genètics i epigenètics, i la influència de la vida intrauterina sobre el futur del descendent semblen tenir cada dia un paper més definit, i podrien explicar entre el 40 i el 90% de la variació en l'IMC del fill (189). Estudiar els mecanismes de la programació metabòlica és clau per entendre i evitar l'obesitat infantil i les malalties metabòliques en l'edat adulta.

Però desconeixem com identificar la població de risc de desenvolupar aquestes malalties. En aquest context, les marques epigenètiques, com els microRNAs en mostres biològiques durant l'embaràs i al naixement, poden constituir valuosos elements predictors per a la identificació de població susceptible de desenvolupar malalties prevalents de l'adult després d'un ambient prenatal desfavorable.

Els resultats obtinguts d'aquest treball han permès la identificació del perfil de microRNAs en plasma i placenta d'embarassades amb obesitat pregestacional i gestacional i han permès relacionar aquests microRNAs diferencials amb paràmetres endocrinometabòlics durant l'embaràs i amb paràmetres de creixement pre i postnatal. Concretament hem identificat 13 microRNAs que estan desregulats en plasma de segon trimestre de gestació de mares obeses: miR-29c, miR-30a-5p, miR-99b, miR-103, miR-122, miR-130a, miR-150, miR-221, miR-324-3p, miR-340, miR-375, miR-625, miR-652; entre els quals el miR-375 presenta una bona precisió discriminatòria per a l'obesitat pregestacional i els miR-30a-5p, miR-103, miR-130a, miR-221, miR-323-3p i miR-652 presenten una bona o acceptable precisió discriminatòria per a l'obesitat gestacional. A més, miR-29c, miR-128a, miR-221, miR-340, miR-423-5p i miR-652 són predictors de creixement pre i postnatal. En placenta, hem identificat 8 microRNAs desregulats en obesitat materna: miR-100-3p, miR-181a-3p, miR-185-5p, miR-214-3p, miR-296-5p, miR-487a-3p, miR-1269a, miR-1285-3p;

dels quals, miR-100-3p, miR-296-5p i miR-487a-3p i miR-1285-3p es relacionen amb paràmetres de creixement pre i postnatal.



Figura 62. Esquema resum dels microRNAs plasmàtics i placentaris relacionats amb el creixement prenatal (blau) i postnatal (vermell). El miR-296-5p, present en plasma i placenta, s'associa en ambdues mostres amb un menor pes al naixement i un major augment de pes als 12 mesos de vida.

Entre tots els microRNAs estudiats, cal destacar el miR-296-5p, present tant en placenta com en plasma de segon trimestres de gestació, que es troba disminuït en embarassades amb obesitat pregestacional i gestacional respecte les embarassades control i que s'associa a menor pes al naixement i major augment de pes als 12 mesos de vida.

Aquesta tesi proporciona la identificació del perfil de microRNAs en obesitat materna i evidencia que la placenta respon a l'ambient matern obesogènic expressant un perfil de microRNAs placentari específic. A més, aporta resultats originals sobre nous biomarcadors alterats en obesitat materna que poden ser d'utilitat per predir el creixement pre i postnatal de la descendència i identificar la població en risc de desenvolupar malalties metabòliques en l'edat adulta.

Perspectives de futur

Aquests resultats no només tenen un valor diagnòstic i pronòstic, sinó també de prevenció i tractament d'events epigenètics desfavorables sobre els que es pot actuar revertint o atenuant la programació metabòlica. Donada l'alta càrrega socio sanitària que suposa el tractament de les malalties prevalents de l'edat adulta descrites, el diagnòstic i prevenció precoces de les mateixes és prioritari. El següent pas serà demostrar si les intervencions sobre aquests microRNAs pot evitar els efectes adversos de l'obesitat gestacional en la mare o en la seva descendència.

6.- Limitacions

Reconeixem les limitacions del nostre estudi:

- 1) La naturalesa transversal del nostre estudi no ens permet deduir una relació causal entre microRNAs circulants i el metabolisme durant l'embaràs. No obstant això, el reconeixement de nous biomarcadors de malalties metabòliques també és rellevant des del punt de vista clínic i de salut pública.
- 2) El nombre de subjectes a estudi és reduït, i limitat a ètnia caucàsica, i per tant no extrapolable a altres ètnies.
- 3) La creació de grups d'estudi purs, dels que s'han exclòs les mares amb diabetis gestacional, així com els nadons efectes de retard de creixement, poden haver limitat la detecció de microRNAs relacionats amb l'obesitat materna i/o amb el creixement fetal.
- 4) Per avaluar el potencial valor diagnòstic i/o pronòstic d'aquests microRNAs caldria un estudi prospectiu i amb més nombre de subjectes, principalment en el seguiment postnatal, on el nostre estudi va ser limitat a 60 nounats, que és un 85% de la població original de l'estudi, fet que implica un risc de biaix.
- 5) El seguiment és limita als 12 de mesos de vida. L'estudi a més llarg termini, en l'adolescència i fins i tot a l'edat adulta, aportaria més informació sobre la relació d'aquests miRNA i la obesitat a llarg termini del descendent
- 6) Tenint en compte que les concentracions dels microRNAs plasmàtics poden variar al llarg de l'embaràs, els nostres resultats corresponen al segon trimestre de gestació i no són extrapolables a altres estadis de gestació.

CONCLUSIONS

L'obesitat pregestacional i gestacional s'associa amb alteracions en el perfil de microRNAs en plasma de segon trimestre i en placenta. Alguns d'aquests microRNAs desregulats en obesitat materna s'associen amb paràmetres endocrinometabòlics de la mare durant la gestació i amb el creixement pre i postnatal de la descendència.

En plasma,

1.- S'han identificat 13 microRNAs desregulats en obesitat materna, 9 dels quals estan disminuïts en obesitat (miR-29c, miR-99b, miR-103, miR-122, miR-221, miR-324-3p, miR-340, miR-375 i miR-652) i 4 estan augmentats (miR-30a-5p, miR-130, miR-150 i miR-625) respecte les embarassades control.

2.- El miR-375 presenta una bona precisió discriminatòria per a l'obesitat pregestacional i els miR-30a-5p, miR-103, miR-130a, miR-221, miR-323-3p i miR-652 presenten una bona o acceptable precisió discriminatòria per a l'obesitat gestacional.

3.- La majoria dels microRNAs expressats diferencialment en plasma s'associen significativament amb paràmetres metabòlics materns incloent-hi la tolerància a la glucosa, la sensibilitat a la insulina i/o la concentració de lípids sèrics.

4.- Els microRNAs miR-340, miR-423-5p i miR-652 presenten una associació negativa amb els paràmetres de creixement prenatal, i els microRNAs miR-29c, miR-128a i miR-221 presenten una associació negativa amb els paràmetres de creixement postnatal durant els primers 12 mesos de vida. Estudis *in silico* mostren que aquests microRNAs estan realcionats amb rutes de senyalització de la insulina i proliferació cel·lular (regulació de secreció de la insulina, IGF1, MAPK i mTOR)

En placenta,

5.- S'han identificat 8 microRNAs desregulats en obesitat materna (miR-100-3p, miR-181, miR-185-5p, miR-214-3p, miR-296-5p, miR-487a-3p, miR-1269a i miR-1285-3p)

tots ells estan disminuïts en obesitat pregestacional i/o gestacional respecte les embarassades control.

6.- Els miR-181q-3p, miR-185-5p, miR-214-3p, miR-296-5p, miR-487a-3p, miR-1269a i 1285-3p s'associen significativament amb paràmetres metabòlics materns (adiponectina-APM, HDL-c, HOMA-IR i pèptid-C).

7.- Els miR100-3p, miR-296-5p, miR-487a-3p i miR-1285-3p, s'associen negativament amb el creixement prenatal i positivament amb el creixement postnatal durant els primers 12 mesos de vida. Estudis *in silico* mostren que aquests microRNAs estan relacionats amb rutes de proliferació cel·lular (MAPK, WNT).

8.- La majoria de microRNAs placentaris desregulats en obesitat materna són específics d'aquest teixit i no es troben circulants en plasma. Però cal destacar el miR-296-5p, que es troba present tant en placenta com en plasma matern i l'expressió en ambdós mostres s'associa entre ells i amb paràmetres de creixement pre i postnatal.

BIBLIOGRAFIA

1. Sewell MF, Huston-Presley L, Amini SB, Catalano PM. Body mass index: a true indicator of body fat in obese gravidas. *J Reprod Med*. 2007;52(10):907-11.
2. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1111-9.
3. Wilson PW, Grundy SM. The metabolic syndrome: a practical guide to origins and treatment: Part II. *Circulation*. 2003;108(13):1537-40.
4. Wilson PW, Grundy SM. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I. *Circulation*. 2003;108(12):1422-4.
5. Fernandez-Berges D, Cabrera de Leon A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, et al. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(3):241-8.
6. McIntyre HD, Chang AM, Callaway LK, Cowley DM, Dyer AR, Radaelli T, et al. Hormonal and metabolic factors associated with variations in insulin sensitivity in human pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(2):356-60.
7. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
8. Sirimi N, Goulis DG. Obesity in pregnancy. *Hormones (Athens)*. 2010;9(4):299-306.
9. Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zuniga A, Corona JT, Melendez F, et al. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril*. 2003;79(5):1136-40.
10. Catalano PM. The impact of gestational diabetes and maternal obesity on the mother and her offspring. *J Dev Orig Health Dis*. 2010;1(4):208-15.
11. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG*. 2006;113(10):1126-33.
12. Baugh N, Harris DE, Aboueissa AM, Sarton C, Lichter E. The Impact of Maternal Obesity and Excessive Gestational Weight Gain on Maternal and Infant Outcomes in Maine: Analysis of Pregnancy Risk Assessment Monitoring System Results from 2000 to 2010. *J Pregnancy*. 2016;2016:5871313.

13. Guelinckx I, Devlieger R, Beckers K, Vansant G. Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. *Obes Rev.* 2008;9(2):140-50.
14. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril.* 2008;90(3):714-26.
15. Bellver J, Cruz F, Martinez MC, Ferro J, Ramirez JF, Pellicer A, et al. Female overweight is not associated with a higher embryo euploidy rate in first trimester miscarriages karyotyped by hysteroembryoscopy. *Fertil Steril.* 2011;96(4):931-3.
16. Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(4):1091-7.
17. Ferraro ZM, Contador F, Tawfiq A, Adamo KB, Gaudet L. Gestational weight gain and medical outcomes of pregnancy. *Obstet Med.* 2015;8(3):133-7.
18. Ricart W, Lopez J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, Gonzalez N, et al. Body mass index has a greater impact on pregnancy outcomes than gestational hyperglycaemia. *Diabetologia.* 2005;48(9):1736-42.
19. McDonald SD, Han Z, Mulla S, Beyene J. Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses. *BMJ.* 2010;341:c3428.
20. Halloran DR, Cheng YW, Wall TC, Macones GA, Caughey AB. Effect of maternal weight on postterm delivery. *J Perinatol.* 2012;32(2):85-90.
21. Sebire NJ, Jolly M, Harris JP, Wadsworth J, Joffe M, Beard RW, et al. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(8):1175-82.
22. Wispelwey BP, Sheiner E. Cesarean delivery in obese women: a comprehensive review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(6):547-51.
23. Kristensen J, Vestergaard M, Wisborg K, Kesmodel U, Secher NJ. Pre-pregnancy weight and the risk of stillbirth and neonatal death. *BJOG.* 2005;112(4):403-8.

24. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;301(6):636-50.
25. Ehrenberg HM, Mercer BM, Catalano PM. The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(3):964-8.
26. Sewell MF, Huston-Presley L, Super DM, Catalano P. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(4):1100-3.
27. Whitaker RC. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics*. 2004;114(1):e29-36.
28. Houghton LC, Ester WA, Lumey LH, Michels KB, Wei Y, Cohn BA, et al. Maternal weight gain in excess of pregnancy guidelines is related to daughters being overweight 40 years later. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(2):246 e1-8.
29. Hochner H, Friedlander Y, Calderon-Margalit R, Meiner V, Sagy Y, Avgil-Tsadok M, et al. Associations of maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain with adult offspring cardiometabolic risk factors: the Jerusalem Perinatal Family Follow-up Study. *Circulation*. 2012;125(11):1381-9.
30. Hemond J, Robbins RB, Young PC. The Effects of Maternal Obesity on Neonates, Infants, Children, Adolescents, and Adults. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(1):216-27.
31. ACOG Committee opinion no. 548: weight gain during pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;121(1):210-2.
32. Davis EM, Stange KC, Horwitz RI. Childbearing, stress and obesity disparities in women: a public health perspective. *Matern Child Health J*. 2012;16(1):109-18.
33. Mehta UJ, Siega-Riz AM, Herring AH. Effect of body image on pregnancy weight gain. *Matern Child Health J*. 2011;15(3):324-32.
34. Siega-Riz AM, Viswanathan M, Moos MK, Deierlein A, Mumford S, Knaack J, et al. A systematic review of outcomes of maternal weight gain according to the Institute of Medicine recommendations: birthweight, fetal growth, and postpartum weight retention. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(4):339 e1-14.

35. Karachaliou M, Georgiou V, Roumeliotaki T, Chalkiadaki G, Daraki V, Koinaki S, et al. Association of trimester-specific gestational weight gain with fetal growth, offspring obesity, and cardiometabolic traits in early childhood. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(4):502 e1-14.
36. Li N, Liu E, Guo J, Pan L, Li B, Wang P, et al. Maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain on offspring overweight in early infancy. *PLoS One*. 2013;8(10):e77809.
37. Catalano P, deMouzon SH. Maternal obesity and metabolic risk to the offspring: why lifestyle interventions may have not achieved the desired outcomes. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(4):642-9.
38. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr*. 2000;54 Suppl 1:S47-51.
39. Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, et al. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*. 2006;49(7):1677-85.
40. Haghiac M, Basu S, Presley L, Serre D, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Patterns of adiponectin expression in term pregnancy: impact of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3427-34.
41. Bajoria R, Sooranna SR, Ward BS, Chatterjee R. Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface. *Placenta*. 2002;23(2-3):103-15.
42. Walsh JM, Byrne J, Mahony RM, Foley ME, McAuliffe FM. Leptin, fetal growth and insulin resistance in non-diabetic pregnancies. *Early Hum Dev*. 2014;90(6):271-4.
43. Hauguel-de Mouzon S, Catalano P. Adiponectin: are measurements clinically useful in pregnancy? *Diabetes Care*. 2013;36(6):1434-6.
44. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(6 Pt 1):1667-72.
45. Guariguata L, Linnenkamp U, Beagley J, Whiting DR, Cho NH. Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(2):176-85.

46. O'Sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes*. 1964;13:278-85.
47. Gibson KS, Waters TP, Catalano PM. Maternal weight gain in women who develop gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*. 2012;119(3):560-5.
48. Langer O, Yogev Y, Xenakis EM, Brustman L. Overweight and obese in gestational diabetes: the impact on pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(6):1768-76.
49. Joffe GM, Esterlitz JR, Levine RJ, Clemens JD, Ewell MG, Sibai BM, et al. The relationship between abnormal glucose tolerance and hypertensive disorders of pregnancy in healthy nulliparous women. Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179(4):1032-7.
50. Mitanhez D, Burguet A, Simeoni U. Infants born to mothers with gestational diabetes mellitus: mild neonatal effects, a long-term threat to global health. *J Pediatr*. 2014;164(3):445-50.
51. Sacks DA, Liu AI, Wolde-Tsadik G, Amini SB, Huston-Presley L, Catalano PM. What proportion of birth weight is attributable to maternal glucose among infants of diabetic women? *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(2):501-7.
52. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2005;115(3):e290-6.
53. Dabelea D, Knowler WC, Pettitt DJ. Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. *J Matern Fetal Med*. 2000;9(1):83-8.
54. Vaarasmaki M, Pouta A, Elliot P, Tapanainen P, Sovio U, Ruukonen A, et al. Adolescent manifestations of metabolic syndrome among children born to women with gestational diabetes in a general-population birth cohort. *Am J Epidemiol*. 2009;169(10):1209-15.
55. Kaul P, Savu A, Nerenberg KA, Donovan LE, Chik CL, Ryan EA, et al. Impact of gestational diabetes mellitus and high maternal weight on the development of diabetes, hypertension and cardiovascular disease: a population-level analysis. *Diabet Med*. 2015;32(2):164-73.

56. Vrachnis N, Augoulea A, Iliodromiti Z, Lambrinouadaki I, Sifakis S, Creatsas G. Previous gestational diabetes mellitus and markers of cardiovascular risk. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:458610.
57. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008;61(12):1296-302.
58. Dimasuay KG, Boeuf P, Powell TL, Jansson T. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Front Physiol.* 2016;7:12.
59. Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of pregnancy.* 2012;2012:179827.
60. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction.* 2017;153(3):R97-R108.
61. Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Activation of placental insulin and mTOR signaling in a mouse model of maternal obesity associated with fetal overgrowth. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2016;310(1):R87-93.
62. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35(7):595-601.
63. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *Int J Epidemiol.* 2013;42(5):1215-22.
64. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(1):E83-7.
65. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol.* 2009;587(Pt 4):905-15.
66. Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, Metzger BE. Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care.* 1998;21 Suppl 2:B142-9.
67. Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves I, Alfaradhi MZ, Land JM, et al. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and

nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J.* 2013;27(1):379-90.

68. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.

69. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.

70. Tsochandaridis M, Nasca L, Toga C, Levy-Mozziconacci A. Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. *Biomed Res Int.* 2015;2015:294954.

71. Du T, Zamore PD. Beginning to understand microRNA function. *Cell Res.* 2007;17(8):661-3.

72. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007;17(3):118-26.

73. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell.* 2004;16(6):861-5.

74. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):219-30.

75. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 2007;129(6):1141-51.

76. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature.* 2007;447(7146):823-8.

77. Zekri L, Kuzuoglu-Ozturk D, Izaurralde E. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J.* 2013;32(7):1052-65.

78. Da Sacco L, Masotti A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region. *Int J Mol Sci.* 2012;14(1):480-95.

79. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(1):51-68.

80. Maziere P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*. 2007;12(11-12):452-8.
81. Min H, Yoon S. Got target? Computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp Mol Med*. 2010;42(4):233-44.
82. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3(9):e3148.
83. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
84. Ouyang Y, Mouillet JF, Coyne CB, Sadovsky Y. Review: placenta-specific microRNAs in exosomes - good things come in nano-packages. *Placenta*. 2014;35 Suppl:S69-73.
85. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.
86. Fu G, Brkic J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5519-44.
87. Mouillet JF, Chu T, Sadovsky Y. Expression patterns of placental microRNAs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011;91(8):737-43.
88. Mouillet JF, Ouyang Y, Coyne CB, Sadovsky Y. MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4 Suppl):S163-72.
89. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet*. 2010;19(18):3566-82.
90. Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med*. 2009;7:20.
91. Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Schmidt A, Chaiwangyen W, Markert UR. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta*. 2014;35 Suppl:S39-45.

92. Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Schoenleben M, Markert UR. Pregnancy-associated miRNA-clusters. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):51-61.
93. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9330-5.
94. Doridot L, Miralles F, Barboux S, Vaiman D. Trophoblasts, invasion, and microRNA. *Front Genet*. 2013;4:248.
95. Luo L, Ye G, Nadeem L, Fu G, Yang BB, Honarparvar E, et al. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 13):3124-32.
96. Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF. beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development*. 2002;129(12):2891-903.
97. Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, et al. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta8. *Oncogene*. 2011;30(7):806-21.
98. Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(8):E836-43.
99. Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Bayer A, Ouyang Y, et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(29):12048-53.
100. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, Noli L, Khalaf Y, Farcomeni A, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril*. 2016;105(1):225-35 e1-3.
101. Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1493-500.
102. Maccani MA, Avissar-Whiting M, Banister CE, McGonnigal B, Padbury JF, Marsit CJ. Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with

downregulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*. 2010;5(7):583-9.

103. Donker RB, Mouillet JF, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(4):273-9.

104. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-90.

105. Deiluiis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(1):88-101.

106. Shi Z, Zhao C, Guo X, Ding H, Cui Y, Shen R, et al. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ERalpha expression in estrogen-induced insulin resistance. *Endocrinology*. 2014;155(5):1982-90.

107. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care*. 2014;37(5):1375-83.

108. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Nonell L, Puigdecanet E, Rodriguez-Hermosa JI, et al. Surgery-Induced Weight Loss Is Associated With the Downregulation of Genes Targeted by MicroRNAs in Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(11):E1467-76.

109. Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):E1655-60.

110. Santovito D, De Nardis V, Marcantonio P, Mandolini C, Paganelli C, Vitale E, et al. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):E1681-5.

111. Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, et al. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of

insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics*. 2009;10:478.

112. Benatti RO, Melo AM, Borges FO, Ignacio-Souza LM, Simino LA, Milanski M, et al. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. *Br J Nutr*. 2014;111(12):2112-22.

113. Jacovetti C, Abderrahmani A, Parnaud G, Jonas JC, Peyot ML, Cornu M, et al. MicroRNAs contribute to compensatory beta cell expansion during pregnancy and obesity. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3541-51.

114. Nardelli C, Iaffaldano L, Ferrigno M, Labruna G, Maruotti GM, Quaglia F, et al. Characterization and predicted role of the microRNA expression profile in amnion from obese pregnant women. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(3):466-9.

115. Ghaffari N, Parry S, Elovitz MA, Durnwald CP. The Effect of an Obesogenic Maternal Environment on Expression of Fetal Umbilical Cord Blood miRNA. *Reprod Sci*. 2015;22(7):860-4.

116. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(3):261 e1-6.

117. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(2):178 e12-21.

118. Zhu XM, Han T, Sargent IL, Yin GW, Yao YQ. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(6):661 e1-7.

119. Zhang C, Li Q, Ren N, Li C, Wang X, Xie M, et al. Placental miR-106a approximately 363 cluster is dysregulated in preeclamptic placenta. *Placenta*. 2015;36(2):250-2.

120. Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li YX, et al. Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension*. 2014;63(6):1276-84.

121. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, et al. Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension*. 2012;59(2):265-73.
122. Choi SY, Yun J, Lee OJ, Han HS, Yeo MK, Lee MA, et al. MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray. *Placenta*. 2013;34(9):799-804.
123. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013;2013:970265.
124. Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z, et al. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction*. 2012;143(3):389-97.
125. Wang Y, Zhang Y, Wang H, Wang J, Pan Z, Luo S. Aberrantly up-regulated miR-20a in pre-eclamptic placenta compromised the proliferative and invasive behaviors of trophoblast cells by targeting forkhead box protein A1. *Int J Biol Sci*. 2014;10(9):973-82.
126. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2013;88(5):130.
127. Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Doucha J, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs can predict subsequent onset of gestational hypertension. *PLoS One*. 2014;9(12):e113735.
128. Maccani MA, Padbury JF, Marsit CJ. miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS One*. 2011;6(6):e21210.
129. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(8):e23925.
130. Ge Q, Zhu Y, Li H, Tian F, Xie X, Bai Y. Differential expression of circulating miRNAs in maternal plasma in pregnancies with fetal macrosomia. *Int J Mol Med*. 2015;35(1):81-91.
131. Hu L, Han J, Zheng F, Ma H, Chen J, Jiang Y, et al. Early second-trimester serum microRNAs as potential biomarker for nondiabetic macrosomia. *Biomed Res Int*. 2014;2014:394125.

132. Zhang JT, Cai QY, Ji SS, Zhang HX, Wang YH, Yan HT, et al. Decreased miR-143 and increased miR-21 placental expression levels are associated with macrosomia. *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3273-80.
133. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res.* 2016;7(2):68-74.
134. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine.* 2016;12:34-42.
135. Olson CM. Achieving a healthy weight gain during pregnancy. *Annual review of nutrition.* 2008;28:411-23.
136. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology.* 1982;143(1):29-36.
137. Chartoumpakis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, et al. Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PloS one.* 2012;7(4):e34872.
138. Murri M, Insenser M, Fernandez-Duran E, San-Millan JL, Escobar-Morreale HF. Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(11):E1835-44.
139. Kim C, Lee H, Cho YM, Kwon OJ, Kim W, Lee EK. TNFalpha-induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation. *FEBS letters.* 2013;587(23):3853-8.
140. Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clinical chemistry.* 2013;59(5):781-92.
141. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PloS one.* 2013;8(11):e79467.
142. Roderburg C, Mollnow T, Bongaerts B, Elfimova N, Vargas Cardenas D, Berger K, et al. Micro-RNA profiling in human serum reveals compartment-specific roles of miR-571 and miR-652 in liver cirrhosis. *PloS one.* 2012;7(3):e32999.

143. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism*. 2006;3(2):87-98.
144. Li Y, Song YH, Li F, Yang T, Lu YW, Geng YJ. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;381(1):81-3.
145. Abbas A, Grant PJ, Kearney MT. Role of IGF-1 in glucose regulation and cardiovascular disease. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2008;6(8):1135-49.
146. Xu P, Li Y, Zhang H, Li M, Zhu H. MicroRNA-340 Mediates Metabolic Shift in Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting Glucose Transporter-1. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2016;74(4):844-50.
147. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
148. Oken E, Rifas-Shiman SL, Field AE, Frazier AL, Gillman MW. Maternal gestational weight gain and offspring weight in adolescence. *Obstetrics and gynecology*. 2008;112(5):999-1006.
149. Armitage JA, Poston L, Taylor PD. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Frontiers of hormone research*. 2008;36:73-84.
150. Nicholas LM, Rattanaray L, MacLaughlin SM, Ozanne SE, Kleemann DO, Walker SK, et al. Differential effects of maternal obesity and weight loss in the periconceptual period on the epigenetic regulation of hepatic insulin-signaling pathways in the offspring. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(9):3786-96.
151. O'Tierney-Ginn P, Presley L, Myers S, Catalano P. Placental growth response to maternal insulin in early pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(1):159-65.

152. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology*. 2007;21(11):2785-94.
153. Wessels JM, Edwards AK, Khalaj K, Kridli RT, Bidarimath M, Tayade C. The microRNAome of pregnancy: deciphering miRNA networks at the maternal-fetal interface. *PloS one*. 2013;8(11):e72264.
154. Liu N, Tang LL, Sun Y, Cui RX, Wang HY, Huang BJ, et al. MiR-29c suppresses invasion and metastasis by targeting TIAM1 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters*. 2013;329(2):181-8.
155. Adlakha YK, Saini N. Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Molecular cancer*. 2014;13:33.
156. He XX, Guo AY, Xu CR, Chang Y, Xiang GY, Gong J, et al. Bioinformatics analysis identifies miR-221 as a core regulator in hepatocellular carcinoma and its silencing suppresses tumor properties. *Oncology reports*. 2014;32(3):1200-10.
157. Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, et al. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*. 2012;33(9):725-34.
158. Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, Morelli AE, et al. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular human reproduction*. 2012;18(8):417-24.
159. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, et al. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biology of reproduction*. 2009;81(4):717-29.
160. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics*. 2007;8:166.
161. Pek SL, Sum CF, Lin MX, Cheng AK, Wong MT, Lim SC, et al. Circulating and visceral adipose miR-100 is down-regulated in patients with obesity and Type 2 diabetes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2016;427:112-23.
162. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by

modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC genomics*. 2010;11:320.

163. Perri R, Nares S, Zhang S, Barros SP, Offenbacher S. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. *Journal of dental research*. 2012;91(1):33-8.

164. Bao L, Fu X, Si M, Wang Y, Ma R, Ren X, et al. MicroRNA-185 targets SOCS3 to inhibit beta-cell dysfunction in diabetes. *PloS one*. 2015;10(2):e0116067.

165. Wang XC, Zhan XR, Li XY, Yu JJ, Liu XM. MicroRNA-185 regulates expression of lipid metabolism genes and improves insulin sensitivity in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(47):17914-23.

166. Delic D, Eisele C, Schmid R, Luippold G, Mayoux E, Grempler R. Characterization of Micro-RNA Changes during the Progression of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(5).

167. Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, et al. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2012;55(7):2032-43.

168. Yang M, Liu W, Pellicane C, Sahyoun C, Joseph BK, Gallo-Ebert C, et al. Identification of miR-185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake. *Journal of lipid research*. 2014;55(2):226-38.

169. Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Krofta L. Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Associated microRNAs Are Dysregulated in Placental Tissues Affected with Gestational Hypertension, Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *PloS one*. 2015;10(9):e0138383.

170. Murphy MS, Casselman RC, Tayade C, Smith GN. Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015;213(3):367 e1-9.

171. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reproductive sciences*. 2011;18(1):46-56.

172. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, et al. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1767-71.

173. Cai D, Wang J, Jia Y, Liu H, Yuan M, Dong H, et al. Gestational dietary betaine supplementation suppresses hepatic expression of lipogenic genes in neonatal piglets through epigenetic and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1861(1):41-50.
174. Jiao ZJ, Yi W, Rong YW, Kee JD, Zhong WX. MicroRNA-1285 Regulates 17beta-Estradiol-Inhibited Immature Boar Sertoli Cell Proliferation via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology*. 2015;156(11):4059-70.
175. Lu TP, Lee CY, Tsai MH, Chiu YC, Hsiao CK, Lai LC, et al. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PloS one*. 2012;7(8):e42390.
176. Eberhart CG, Argani P. Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2001;4(4):351-7.
177. Knofler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(2-3):269-80.
178. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, Pirkova P, Kestlerova A, Novotna V, et al. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. *DNA and cell biology*. 2015;34(6):437-57.
179. Zhao Z, Moley KH, Gronowski AM. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clinical biochemistry*. 2013;46(10-11):953-60.
180. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PloS one*. 2011;6(8):e22839.
181. Liu M, Gao J, Huang Q, Jin Y, Wei Z. Downregulating microRNA-144 mediates a metabolic shift in lung cancer cells by regulating GLUT1 expression. *Oncology letters*. 2016;11(6):3772-6.

182. Chen Y, Wang X, Shao X. A Combination of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Endoderm Transplant with LDHA-Repressing miRNA Can Attenuate High-Fat Diet Induced Type II Diabetes in Mice. *Journal of diabetes research*. 2015;2015:796912.
183. Wang T, Hou J, Li Z, Zheng Z, Wei J, Song D, et al. miR-15a-3p and miR-16-1-3p Negatively Regulate Twist1 to Repress Gastric Cancer Cell Invasion and Metastasis. *International journal of biological sciences*. 2017;13(1):122-34.
184. Chen Q, Lu G, Cai Y, Li Y, Xu R, Ke Y, et al. MiR-124-5p inhibits the growth of high-grade gliomas through posttranscriptional regulation of LAMB1. *Neuro-oncology*. 2014;16(5):637-51.
185. Ibanez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(6):2153-8.
186. Sebastiani G, Diaz M, Bassols J, Aragonés G, Lopez-Bermejo A, de Zegher F, et al. The sequence of prenatal growth restraint and post-natal catch-up growth leads to a thicker intima-media and more pre-peritoneal and hepatic fat by age 3-6 years. *Pediatric obesity*. 2016;11(4):251-7.
187. Ibanez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, de Zegher F. Catch-up growth in girls born small for gestational age precedes childhood progression to high adiposity. *Fertility and sterility*. 2011;96(1):220-3.
188. Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. Absolute and relative quantification of placenta-specific micromnas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012;14(2):160-7.
189. Dubois L, Ohm Kyvik K, Girard M, Tatone-Tokuda F, Perusse D, Hjelmborg J, et al. Genetic and environmental contributions to weight, height, and BMI from birth to 19 years of age: an international study of over 12,000 twin pairs. *PloS one*. 2012;7(2):e30153.