



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio de factores moleculares y séricos durante la
gestación en la rata y en el humano**

Maria Fernanda Garcés Gutiérrez

Universidad Nacional de Colombia
Programa Interfacultades de Doctorado en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Bogotá D.C., Colombia
2016

Estudio de factores moleculares y séricos durante la gestación en la rata y en el humano

Maria Fernanda Garcés Gutiérrez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Director:

PhD., MSc., Químico. Jorge Eduardo Caminos Pinzón

Codirector:

MSc., MEd., MD. Ariel Iván Ruiz Parra

Línea de Investigación:

Estudio de las bases moleculares de la fisiología de la gestación.

Grupo de Investigación:

Endocrinología y nutrición básica.

Universidad Nacional de Colombia

Programa Interfacultades de Doctorado en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C., Colombia

2016

Este trabajo lo dedico a cada persona que acompaño de forma paciente y desinteresada la ejecución del mismo, desde los pacientes, investigadores, profesores y consultores, hasta mi director de tesis y amigo incondicional y por supuesto mi familia, quienes nunca perdieron la fe en mí.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el marco del proyecto “Valor de biomarcadores séricos en la predicción del desenlace materno-perinatal de la gestante y su evolución a 6 meses”, el cual fue un proyecto financiado por Colciencias código: 110154531660. Adicionalmente, se recibió el apoyo en la convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015.

Un componente del presente trabajo, se realizó en los consultorios de Promoción y Prevención del Hospital del Engativá, Bogotá D.C. bajo la dirección de los docentes del Departamento de Gineco-Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y con la colaboración permanente del personal de enfermería de Promoción y prevención entre los años 2012 a 2014. Labor sin la cual, el presente trabajo habría sido posible.

El presente, constituye un componente de seguimiento multidisciplinario en el cual intervinieron profesionales de áreas médicas y sociales, cuyos aportes es justo reconocer, ya que gracias a esta multidisciplinariedad y a la competencia de este equipo, fue posible la realización del mismo y la proyección que este estudio ha alcanzado. En este sentido en el área médica quisiera agradecerles al Dr. Ariel Ruiz y la Dra. Edith Ángel quienes participaron desde el diseño y la ejecución del proyecto, hasta el análisis de los resultados. El Dr. Mario Parra, quien realizó el seguimiento mediante análisis de imágenes diagnósticas a las pacientes, en los dos años de seguimiento.

Estudio de factores moleculares y séricos durante la gestación en la rata y en el humano

La Dra. Alexandra Rovira, medica encargada del seguimiento de las pacientes, la Dra. Lucia Alejandra Torres, bacterióloga encargada de la captación y procesamiento de muestras en el componente clínico. La Dra. Natalia Elvira Poveda, nutricionista a cargo del seguimiento de las pacientes y la Dra. Yurani Curtidor, trabajadora social del proyecto quien asumió de forma responsable y diligente, la labor de garantizar la adherencia en un proyecto que requería un seguimiento individual por más de un año. Además quisiera agradecer al Ing. Luis Guillermo Leal, quien diligente y acertadamente nos apoyo en el análisis de datos provenientes del secuenciamiento. Sin embargo, todo este engranaje no habría sido posible sin la dirección de un profesional con altas capacidades en planeación y coordinación de proyectos, como lo es el profesor Jorge Eduardo Caminos, quien comprendió desde el inicio las virtudes del equipo de trabajo y el gran potencial del proyecto, lo que hizo posible el éxito en el desarrollo del mismo.

Resumen

La gestación es un estado fisiológico dinámico, que se caracteriza por cambios transitorios en la fisiología materna, los cuales garantizan la viabilidad del feto. La placenta es un órgano transitorio, que soporta una gran cantidad de funciones metabólicas y endocrinas en la madre y constituye el principal medio de comunicación entre la madre y el feto.

El entendimiento de los diferentes procesos de adaptabilidad que tienen lugar en la placenta, requieren del estudio de modelos que expliquen los mecanismos moleculares que subyacen a la fisiología placentaria. De esta manera, la rata ha sido considerada como un modelo animal en el estudio de la reproducción femenina y durante la gestación, dada la similitud en las características anatómicas y de invasión que presenta la placenta de la rata en comparación con la placenta humana.

De esta manera, en el presente estudio se realizó un abordaje traslacional, a partir del análisis del transcriptoma de la placenta de la rata durante tres periodos de la gestación, hacia la fisiología de la gestación humana. Se realizó el seguimiento de una cohorte longitudinal a un grupo de mujeres de Bogotá, durante tres periodos de la gestación y tres meses posparto. Adicionalmente, en el presente estudio, se analizó un subgrupo de mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia, de la misma cohorte.

Es así, como a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se hace un aporte a la comprensión de la fisiología de la gestación humana, mediante un abordaje en modelo animal de rata.

Palabras clave: RNA mensajero, microRNA, gestación, placenta, preeclampsia.

Abstract

Pregnancy is a dynamic physiological condition characterized by transient changes in maternal physiology, which guarantee the viability of the fetus. The placenta is a temporary organ, which supports a large number of metabolic and endocrine functions in the mother and is the primary means of communication between mother and fetus.

Understanding the different adaptability processes taking place in the placenta, require the study of models that explain the molecular mechanisms underlying placental physiology. Thus, the rat has been regarded as an animal model for the study of female reproduction and during pregnancy, given the similarity in the anatomical and invasion characteristics presented by the rat placenta compared with human placenta.

Thus, in this study a translational approach was used, based on the analysis of the transcriptome of the rat placenta during three periods of gestation, to the physiology of human pregnancy. Tracking a longitudinal cohort a group of women from Bogotá, for three periods of pregnancy and three months postpartum was performed. Additionally, in the present study, a subset of pregnant women with diagnosis of preeclampsia, from the same cohort were studied.

Thus, as from the results obtained in this work, a contribution to the understanding of the physiology of human pregnancy is done through an approach in rat animal model.

Keywords: messenger RNA, microRNA, gestation, placenta, preeclampsia

Contenido

	Pág.
1. Introducción primer capítulo – mRNA	5
2. Materiales y Métodos	8
2.1. Animales	8
2.2. Aislamiento de RNA	9
2.3. Preparación de librerías y secuenciación de RNA	10
2.4. Procesamiento de datos provenientes de mRNAseq.....	10
2.4.1. Procesamiento de las lecturas	11
2.4.2. Análisis de Componentes Principales	11
2.4.3. Reglas de Asociación	11
2.5. Confirmación de resultados	12
2.5.1. Selección de genes para estudio	12
2.5.2. Análisis mediante PCR en tiempo real.....	13
2.5.3. Determinación sérica	14
2.5.4. Inmunohistoquímica.....	15
2.6. Análisis estadístico.....	16
3. Resultados.....	17
3.1. Secuenciación.....	17
3.2. Manejo de los datos	17
3.3. Análisis de componentes principales de las muestras.....	18
3.4. Análisis de agrupación	20
3.5. Reglas de Asociación.....	22
3.6. Análisis de genes de Interés	24
3.7. Estudio de Inmunoreactividad en placenta	33
3.8. Análisis sérico	38
4. Discusión.....	44
5. Introducción primer capítulo – microRNAs	57
6. Materiales y Métodos	60
6.1. Animales	60
6.2. Aislamiento de RNA	60
6.3. Preparación de librerías y secuenciación de RNA.....	61
6.4. Procesamiento de datos provenientes de miRNAseq.....	61
6.5. Procesamiento de las lecturas.....	62
6.6. Análisis de Componentes Principales.....	62

6.7.	Análisis bioinformático de los datos.....	62
6.7.1.	Análisis de expresión diferencial.....	63
6.7.2.	Agrupamiento de miRNAs	63
6.7.3.	Análisis de redes de relevancia	64
6.7.4.	Identificación de genes blanco.....	64
6.7.5.	Análisis de enriquecimiento funcional	64
7.	Resultados.....	66
7.1.	Análisis de expresión diferencial	66
7.2.	Análisis de Componentes Principales.....	67
7.3.	Agrupamiento de miRNAs	68
7.4.	Análisis de enriquecimiento funcional.....	71
7.5.	Identificación de redes de relevancia.....	75
7.6.	Identificación de genes blanco	76
8.	Discusión.....	78
9.	Introducción Capítulo 2- Traslación hacia la fisiología de la gestación humana	81
10.	Materiales y Métodos	85
10.1.	Población y diseño del estudio.....	85
10.2.	Análisis bioquímicos	87
10.3.	Análisis sérico de las proteínas de estudio	88
10.4.	Estudio de inmunoreactividad	90
10.5.	Análisis estadístico	91
10.5.1.	Criterios para la realización del algoritmo para predicción de preeclampsia.....	92
11.	Resultados.....	93
11.1.	Características demográficas de la población.....	93
11.2.	Análisis de Inmunoreactividad	93
11.3.	Parámetros bioquímicos analizados	97
11.4.	Estudio de los perfiles séricos de las proteínas de interés	100
11.5.	Estudio de correlación entre los perfiles séricos y los parámetros de interés	108
11.6.	Algoritmo predictivo para la detección de preeclampsia.....	112
12.	Discusión.....	115
13.	Conclusiones.....	136
13.1.	Conclusiones primer capítulo estudio mRNA	136
13.2.	Conclusiones primer capítulo estudio miRNAs	137
13.3.	Conclusiones segundo capítulo	138
14.	Lista de Anexos.....	141
14.1.	Publicaciones generadas a partir del desarrollo del presente trabajo.....	141
14.2.	Ponencia en Congresos- Modalidad poster	142
14.3.	Ponencia magistral en Congresos	143
15.	Referencias.....	145

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema del flujo de trabajo realizado en el abordaje experimental.....	9
Figura 2. Número de genes expresados a través de la gestación..	18
Figura 3. Análisis de Componentes Principales de las muestras analizadas..	19
Figura 4. Agrupación de genes en el espacio de componentes principales	21
Figura 5. Reglas de asociación vinculando anotaciones GO y perfiles de expresión génica en placenta....	24
Figura 6. Tamizaje de niveles de expresión relativa de Metrnl (A), Nnat (B), Fst (C) y Lum (D).....	25
Figura 7. Tamizaje de niveles de expresión relativa de Fbln1 (A), Des (B), Metrnl (C) y Fndc5 (D).	26
Figura 8. Confirmación de resultados provenientes del análisis del transcriptoma mediante PCR en tiempo real. En esta figura se pueden observar los niveles de expresión relativa correspondientes a Metrnl (A), Nnat (B), Fst (C) y Lum (D).	28
Figura 9. Confirmación de resultados provenientes del análisis del transcriptoma mediante PCR en tiempo real. En esta figura se pueden observar los niveles de expresión relativa correspondientes a Fbln1 (A), Des (B), Metrnl (C) y Fndc5 (D)..	30
Figura 10. Confirmación de resultados provenientes del análisis del transcriptoma mediante PCR en tiempo real. En esta figura se pueden observar los niveles de expresión relativa correspondientes a Chemerin (A), Nucleoblastin-2 (B), Omentin-1 (C) y BDNF (D).	32
Figura 11. Inmunohistoquímica de Chemerin.	33
Figura 12. Inmunohistoquímica de Fndc5.	34
Figura 13. Inmunohistoquímica de Nucleoblastin-2.	35
Figura 14. Inmunohistoquímica de BDNF y TrkB.	37
Figura 15. Inmunohistoquímica de Omentin-1.....	38
Figura 16. Perfil sérico de Chemerin a través de la gestación.....	39
Figura 17. Niveles séricos de Irisin durante la gestación.	40
Figura 18. Niveles séricos de Nesfatin-1 a través de la gestación en rata.....	41
Figura 19. Niveles séricos de BDNF a través de la gestación en modelo animal de rata.	42
Figura 20. Perfil sérico de Omentin-1 durante la gestación en modelo animal de rata..	43
Figura 21. Metodología empleada en el análisis de los datos de miRNAs.	65
Figura 22. Mapa de calor de expresión diferencial de miRNAs de placenta de rata.	67
Figura 23. Análisis de Componentes Principales.	68
Figura 24. Perfiles de expresión identificados por técnicas de agrupamiento.	70
Figura 25. Perfiles de expresión identificados por técnicas de agrupamiento.	71
Figura 26. Redes de relevancia identificadas de miRNAs en placenta de rata.	76
Figura 27. Inmunotinción de BDNF y TrkB en placenta humana en los tres periodos de la gestacion analizados.	94
Figura 28. Tinción inmunohistoquímica de tejido adiposo, músculo esquelético y placenta con anticuerpos dirigidos a FNDC5.	95

Figura 29. Inmunohistoquímica de Meteorin en placenta.	96
Figura 30. Inmunohistoquímica para Omentin-1.	97
Figura 31. Niveles séricos de Chemerin en la población de estudio.	100
Figura 32. Niveles séricos de adiponectina en la población de estudio.	101
Figura 33. Niveles séricos de BDNF en la población de estudio.	102
Figura 34. Box plot comparando los niveles séricos de Irisin a través de la gestación comparado con un grupo de mujeres no gestantes y con mujeres con preeclampsia.	103
Figura 35. Niveles séricos de Omentin-1 en un grupo de mujeres gestantes durante los tres trimestres de gestación y un grupo de mujeres no gestantes.	104
Figura 36. Niveles séricos de Meteorin en los tres periodos de la gestación analizados y en un grupo de mujeres no gestantes.	105
Figura 37. Niveles séricos de Meteorin en mujeres gestantes sanas y mujeres con diagnóstico de preeclampsia.	106
Figura 38. Gráfico de cajas y bigotes representando los niveles séricos de Folistatin, en un grupo de mujeres gestantes durante los tres periodos de la gestación (GT, gestación temprana; GM, gestación media; GTa, gestación tardía), tres meses posparto (PP) y un grupo de mujeres no gestantes, durante la fase folicular y lútea del ciclo menstrual.	107
Figura 39. Gráfica de cajas y bigotes de los niveles séricos de Folistatin en una cohorte de mujeres gestantes sanas y un grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia durante la gestación, (GT, gestación temprana; GM, gestación media; GTa, gestación tardía).	108
Figura 40. Scatterplot de los niveles séricos de adiponectina en relación con los niveles circulantes de Chemerin	109
Figura 41. Coeficientes de correlación de los niveles séricos de BDNF con variables químicas y bioquímicas en el grupo de mujeres gestantes.	110
Figura 42. Modelo de clasificación basado en árbol de decisión.	112
Figura 43. Curva de Característica Operativa del Receptor (ROC) del árbol de decisión.	113

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Caracterización de grupos de genes	21
Tabla 2. Algunas reglas de asociación originadas a partir de datos del transcriptoma de placenta y gene ontologies.	23
Tabla 3. Análisis de expresión diferencial por edad gestacional y condición nutricional.	66
Tabla 4. Términos Ontológicos más representativos de los clusters identificados en el total de genes diferencialmente expresados.	72
Tabla 5. Términos Ontológicos más representativos de los clusters identificados en el subgrupo de genes seleccionados.....	74
Tabla 6. Representación de genes blanco de miRNAs identificados.....	77
Tabla 7. Características antropométricas y metabólicas de la población de estudio.....	99

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
PCR	Reaccion en Cadena de la Polimerasa
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
miRNA	MicroRna
cDNA	Ácido Dexosiribonucleico complementario
pb	pares de bases
RPKM	Reads per kilobase of transcript per million reads
ACP	Análisis de Componentes Principales
BHI	Índice de Homogeneidad Biológica
GO	Gene Ontology
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLASTp	Protein BLAST
Adm	Adrenomedullin
Npy	Neuropéptido Y

**Estudio de factores moleculares y séricos durante la
gestación en la rata y en el humano**

Ghrl	Ghrelin
Adipoq	Adiponectina
Angpt2	Angiopoyetina 2
Bdnf	Brain-derived neurotrophic factor
Fndc5	Fibronectin type III domain-containing protein 5
Nucb2	Nucleobindin2
Metrn	Meteorin
Des	Desmin
Nnat	Neuronatin
Fbln-1	Fibulin1
Metrnl	Meteorin like
Lum	Lumican
Fst	Follistatin
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
RIA	Radioinmunoensayo
TIG2	Tazarotene-Induced gene 2 protein
ITLN-1	Intelectin-1
GC	Guanina Citosina
PC	Componente Principal
EV	Eigenvector
WAT	Tejido Adiposo Blanco
BAT	Tejido Adiposo Pardo
WAT mes	Tejido Adiposo Blanco Mesenterico
WAT epi	Tejido Adiposo Blanco Epididimal
VC	Virgen Control
S.E.M	Error Estándar de la Media

IMC	Índice de Masa Corporal
HOMA IR	Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gama
RARRES2	Retinoic Acid Receptor Responder protein 2
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1
ChemR23	Chemerin receptor 23
TNF-alfa	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-6	Interleuquina 6
TGF-beta	Factor de Crecimiento Transformante Beta
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
Trk	Tropomyosin-related kinase
shRNA	Short hairpin RNA
ARC	Núcleo arcuato
PVN	Núcleo paraventricular
VMH	Núcleo ventromedial
DMH	Núcleo dorsomedial del hipotálamo
DVC	Complejo Vagal Dorsal
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PKA	Proteína Quinasa A
CREB	Proteína de Union a Elemento de Respuesta a cAMP
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent Protein Kinase
LIF	Leukemia inhibitory factor
IL-7	Interleuquina 7
IL-8	Interleuquina 8
IL-15	Interleuquina 15

**Estudio de factores moleculares y séricos durante la
gestación en la rata y en el humano**

UCP-1	Proteína Desacopladora 1
ERK	Proteína quinasa reguladora extracelular
PGC1- α	Peroxisome proliferator-activated receptor y co-activator 1 α
lncRNAs	RNAs largos no codificantes
circRNAs	RNAs circulares
UTRs	Regiones no traducidas
pri-miRNA	miRNA primario
pre-miRNA	Precursor de miRNA
nt	Nucleótidos
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA
Ago2	Argonauta 2
FDR	False Discovery Rate
SOM	Self-Organizing Maps
SOTA	Self-organizing Tree Algorithm
SVM	Máquinas de soporte vectorial
VE	Varianza explicada
DOHaD	El origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo
Flt-1	Fms-like tyrosine kinase 1
VEGF-1	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial 1
PIGF	Factor de Crecimiento Placentario
uNK	Células Natural Killer uterinas
ROC	Curva de características Operativas para el Receptor
SBP	Presión Arterial Sistólica
LepRb	Leptin receptor long isoform
DMT2	Diabetes Tipo 2
LH	Hormona Luteinizante

FSH	Hormona Folículo Estimulante
GDM	Diabetes Mellitus Gestacional
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
P38	Mitogen-activated protein kinases
HESC	Células Stem Cell Embrionarias Humanas
sEng	Endoglina soluble
AdipoR1	Receptor 1 de Adiponectina
AdipoR2	Receptor 2 de Adiponectina

**Estudio de factores moleculares y séricos durante la
gestación en la rata y en el humano**

Introducción

En el presente trabajo se presenta por primera vez a partir de un abordaje traslacional, el estudio de la fisiología de la gestación, con especial enfoque en el análisis del transcriptoma de la placenta, del modelo animal de rata hacia la fisiología de la gestación humana.

Dicho estudio se realizó mediante un diseño metodológico que involucro el seguimiento de la gestación en modelo animal de rata en tres periodos de la gestación (12, 16 y 21 días), con el propósito de obtener las placentas de cada edad gestacional y proceder al estudio del transcriptoma. A partir del análisis del transcriptoma a nivel de RNA mensajero (mRNA), se seleccionó una lista de genes de estudio, basado en criterios de identidad en la secuencia de aminoácidos, *Rattus norvegicus* Vs. *Homo sapiens*, y en la revisión de la literatura al respecto. De esta manera, en el presente estudio se presenta la confirmación de datos mediante técnicas de PCR en tiempo real, inmunohistoquímica y análisis sérico, realizado mediante técnicas de ELISA.

Además en el presente estudio, se realizó el análisis del perfil de expresión a nivel de microRNAs (miRNAs) en la placenta, identificando el perfil de expresión en los periodos de la gestación analizados. Es importante destacar que a la fecha no se ha documentado un estudio de este tipo, ya que los trabajos realizados por Shankar *et al.*(1), se limitaron a realizar el análisis del transcriptoma por zonas placentarias específicas, en una sola edad gestacional y a nivel de mRNA, no existe a la fecha un reporte del análisis del transcriptoma de la placenta de la rata, a nivel de microRNAs, ni de mRNAs como el realizado en el presente estudio.

Posteriormente, a partir de los genes seleccionados, se procedió a realizar el estudio de inmunoreactividad y el análisis del perfil sérico de los mismos, en una cohorte longitudinal de mujeres gestantes sanas, que acudían al Hospital de Engativá, Bogotá. D.C.,

seguidas en tres periodos de la gestación (semanas 11-13, 24-25 y 34-36), y tres meses posparto. Además, a partir del seguimiento realizado se identificó el desarrollo de preeclampsia en un porcentaje cercano al 5% de la población de estudio, siendo este dato concordante con los reportes de la literatura (2). De esta manera, en el presente estudio se presenta además del perfil de mujeres gestantes sanas, en los tres periodos de la gestación analizados, el contraste con el perfil de mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia, en los mismos periodos gestacionales. Este contraste, permitió identificar posibles biomarcadores de la enfermedad y realizar correlaciones interesantes con este propósito, siendo este un elemento adicional no contemplado, que enriquece la discusión y conclusiones del presente trabajo.

Teniendo en cuenta los elementos que componen el presente trabajo, la presentación del mismo se realizó de la siguiente manera: en el capítulo 1 se presentan los resultados correspondientes al análisis del transcriptoma de la placenta de la rata y en el capítulo 2, se presenta el estudio realizado en el componente de la fisiología de la gestación humana. Adicionalmente, el capítulo 1 se subdividió en 1a y 1b, con el propósito de presentar los resultados del análisis del transcriptoma de mRNA y miRNA, de forma independiente, facilitando la lectura de los mismos.

Finalmente, con el propósito de facilitar al lector la comprensión acerca del cumplimiento de los objetivos propuestos, a continuación se mencionan cada uno de estos y el capítulo que responde a su alcance. El objetivo general del presente estudio fue “Estudiar el comportamiento de factores moleculares y séricos relacionados con la regulación del balance energético corporal y la fisiología de la gestación en modelo animal de rata y determinar su correlación con los niveles séricos de estos factores a lo largo de la gestación humana”, el cumplimiento de este objetivo se puede encontrar en la totalidad del escrito y en las conclusiones finales. Como objetivos específicos “Identificar y analizar los perfiles de expresión de transcritos a nivel de mRNA y miRNA en la placenta de rata durante diferentes fases de la gestación”, el cumplimiento de este objetivo se puede encontrar en los resultados y conclusiones del capítulo 1.

Con respecto al objetivo “Estudiar los perfiles fisiológicos de factores séricos a lo largo de la gestación humana, basado en los estudios de expresión génica realizados en modelo animal de rata”, este objetivo se cumple en el desarrollo de las actividades mencionadas

en el capítulo 1a y 2 y finalmente, el alcance del objetivo “Correlacionar los perfiles séricos de los factores candidatos identificados a lo largo de la gestación humana, con marcadores bioquímicos y antropométricos en la población de estudio”, puede ser verificado en los resultados y conclusiones contenidos en el capítulo 2.

Es importante mencionar que a partir del desarrollo del presente trabajo se han generado publicaciones en revistas especializadas, lo que indica la importancia y la pertinencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, así como su posible impacto en el aporte al conocimiento de la fisiología de la gestación.

Capítulo 1a

1. Introducción primer capítulo – mRNA

Los organismos dan lugar a nacidos vivos mediante dos mecanismos: en ovoviviparidad, en donde no hay una conexión directa entre la madre y los compartimentos fetales existentes y en viviparidad, donde existe conexión madre –feto (3). El conocimiento actual indica que la viviparidad y la placentación han evolucionado más de 100 veces en diferentes linajes de amniotas no mamíferos, especialmente en lagartijas y serpientes (4).

Los mamíferos son amniotas, compartiendo esta distinción con reptiles y aves, definido por la presencia de una membrana separada, el amnion, que envuelve el embrión en desarrollo dentro de su huevo. Estos organismos también tienen otras dos membranas, el corion y el alantoides, que forman parte de la placenta y el cordón umbilical respectivamente (3). La placenta se origina como una modificación de las membranas fetales, el corion, el saco vitelino y el alantoides (5).

Los Euterianos o mamíferos placentados divergieron de los marsupiales hace aproximadamente 140 millones de años. De esta manera, la placenta constituye un producto de continuas adaptaciones evolutivas, que originan aproximadamente 18 órdenes taxonómicos, agrupados en 4 superordenes. Aunque existe un debate en torno al origen de la primera placenta, una hipótesis propone que fue hemocorial, discoide y laberíntica, con una barrera interhaemal que fue bien sea, endotelicorial o hemocorial (3,6).

Una de las características más importantes de la placenta es su capacidad de adaptación y el dinamismo de los procesos que tienen lugar en este órgano, lo que es inherente al ambiente cambiante en el cual se desarrolla. En este sentido, se comprende que este

órgano presenta gran diversidad entre euterianos, como respuesta a las necesidades propias de cada especie. De esta manera, a partir de la diversidad morfológica de la placenta en mamíferos Euterianos, son clasificadas a partir de su forma (difusa, cotiledonaria, zonal y discoide), a partir de la estructura histológica de la interface materno-fetal (epiteliocorial, endoteliocorial y hemocorial) y con respecto al tipo de interdigitación materno fetal (velloso, trabecular y laberíntica) (7,8). Estos aspectos se deben tener en consideración cuando se desea extrapolar hallazgos a nivel fisiológico, endocrinológico, inmunológico o cualquier tipo de dato proveniente de un modelo animal, hacia una situación particular en humanos (7).

En la placentación hemocorial y endoteliocorial, el trofoblasto invasivo tiene contacto directo con la sangre materna o sus vasos sanguíneos, concediendo de esta manera un control sustancial al feto con respecto al flujo de nutrientes (6). La placentación hemocorial es una estrategia que involucra la modificación de la interface materno-fetal, con el propósito de facilitar el intercambio de nutrientes y desechos y el desarrollo de una descendencia sana. El proceso de placentación hemocorial tiene dos funciones elementales: 1) asegurar la liberación de nutrientes maternos hacia la placenta y 2) la transferencia de nutrientes desde la placenta hacia el feto en desarrollo (9). Este tipo de placentación es la más invasiva ya que todas las capas de tejido uterino desaparecen mediante erosión, lo que conduce a una comunicación directa entre el corion y la sangre materna. Los primates, conejos y roedores, son algunas de las especies que cuentan con placentas hemocoriales (7).

En la investigación biomédica se usan diferentes modelos animales debido a la complejidad que estos proporcionan, lo cual genera una mejor aproximación hacia la condición humana. Algunos aspectos de la gestación humana como el desarrollo de trofoblastos, la placentación y el transporte placentario, se pueden estudiar mediante diferentes técnicas *in vitro*. Por otro lado, metodologías como el modelo de perfusión dual de la placenta, en el cual una placenta humana es perfundida *in vitro*, representan aproximaciones empleadas para el estudio de la hemodinamia útero-placentaria, pero solo por un corto periodo (hasta 9 horas). Actualmente, este es el único modelo *ex vivo* disponible para el estudio del tejido placentario organizado. Sin embargo, la ejecución experimental presenta un alto porcentaje de fallas debido al daño del tejido, el cual

compromete la integridad de la barrera placentaria. Por lo anterior, a pesar de los avances hechos usando modelos *in vitro* en algunos aspectos de la gestación, otros como el estudio del metabolismo y el crecimiento fetal, son mejor representados en modelos *in vivo* (10).

En este sentido, en el caso del estudio de la gestación, el abordaje en modelo animal de rata ha sido ampliamente documentado dada la similitud en gran parte de la estructura placentaria (discoide y hemocorial) y a nivel funcional. En contraste, es claro que el modelo no es perfecto, ya que presenta divergencias en cuanto al tipo de interdigitación, siendo laberíntica en la rata y de tipo vellosidad en el ser humano. Sin embargo, la placentación en la rata y en el ser humano presenta importantes similitudes especialmente en lo relacionado con la remodelación de las arterias uterinas y la invasión profunda por parte de los trofoblastos, siendo estas características de gran importancia desde el punto de vista funcional (9,11). Además, estos modelos comparten mecanismos reguladores evolutivamente conservados, encargados de controlar el desarrollo y el metabolismo placentario (9,12,13). Por otra parte, el perfil hormonal observado en estudios en ratas gestantes se acopla al perfil observado durante la gestación humana y de igual manera las curvas de crecimiento fetal son similares (14–17).

La gestación es un proceso fisiológico que se caracteriza por el desarrollo de la placenta. Este órgano transitorio, cumple un amplio rango de funciones como proporcionar el anclaje fetal a la pared uterina, la regulación endocrina que le permite a la madre adaptarse a las necesidades del nuevo ser y garantizar la supervivencia de ambos, adaptaciones hemodinámicas, intercambio de gases, regulación inmune y adaptaciones epigenéticas, entre otras tiene lugar durante este periodo (1,7). Actualmente, con el desarrollo de nuevas metodologías enfocadas al análisis de secuencias de alto rendimiento, diferentes campos de estudio en la medicina moderna han avanzado en la comprensión de mecanismos y procesos hasta ahora desconocidos. El abordaje del estudio de la placenta es posible a partir de diferentes metodologías de este tipo como lo son la epigenómica, la transcriptómica y la proteómica, cada una de las cuales con la capacidad de dilucidar mecanismos de regulación diferentes e inexplorados.

Por las razones antes expuestas, en el presente trabajo se analizó el transcriptoma de la placenta de rata durante diferentes periodos de la gestación. Los resultados de este

estudio permiten comprender algunos de los mecanismos fisiológicos asociados con el desarrollo gestacional. De esta manera, el presente estudio contribuye a la comprensión de la fisiología de la gestación en modelo animal de rata y su extrapolación al estudio de la gestación humana.

2. Materiales y Métodos

2.1. Animales

Los procedimientos y el mantenimiento de los animales para la obtención de los tejidos, se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Se adquirieron ratas Wistar hembra de 200-220 gramos provenientes del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), los animales se mantuvieron bajo condiciones de luz controlada (12 horas de luz/ oscuridad), una temperatura de 21 +/- 1 °C, en cajas plásticas de poliestireno, ubicadas en instalaciones adecuadas para este fin en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, de acuerdo a la normativa vigente (18). Se estableció el día de proestro para realizar la cópula, mediante observación microscópica de frotis vaginal de acuerdo a metodología previamente descrita (19). El día siguiente a la cópula se define como el día 1 de la gestación y a partir de este se cuentan los días de gestación según corresponda a cada uno de los grupos gestacionales: n=12 / 12, 16 y 21 días de gestación. Adicionalmente, cada grupo se subdividió aleatoriamente en un grupo con libre acceso al alimento (*ad libitum*) y un grupo con una reducción del 35% en la disponibilidad de alimento (en restricción). Una vez cumplida la edad gestacional a los animales se les aplicó eutanasia de acuerdo a la normativa legal vigente (18). Se tomaron placentas sin contaminación fetal y de membranas coriovitelinas (20) y tejido adiposo visceral correspondiente al tejido omental, como ha sido previamente descrito (21).

Además, se dispuso de un grupo de ratas hembra vírgenes en condición *ad libitum* de la misma edad, que en adelante será mencionada como grupo virgen control (20). En la Figura 1, se presenta un resumen de la metodología general implementada en el estudio.

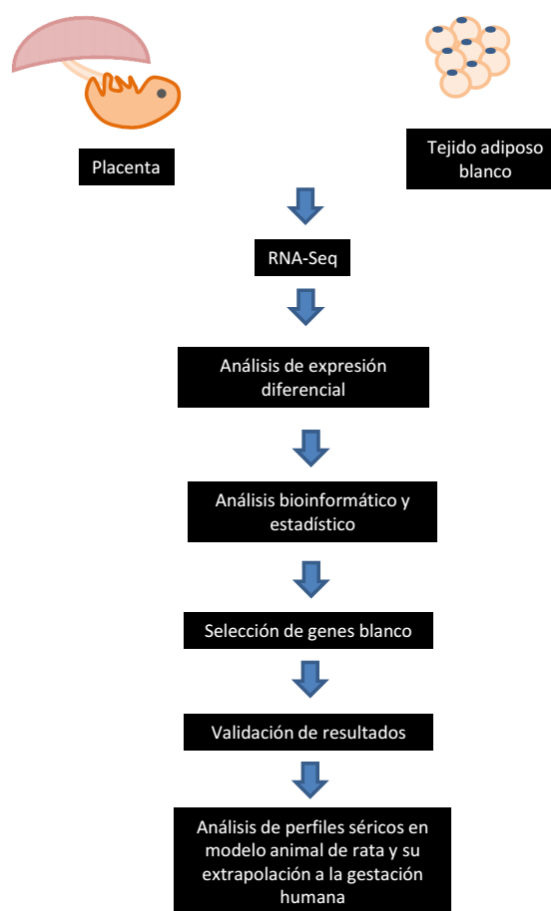


Figura 1. Esquema del flujo de trabajo realizado en el abordaje experimental. En esta representación gráfica se muestra una conceptualización general del proceso realizado en el primer componente experimental del presente trabajo.

2.2. Aislamiento de RNA

Los tejidos fueron embebidos en Trizol® Invitrogen en una proporción de 1mL/100mg de tejido y homogenizados usando el microhomogenizador de tejidos PRO2000®. Se extrajo

el RNA total usando el kit PureLink® RNA mini kit – Life Technologies. El RNA total se cuantificó mediante fluorescencia usando el kit Quibit®, Life Technologies, Invitrogen. La calidad del RNA se determinó mediante corrido electroforético en condiciones denaturantes para determinación de las bandas 18S y 28S. Para la obtención de un grupo representativo de cada grupo a analizar, se preparó un pool biológico que contenía RNA total proveniente de seis placentas individuales correspondientes a un mismo grupo de edad gestacional, las cuales eran equivalentes en cantidad y calidad de RNA total, de acuerdo a metodología previamente descrita (1).

2.3. Preparación de librerías y secuenciamiento de RNA

Las librerías de DNA complementario (cDNA) fueron generadas de acuerdo a metodología previamente descrita (22). De forma resumida, el aislamiento del RNA mensajero (mRNA) a partir de RNA total se realizó mediante perlas magnéticas que tienen adheridos oligos dt. El mRNA purificado se fragmentó en un buffer de fragmentación con cationes bivalentes a 94°C. Estos fragmentos cortos se usaron como templete, se adicionaron *primers* aleatorios y transcriptasa reversa para la síntesis de la primera hebra del cDNA. La segunda hebra del cDNA se sintetizó usando buffer, dNTPs, RNasa H y DNA polimerasa I y se purificaron los fragmentos cortos de cDNA; usando el kit TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation, Illumina®. El cDNA de doble hebra se sometió a reparación de extremos 3' y se adeniló. Los fragmentos cortos de cDNA, purificados se ligaron con los adaptadores universales y se realizó la PCR generando la librería final. Estas librerías se secuenciaron en el secuenciador Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA). La longitud de las lecturas fue de 100pb usando el primer de secuencia *forward* y se realizó un duplicado técnico (22).

2.4. Procesamiento de datos provenientes de mRNAseq

Los datos provenientes del proceso de secuenciamiento fueron procesados usando la plataforma web Galaxy (23), a través de dos herramientas: 1) FastQC-ReadQC para realizar el control de calidad a los datos crudos y posteriormente 2) Tophat-BOWTIE para alinear las lecturas secuenciadas con el genoma de *Rattus norvegicus* (rn5). En este

punto, se generó una tabla de cuentas que fue analizada en pasos subsecuentes como se describirá más adelante.

2.4.1. Procesamiento de las lecturas

El análisis estadístico de los datos provenientes del secuenciamiento se realizó usando el software R (24). Las cuentas de genes se normalizaron y se reportaron como valores RPKM (*Reads per kilobase of transcript per million reads*). Se identificó un subgrupo de genes diferencialmente expresados ajustando a un punto de corte >2.0 y >1.5 veces de cambio (*fold change*) para placenta y tejido adiposo, respectivamente (25). Los perfiles de expresión diferencial se obtuvieron contrastando los diferentes estados metabólicos (*ad libitum* y restricción) y la edad gestacional (12,16 y 21 días) en cada tejido.

2.4.2. Análisis de Componentes Principales

Los RPKM de genes diferencialmente expresados fueron transformados en \log_2 y sumados mediante análisis de componentes principales (ACP) para discriminar las diferentes condiciones estudiadas a partir de los perfiles de expresión obtenidos. Posteriormente, se realizó enriquecimiento funcional usando términos ontológicos (GO) asociados a procesos biológicos, lo cual permitió generar grupos tomando valores de enriquecimiento $p < 0.05$ (26). El índice de homogeneidad biológica (BHI) se usó para definir tanto el algoritmo de agrupamiento como el número de grupos (27). Se realizó un agrupamiento jerárquico, usando los algoritmos *K-Means* y *Self Organizing Maps* (SOM) (28). Los *p-valores* se calcularon con el software *FunAssociate* (26).

2.4.3. Reglas de Asociación

Además, los datos se analizaron en búsqueda de posibles reglas de asociación entre términos GO y perfiles de expresión diferencial (29). Todas las reglas de asociación analizadas tuvieron un soporte $>1E-4$ y una confianza >0.9 . Posteriormente, se seleccionó un grupo de genes cuyas reglas de asociación resultaron interesantes dado

su posible papel en la regulación de procesos relevantes durante la gestación y tomando en cuenta los resultados de agrupación. Los perfiles de expresión se contrastaron mediante mapas de calor.

2.5. Confirmación de resultados

2.5.1. Selección de genes para estudio

Inicialmente el análisis de datos crudos generó una lista con 14.756 registros que presentaban por lo menos 10 lecturas. A partir de los procesos de depuración y análisis antes mencionados, se generó una lista de genes expresados diferencialmente de alrededor de 5000 registros. De esta lista preliminar, se realizó una selección, siguiendo tres criterios: 1) Función biológica relevante durante la gestación a través de términos ontológicos. Se tomó en cuenta términos como angiogénesis, metabolismo de carbohidratos, metabolismos de lípidos, entre otros y los perfiles analizados en los estudios de agrupación y de reglas de asociación. 2) Identidad en secuencias de aminoácidos del codificados por el gen en estudio, superior al 85% entre las especies *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*. Para este análisis se usó la herramienta HomoloGene disponible en la página del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>. Se realizó un alineamiento apareado mediante BLASTp y se tomaron solamente secuencias de aminoácidos confirmadas (nomenclatura NP). 3) Se tuvieron en cuenta solamente genes cuya proteína fuera secretada. La lista de genes seleccionados al final debían ser medible por metodologías de ELISA e inmunohistoquímica, de donde surge la necesidad de seleccionar proteínas secretables.

Una vez realizada esta segunda selección se obtuvo una lista de 79 registros. El siguiente paso fue la selección final a partir de la literatura científica. Se seleccionaron cinco genes cuya expresión se mantuvo en la línea de base inferior y que no mostraron variación en las condiciones analizadas, los cuales fueron tomados como genes de control interno. Además se tomaron seis genes de referencia, cuyos perfiles de expresión a lo largo de la gestación son conocidos entre éstos: adrenomedullin (Adm), neuropéptido Y (Npy), Ghrelin (Ghrl), adiponectina (Adipoq), H19, angiopoyetina2 (Angpt2), y los genes

seleccionados. De este último análisis se escogieron 12 genes: Chemerin (Rarres2), Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf), Fibronectin type III domain-containing protein 5 (Fndc5), nucleobindin2 (Nucb2), Meteorin (Metrn), Omentin-1 (Itln11), Desmin (Des), Neuronatin (Nnat), Fibulin1 (Fbln-1), Meteorin like (Metrnl), Lumican (Lum) y Follistatin (Fst). Estos genes se estudiaron por metodologías de PCR en tiempo real e inmunohistoquímica.

2.5.2. Análisis mediante PCR en tiempo real

Con el propósito de verificar los perfiles de expresión diferencial observados previamente, se procedió a analizar los niveles de expresión a nivel de mRNA de los genes escogidos mediante PCR en tiempo real. Para realizar la retrotranscripción se tomó 1.5ug de RNA total y se utilizó el kit SuperScript III (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Dicha reacción se llevó a cabo en el termociclador Thermal Cycle 1000C BIORAD, en las siguientes condiciones: 37°C por 40min, 42°C por 15min, 96°C por 1min y 4°C por 5min.

El cDNA resultante se tomó como template para la realización de los subsiguientes PCR en tiempo real. Con este fin se emplearon *primers* específicos para cada gen o sondas TaqMan® - Gene expression assays Applied Biosystem, como se muestra a continuación: Chemerin primers FW 5' -TGTGCAGTGGGCCTTCCA-3'- RV 5'-CAAAGGTGCCAGCTGAGAAGA-3' – y sonda 5' -AGA TCG GTG TGG ACA GTG CTG ATG ACC TG-3', Bdnf sonda Rn01484924_m1, Fndc5 (precursor de Irisin) sonda Rn01519161_m1, Nucb2 primers FW 5'-CATGAAGACCCCAAAGT-3' - RV 5'-TTCATCCAGGAATCCATCGT-3', HPRTFW 5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTA-3' - HPRTRV 5'-AGCAAGTCTTTTCAGTCCTGTC-3', Metrn (Meteorin) sonda Rn01460236_m1, Itln1 (Intelectin 1 (Galactofuranose Binding) u Omentin-1 sonda Rn01771279_m1, Des (Desmin) sonda Rn00574732_m1, Nnat (Neuronatin) sonda Rn00822063_m1, Metrnl (Meteorin like) sonda Rn01463793_m1, Lum (Lumican) sonda Rn00579127_m1, Fbln1 (Fibulin-1) sonda Rn01504529_m1 y Fst (Follistatin) sonda Rn01463793_m1.

Como control interno en dichos ensayos se usó la sonda #95 para *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (HPRT) (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany). En ambos casos se empleó el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA), con las siguientes condiciones de ciclado: para Chemerin, Nucb2 y HPRT, como referencia interna en ambos casos, 95°C por 15seg, 60°C por 30seg y 72°C por 1min durante 35 ciclos. Los tamaños de los productos de PCR fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio sometido a luz UV, usando el documentador de imágenes Gel Doc 1000 Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA). Las demás reacciones realizadas con sondas TaqMan se llevaron a cabo con los siguientes parámetros de ciclado: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15seg, 60°C por 1min. Los datos se normalizaron usando el método doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (30).

A partir de los perfiles de expresión confirmados, se realizó una selección final de los genes a analizar mediante técnicas de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) o Radioinmunoensayo (RIA), teniendo en cuenta el perfil de expresión observado (posible utilidad en detección de procesos tempranos interesantes durante la gestación) y disponibilidad comercial de kits de ELISA o RIA para su medición. De esta manera para estudio sérico se escogieron: Chemerin, Nucb2 /Nesfatin, Bdnf, Fndc5/Irisin, Omentin-1 y Folistatin.

2.5.3. Determinación sérica

Para establecer el perfil sérico de cada gen en estudio se emplearon kits de ELISA y RIA disponibles comercialmente, cada muestra se analizó por duplicado en la misma placa, cada kit empleado era específico para la especie *Rattus norvegicus* y para la proteína en estudio y cada ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se presentaran las especificaciones técnicas en cada caso:

Para la determinación de Chemerin a nivel sérico se usó el kit de ELISA (Uscn Life Science Inc. Wuhan -E90945Ra), los resultados se expresaron de acuerdo a la curva estándar en pg/mL, con reactividad cruzada no significativa entre proteínas análogas,

según lo reportado por el fabricante y con coeficiente de variación inter e intra-ensayo del 5% (31).

Los niveles séricos de Nesfatin-1 se analizaron usando el kit de RIA comercializado por Phoenix para Nesfatin-1 en rata (residuos 1-82) (Catalog # RK-003-22, Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Germany), los resultados se expresaron en términos de ng/mL de acuerdo a la curva estándar. El rango de detección fue de 125–16,000 ng/ml y los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron menores de 6 y 10%, respectivamente (32).

La determinación de los niveles séricos de BDNF se realizó usando el kit de ELISA (ChemiKine™, Cat. # CYT306; Merck Millipore, Billerica, MA, USA), los resultados se expresaron en términos de pg/mL, el rango de detección fue de 7.8 – 500pg/mL y los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron de 3.7% y 8.5%, respectivamente (33).

Los niveles séricos de Irisin se analizaron usando el kit de ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, INC. Catalog# EK-067-52). Se realizó una dilución seriada del suero de (1:6), el rango de detección para Irisin fue de 0.066 – 1024 ng/mL y el coeficiente de variación inter e intra-ensayo fue de 8% y 9%, respectivamente.

Finalmente, los niveles séricos de Omentin-1 fueron determinados usando el kit de ELISA (BIONTANG Inc; Catalog No. R6870), los resultados se expresaron de acuerdo a la curva estándar en términos de ng/mL y los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron de 10% y 8%, respectivamente (34).

2.5.4. Inmunohistoquímica

Se determinó la inmunoreactividad para cada una de las proteínas antes mencionadas, en placenta de rata a los 12, 16 y 21 días de gestación. Para esto se usó tejido fijado en bloques de formalina tamponada neutra al 10%, embebido en parafina de acuerdo a metodología previamente descrita (35). El detalle del ensayo en cada caso se describe a continuación:

La inmunoreactividad de Chemerin se estudió en placenta de 19 días de gestación, adicionalmente, se usaron especímenes de tejido adiposo blanco y seminoma testicular humano, proporcionados por el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Para este propósito, se usó el anticuerpo policlonal de cabra anti-TIG2: sc-47483, (Santa Cruz Biotechnology, Inc), dicho anticuerpo está dirigido contra un epítrope cercano a la región N-terminal de tazarotene-induced gene 2 protein (TIG2) nombre alternativo de Chemerin, humano y es recomendado para la detección de TIG2 en rata y humano (31).

El análisis de inmunoreactividad para BDNF se realizó en placenta de rata a los 12, 16 y 21 días de gestación, para esto se implementó el anticuerpo policlonal de conejo anti-BDNF, Abcam® - código ab6201, este anticuerpo muestra inmunoreactividad en rata y humano (33). La inmunotinción para la proteína FNDC5 se realizó usando el anticuerpo policlonal de conejo, Abcam® - ab131390, en placenta de rata de 16 y 21 días de gestación.

La inmunoreactividad de Nucb2 se analizó usando el anticuerpo policlonal de conejo, Abcam®, ab30945, específico para rata en inmunohistoquímica. Para esto se usó placenta de rata de 19 días de gestación y tejidos en los que previamente se ha descrito la expresión de Nucb2 como mucosa gástrica y testículo (32).

Finalmente, la inmunoreactividad de Omentin-1 se analizó usando el anticuerpo policlonal de ratón anti-intelectin-1 (ITLN-1) (Cod A00020-09-100 Adipo Bioscience, USA) en tejido adiposo y placenta de 19 días de gestación (34).

En todos los casos el control negativo de la inmunotinción consistió en la reacción con los demás reactivos omitiendo el anticuerpo policlonal primario en el paso de incubación.

2.6. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas fueron realizadas en el software R (versión 3.1.1). La comparación entre grupos en el estudio de los perfiles de expresión génica se realizó

usando ANOVA de una y dos vías, seguido de la prueba de Tukey *post hoc*. Los valores estadísticos son presentados como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La significancia estadística fue asumida con un $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Secuenciamiento

Las muestras mostraron un control de calidad adecuado para el desarrollo de la técnica. De esta manera, el *score Phred* fue superior a 30 en cada muestra analizada y el porcentaje de GC fue de 49%. Todas las secuencias tuvieron una longitud de 100pb, durante el alineamiento no se detectaron *outliers* y la profundidad del secuenciamiento permitió continuar con el análisis estadístico de los datos.

3.2. Manejo de los datos

Inicialmente la base de datos provenientes del análisis del transcriptoma estaba compuesta por 14.756 transcritos que contaban con al menos 10 lecturas. En la placenta, la mayoría de los transcritos mostraron expresión diferencial en las edades gestacionales analizadas (12, 16 y 21 días), como se muestra en la Fig.2A. Además el diagrama indica que un conjunto de genes no son comunes entre las edades gestacionales analizadas, estos genes parecen ser más activos en periodos específicos de la gestación. En este análisis exploratorio se detectó una reducción en el número de genes expresados a los 21 días de gestación (84) en comparación con los expresados a los 12 días (279) (Fig.2A). En el caso del tejido adiposo visceral se observó un comportamiento similar, identificando la expresión de 178 genes a los 12 días de gestación y disminuyendo este número hasta 36 a 21 días de gestación (Fig.2B).

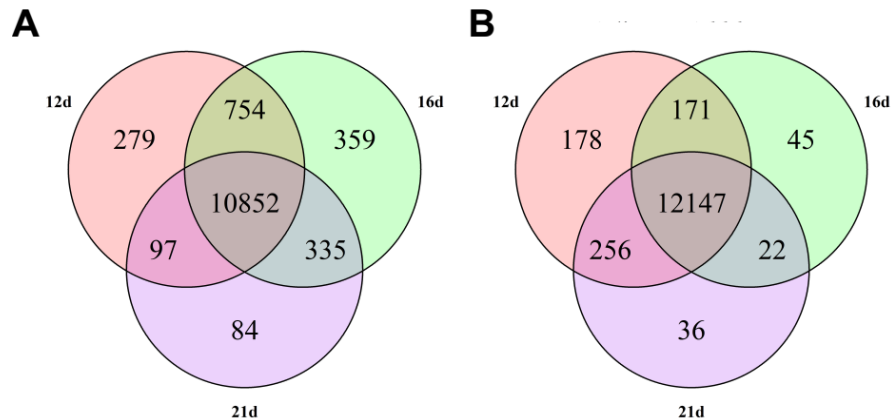


Figura 2. Número de genes expresados a través de la gestación. Diagramas de Venn en donde se muestra el total de genes (>10 lecturas) por edad gestacional en placenta (A) y tejido adiposo visceral (B) de rata.

3.3. Análisis de componentes principales de las muestras

Con el propósito de contrastar los perfiles de expresión génica entre tejidos (placenta y tejido adiposo visceral), sometidos a la misma condición experimental, se incluyó el análisis exploratorio de los niveles de expresión génica en las edades gestacionales estudiadas, mediante Análisis de Componentes Principales. De esta manera, los datos se filtraron por expresión diferencial e intensidades de expresión reportadas como RPKM. De esta selección se obtuvieron 2.734 y 1.164 genes, provenientes de placenta y de tejido adiposo, respectivamente.

Posteriormente, se compararon las muestras por medias de Análisis de Componentes Principales (ACP), se seleccionaron los componentes principales (PC) que retuvieron la mayor varianza. En la Fig.3 se muestran los tres primeros componentes que corresponden al 90% de la varianza total.

En PC1 (47% de varianza) se expone la diferencia entre tejidos. De esta manera, los datos provenientes de placenta son distantes con respecto a los de tejido adiposo, los cuales se encuentran agrupados. De este análisis preliminar se podría inferir que los datos provenientes de tejido adiposo muestran baja variabilidad entre condiciones y por

esta razón las muestras se agrupan. El PC2 (29% de varianza), está muy relacionado con la edad gestacional, es así como se observó una transición de 12 a 21 días de gestación en placenta. Mientras, el tejido adiposo no se observó una diferenciación con respecto a las edades gestacionales analizadas.

Con respecto a PC3 (14% de varianza), la información contenida es menos clara, sin embargo es posible identificar que este eje está asociado a la condición nutricional. En este eje se observó el mismo comportamiento de PC1 de una separación entre tejidos. Además, las condiciones *ad libitum* y restricción mostraron un incremento en la diferenciación de 12 a 21 días de gestación.

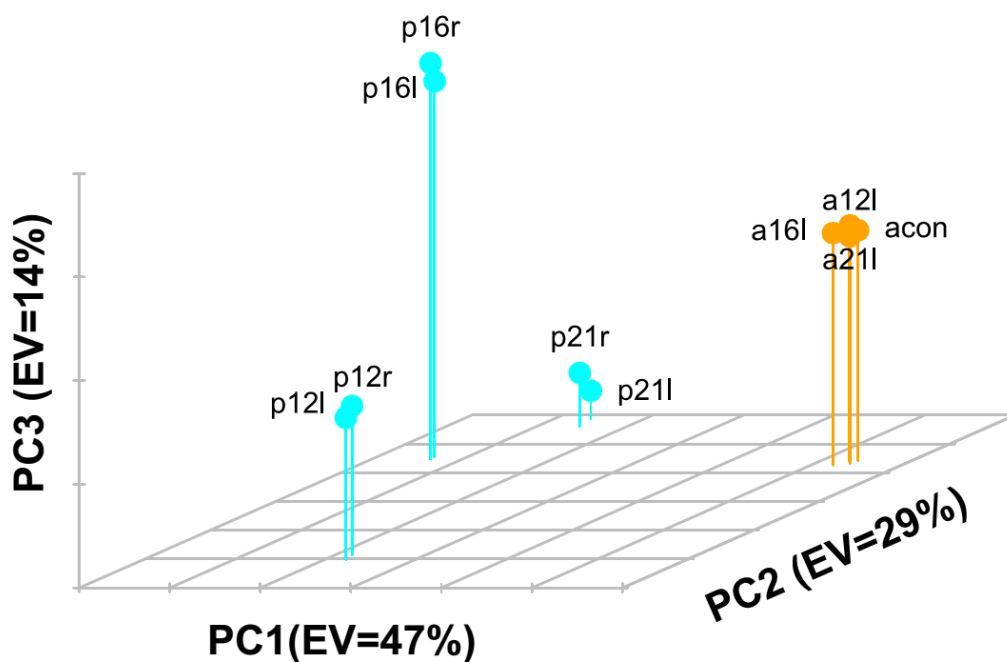


Figura 3. Análisis de Componentes Principales de las muestras analizadas. En este esquema se muestra la diferenciación de las muestras en los planos PC1, PC2 y PC3. Se muestra el porcentaje de varianza explicada (EV) por cada componente principal. En esta representación gráfica (p) corresponde a placenta, (a) hace referencia a tejido adiposo, (l) relaciona la condición nutricional *ad libitum* y (r) corresponde a restricción.

3.4. Análisis de agrupación

Se realizó el estudio de agrupación a partir de la sumarización del perfil de expresión en un plano de componentes principales. A partir de las diferencias observadas en el ACP, se tomaron los datos correspondientes a los dos principales componentes (los más explicativos de las condiciones estudiadas) y se aplicó un algoritmo de agrupación jerárquico, se seleccionó un óptimo de 12 grupos (Fig.4).

Como se esperaba, se obtuvieron perfiles de expresión mejor diferenciados en el ACP proveniente de muestras de placenta (Fig.4A). En este sentido, en PC1 (79%) se observó una distribución atribuible a los niveles de expresión, mientras en PC2 (17%), hace referencia a los perfiles de expresión de acuerdo a las condiciones analizadas, especialmente la edad gestacional. El círculo de correlación en la Fig.4A, muestra la oposición entre los perfiles de expresión observados hacia 12 días de gestación con respecto a 16 y 21 días. De esta manera, los genes contenidos en el grupo (*cluster*) 9 parecen tener mayor actividad durante la gestación temprana mientras, los genes contenidos en el grupo 6 parecen tener más actividad hacia los días 16 y 21 correspondiente a periodos medios y tardíos de la gestación.

En la sumarización del ACP realizado en tejido adiposo visceral, se determinó que la mayoría del comportamiento observado para este tejido en las condiciones analizadas se puede visualizar en el PC1 (98%). Además, en el círculo de correlación se observa una tendencia más homogénea entre edades gestacionales y condición nutricional en comparación a la tendencia observada en placenta Fig.4B.

En la tabla 1 se presenta una caracterización de la agrupación obtenida. La cual permite hacer una interpretación completa de la agrupación obtenida, no solo a partir de los niveles de expresión, sino también de su función biológica mediante el enriquecimiento funcional como se mencionó antes.

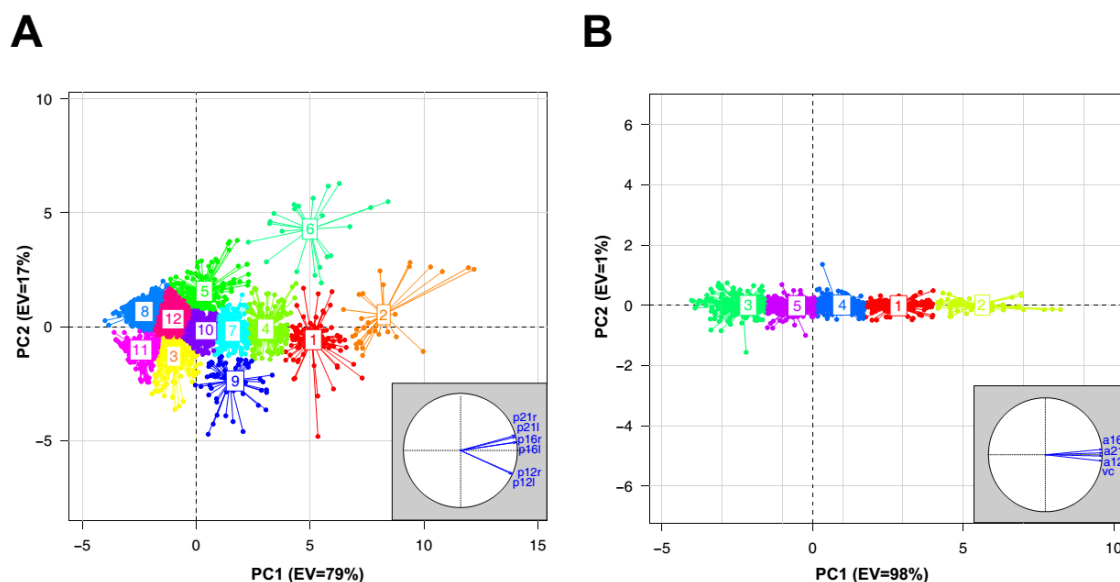


Figura 4. Agrupación de genes en el espacio de componentes principales. Se realizó un Análisis de Componentes Principales para placenta (A) y tejido adiposo visceral (B) de rata. En los ejes de la figura se muestra el porcentaje de varianza explicada (EV). Los círculos de correlación muestran los eigenvectores correspondientes para cada una de las muestras.

Tabla 1. Caracterización de grupos de genes

Grupos	Placenta			Adiposo		
	Número de genes	GO Proceso Biológico	p valor	Número de genes	GO Proceso Biológico	p valor
1	101	<i>protein metabolic process</i>	<0.001	150	<i>protein folding</i>	<0.001
2	30	<i>oxygen transporter activity</i>	<0.001	46	<i>Brown fat cell differentiation</i>	<0.001
3	188	<i>lipid metabolic process</i>	<0.001	259	<i>hormone activity</i>	0,002
4	209	<i>cellular homeostasis</i>	<0.001	291	<i>response to stress</i>	<0.001
5	144	<i>reproductive developmental process</i>	<0.001	417	<i>glycogen metabolic process</i>	0,043
6	22	<i>hormone activity</i>	<0.001			
7	335	<i>generation of precursor</i>	<0.001			

		<i>metabolites and energy</i>		
8	432	<i>in utero embryonic development</i>	<0.001	
9	61	<i>response to external stimulus</i>	<0.001	
10	460	<i>mRNA metabolic process</i>	<0.001	
11	209	<i>immune response</i>	<0.001	
12	542	<i>DNA metabolic process</i>	<0.001	

GO: gene ontology

3.5. Reglas de Asociación

Con el fin de complementar el análisis hecho en placenta, se hizo minería de datos en busca de reglas de asociación entre los patrones de expresión y las anotaciones GO.

Un total de 530 reglas se seleccionaron de acuerdo a los siguientes parámetros (confianza >0.97 y un soporte de 0.0001), de acuerdo con la función biológica de interés (tabla 2). Por ejemplo la regla 1 (Fig.5A) puede ser interpretada de la siguiente manera: los genes que tienen este comportamiento están asociados con procesos de angiogénesis y presentan mayores niveles de expresión hacia 12 días en comparación con los niveles de expresión observados en 16 días y en 21 días de gestación. De esta manera, se podría deducir que algunos procesos asociados con angiogénesis durante la gestación, en los cuales participan estos genes, como es el caso de *Angpt2* y *Mmp2*, son regulados negativamente en los estadios medio y tardío de la gestación en modelo animal de rata.

Las reglas 2 y 3 se interpretan en el mismo sentido. En la regla 2, se muestran genes que tenían la anotación gestación (*female pregnancy*) y un patrón de niveles bajos de expresión hacia 12 días, con un incremento en la expresión hacia 16 y nuevamente un descenso en los niveles de expresión hacia el final de la gestación (21 días) (Fig.5B).

Este es el caso de genes como *Tpbpa* y *Psgb1*, además en este grupo se encuentra *Ghrel*, cuyo patrón de expresión aumenta de 12 a 16 días y desciende hacia el final de la gestación coincidiendo con lo reportado en la literatura (20,36).

Finalmente con respecto a la regla 3, se trata de genes cuyo patrón de expresión mostró un ligero incremento en los niveles de expresión entre 12 y 16 días y un descenso hacia 21 días de gestación. Además, este grupo de genes mostró una asociación con el término ontológico de desarrollo de vasos sanguíneos. Este patrón podría indicar una represión en la expresión de este grupo de genes hacia el final de la gestación; tal es el caso de los genes *Plau* y *Srf* (Fig.5C).

Tabla 2. Algunas reglas de asociación originadas a partir de datos del transcriptoma de placenta y gene ontologies.

ID regla	Antecedente	Consecuente	Genes
1	GO:0001525 <i>Angiogenesis</i> Sobre-expresión en <i>p12l</i> vs <i>p16l</i>	Sobre-expresión en <i>p12l</i> vs <i>p21l</i>	<i>Mmp2</i> , <i>Angpt2</i> , <i>Hand2</i>
2	GO:0007565 <i>Female pregnancy</i> Baja expresión en <i>p12l</i> vs <i>p16l</i>	Baja expresión en <i>p12l</i> vs <i>p21l</i>	<i>Prl8a5</i> , <i>Tpbpa</i> , <i>Ceacam11</i> , <i>Psg29</i> , <i>Igfbp2</i> , <i>Ghrl</i>
3	GO:0001568 <i>Blood vessel development</i> Sobre-expresión en <i>p16l</i> vs <i>p21l</i>	No-DE hacia <i>p12l</i> vs <i>p16l</i>	<i>Srf</i> , <i>Srsf1</i> , <i>Col1a1</i> , <i>Plau</i> , <i>Bax</i> , <i>Jmjd6</i>

GO: gene ontology, DE: expresión diferencial

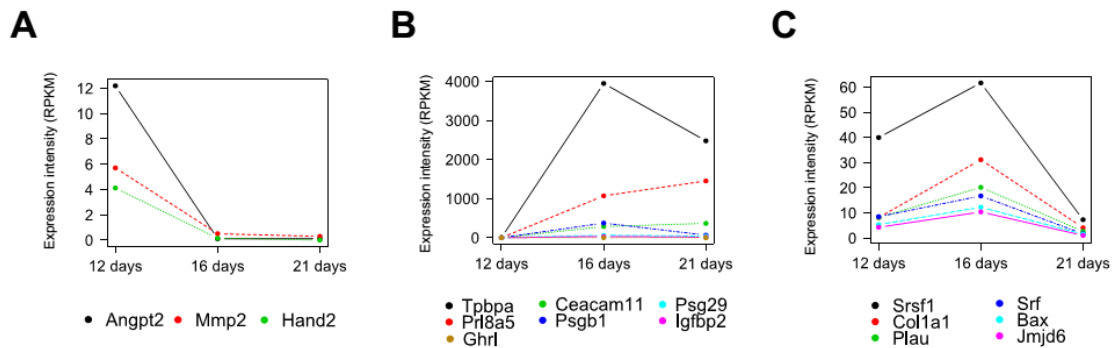


Figura 5. Reglas de asociación vinculando anotaciones GO y perfiles de expresión génica en placenta. Las figuras describen los perfiles de expresión de genes asociados con procesos biológicos de interés como (A) Angiogenesis, (B) Gestación y (C) Desarrollo de vasos.

3.6. Análisis de genes de Interés

Como se ha mencionado previamente (2.5.1. y 2.5.2), se seleccionaron 12 genes para el análisis de sus perfiles a nivel de mRNA y proteína a través de la gestación. El primer paso fue la confirmación de los resultados obtenidos en el estudio del transcriptoma, mediante la metodología de PCR en tiempo real. Se realizó un tamizaje de expresión génica de ocho genes (*Metrn1*, *Nnat*, *Fst*, *Lum*, *Fbn1*, *Des*, *Metrn* y *Fndc5*), en 12 de tejidos de rata (Hipotálamo, pituitaria, mucosa gástrica, tejido adiposo epididimal (WAT epi), tejido adiposo mesentérico (WAT mes), íleo, hígado, tejido adiposo pardo (BAT), testículo, corazón, placenta de 16 días y células), con el fin de obtener mayor información (Fig.6 y 7). A los cuatro genes restantes (*Bdnf*, *Intl-1*, *Nucb2* y *Rarres2*), no se les realizó dicho tamizaje puesto que esta información ya había sido publicada.

En las figuras 6 y 7 se observa una representación en graficas de barra de los niveles de expresión génica de los ocho genes antes mencionados, tomando como base de normalización los niveles de expresión de hipotálamo. Dicha información es fundamental en el abordaje de próximos estudios.

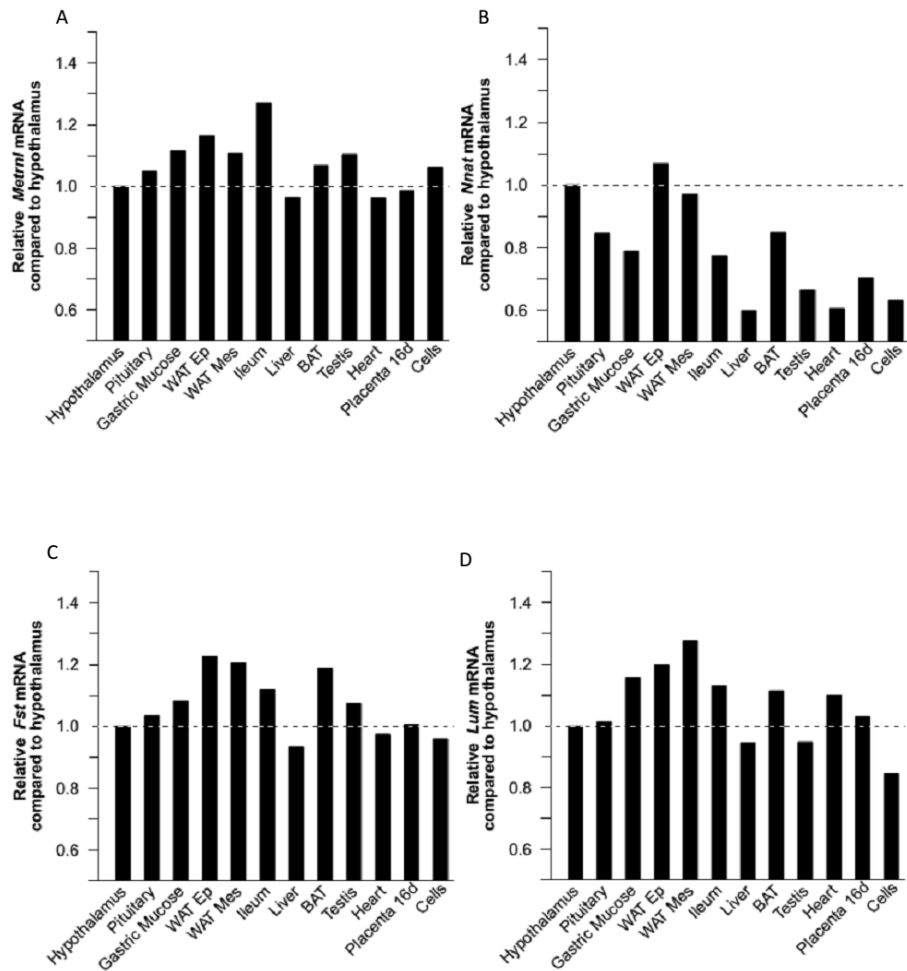


Figura 6. Tamizaje de niveles de expresión relativa de *Metrn1* (A), *Nnat* (B), *Fst* (C) y *Lum* (D). Se analizaron los niveles de mRNA de Meteorin like (*Metrn1*), Neuronatin (*Nnat*), Folistatin (*Fst*) y Lumican (*Lum*) en 12 tejidos de rata, mediante PCR en tiempo real. Los datos son presentados como medias de tres ensayos y normalizados con respecto al nivel en hipotálamo.

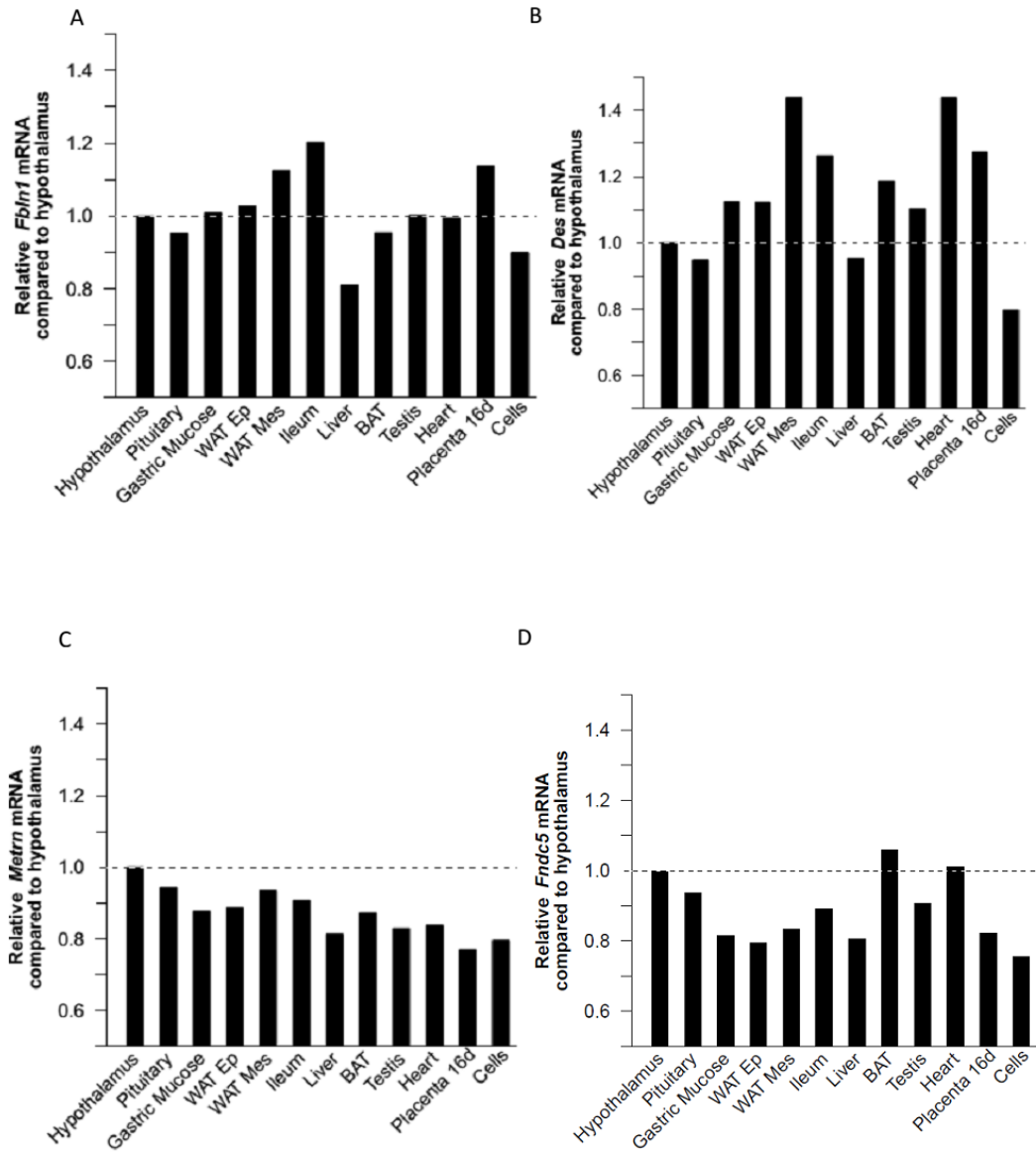


Figura 7. Tamizaje de niveles de expresión relativa de *Fbln1* (A), *Des* (B), *Metrn* (C) y *Fndc5* (D). Se analizaron los niveles de mRNA de Fibulin1 (*Fbln1*), Desmin (*Des*), Meteorin (*Metrn*) e Irisin (*Fndc5*) en 12 tejidos de rata, mediante PCR en tiempo real. Los datos son presentados como medias de tres ensayos y normalizados con respecto a los niveles de hipotálamo.

Posteriormente, se analizó la expresión de cada gen seleccionado, en placenta de rata de 12, 16 y 21 días de gestación y en ambos grupos experimentales (ratas gestantes *ad*

libitum y con restricción nutricional). A continuación se describen los resultados correspondientes a cada gen analizado:

Metrl: se observaron mayores niveles de expresión hacia 12 días de gestación, siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.001$) al compararlos con las demás edades gestacionales estudiadas (16 y 21 días) (Fig. 8A).

Nnat: se observó un incremento en los niveles de expresión hacia el día 16 de gestación, siendo significativamente diferente al ser comparado con los grupos de 12 y 21 días de gestación ($p < 0.001$). Además, se observaron diferencias significativas entre los grupos de 12 y 21 días de gestación ($p < 0.005$) (Fig. 8B).

Fst: el pico de expresión para este gen se observó hacia 12 días de gestación, siendo significativamente diferente al compararse con los demás grupos (16 y 21 días) ($p < 0.001$). Posteriormente se observó un descenso en los niveles de expresión hacia el día 16 y un leve incremento hacia el día 21 de gestación, encontrándose diferencias significativas entre estos grupos ($p < 0.05$) (Fig. 8C).

Lum: se observó un incremento en los niveles de expresión hacia el día 16 de gestación, siendo significativamente diferente al ser comparado con los demás grupos (12 y 21 días de gestación) ($p < 0.001$). Se observó una leve variación en los niveles de expresión al comparar entre condiciones nutricionales; sin embargo, dichas variaciones no fueron estadísticamente significativas (Fig. 8D).

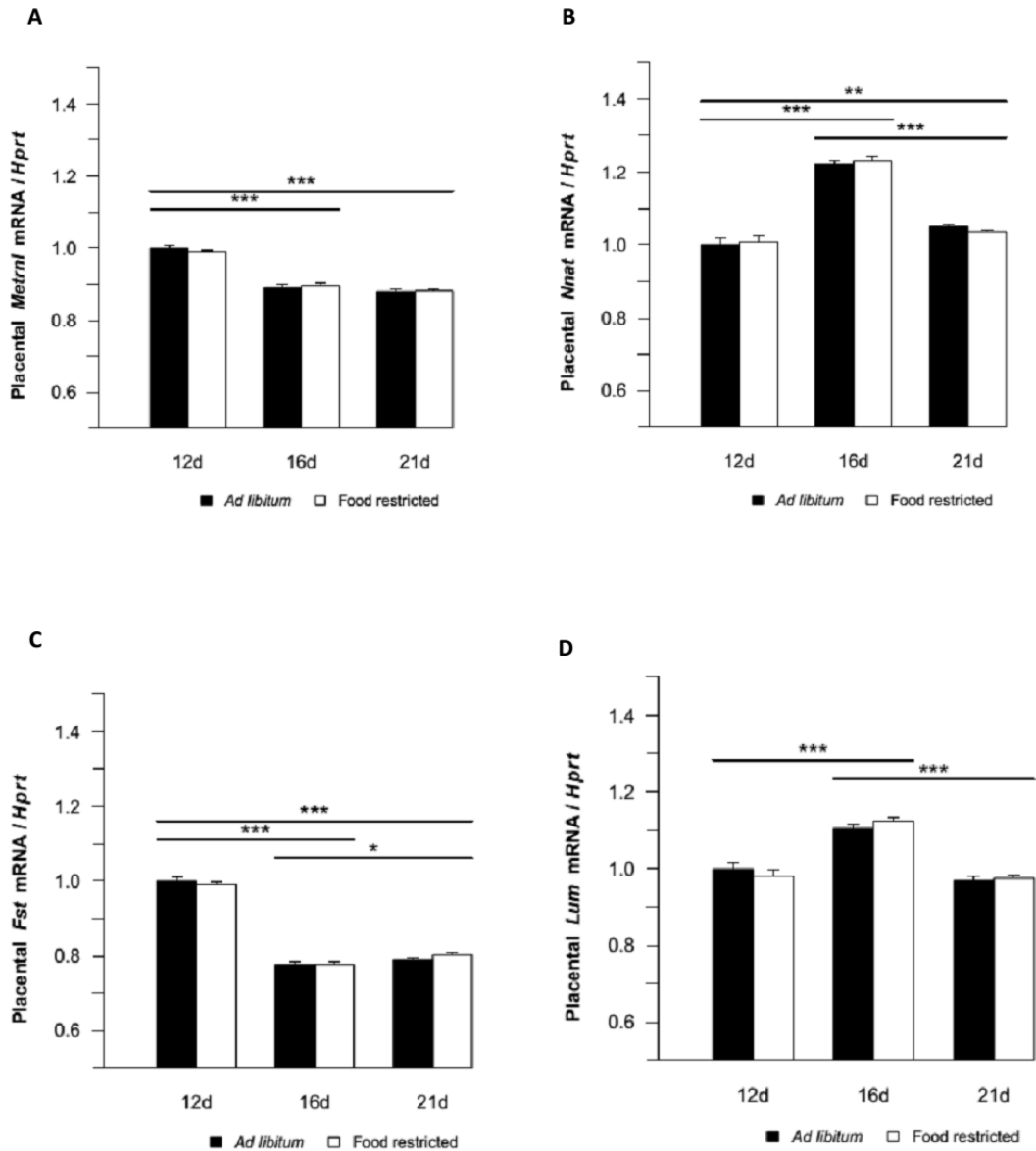


Figura 8. Confirmación de resultados provenientes del análisis del transcriptoma mediante PCR en tiempo real. En esta figura se pueden observar los niveles de expresión relativa correspondientes a *Metrn1* (A), *Nnat* (B), *Fst* (C) y *Lum* (D). Cada uno de estos genes fue analizado a partir de mRNA proveniente de placenta hacia 12, 16 y 21 días de gestación en ratas *ad libitum* y con restricción nutricional. Como punto de normalización se tomó placenta *ad libitum* de 12 días. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La significancia estadística fue asumida a partir de $p < 0.05$.

Fbln1: los niveles más bajos de expresión fueron detectados hacia el día 12 de gestación; hacia el día 16 se observó el pico de expresión, seguido de un descenso

hacia el día 21. Al comparar entre grupos se observaron diferencias significativas entre cada una de las edades gestacionales analizadas ($p < 0.001$) (Fig. 9A).

Des: es importante mencionar que este gen muestra un perfil interesante al observarse un descenso progresivo en los niveles de expresión conforme avanza la gestación. El pico de expresión se observó hacia el día 12 de gestación y el nivel más bajo hacia el día 21. Al hacer el análisis entre grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) (Fig. 9B).

Metrn: este gen mostró su nivel más alto de expresión hacia el día 16 de gestación, al realizar el análisis entre grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cada una de las edades gestacionales estudiadas ($p < 0.001$) (Fig. 9C).

Fndc5: se observaron los niveles más bajos de expresión hacia el día 12 de gestación. Posteriormente se observó el pico en los niveles de expresión hacia el día 16, seguido de un leve descenso hacia el día 21 de gestación. Al realizar el análisis entre grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las edades gestacionales estudiadas ($p < 0.001$) (Fig. 9D).

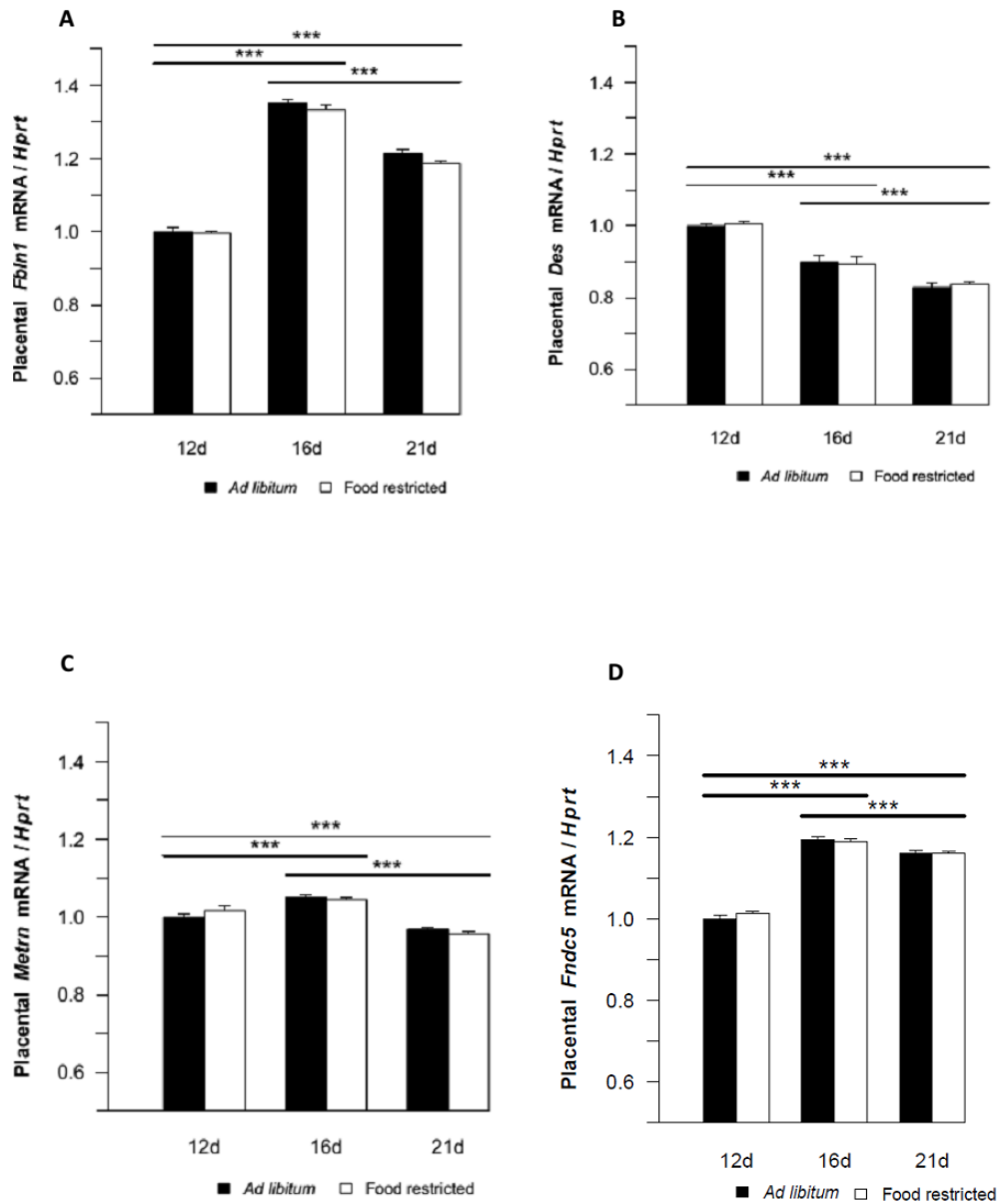


Figura 9. Confirmación de resultados provenientes del análisis del transcriptoma mediante PCR en tiempo real. En esta figura se pueden observar los niveles de expresión relativa correspondientes a *Fbln1* (A), *Des* (B), *Metrn* (C) y *Fndc5* (D). Cada uno de estos genes fue analizado a partir de mRNA proveniente de placenta hacia 12, 16 y 21 días de gestación en ratas *ad libitum* y con restricción nutricional. Como punto de normalización se tomó placenta *ad libitum* de 12 días. *** $p < 0.001$. La significancia estadística fue asumida a partir de $p < 0.05$.

Rarres2 (Chemerin): el pico de expresión de este gen se observó hacia el día 16 de gestación. Sin embargo, es importante mencionar la variación en los niveles de expresión

entre las condiciones nutricionales analizadas: se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar en 12, 16 y 21 días de gestación entre los grupos *ad libitum* y con restricción nutricional ($p < 0.001$) (Fig. 10A).

Nucb2: este gen mostró un perfil de expresión similar al observado en Desmin. Observando los niveles más altos de expresión hacia el día 12 de gestación con un descenso progresivo a medida que avanza la gestación. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de edades gestacionales analizados ($p < 0.01$). Adicionalmente, se observaron variaciones significativas al comparar las condiciones nutricionales analizadas, en el grupo de 16 días de gestación ($p < 0.01$). Finalmente, se observaron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión entre los grupos de 16 y 21 días de gestación en restricción nutricional ($p < 0.05$) (Fig. 10B).

Intl-1 (Omentin-1): los niveles más bajos de expresión se observaron hacia el día 12 de gestación, seguidos de un incremento hacia el día 16 (pico de expresión) y un leve descenso hacia el día 21 de gestación. Al analizar estas variaciones en los niveles de expresión entre grupos de edades gestacionales, se observaron diferencias estadísticamente significativas en cada una de estas ($p < 0.001$) (Fig. 10C).

Bdnf: este gen, a diferencia de los demás, fue analizado solo en la condición nutricional *ad libitum*, ya que previamente se había realizado un estudio bajo restricción nutricional crónica (Mayeur *et al.*, 2010 (37)). En nuestro análisis se detectaron los niveles más bajos de expresión hacia el día 12 de gestación, seguido de un incremento que se mantiene hasta el día 21 de gestación. Al análisis entre las edades gestacionales estudiadas, se observaron diferencias significativas entre el grupo de 12 días, comparado con los grupos de 16 y 21 días de gestación ($p < 0.001$) y entre los grupos de 16 y 21 días de gestación ($p < 0.05$) (Fig. 10D).

En la mayoría de los genes analizados no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión, al comparar las condiciones de alimentación *ad libitum* y restricción en el modelo de estudio con excepción de lo ilustrado en las Fig. 10A y 10B, como se mencionó previamente.

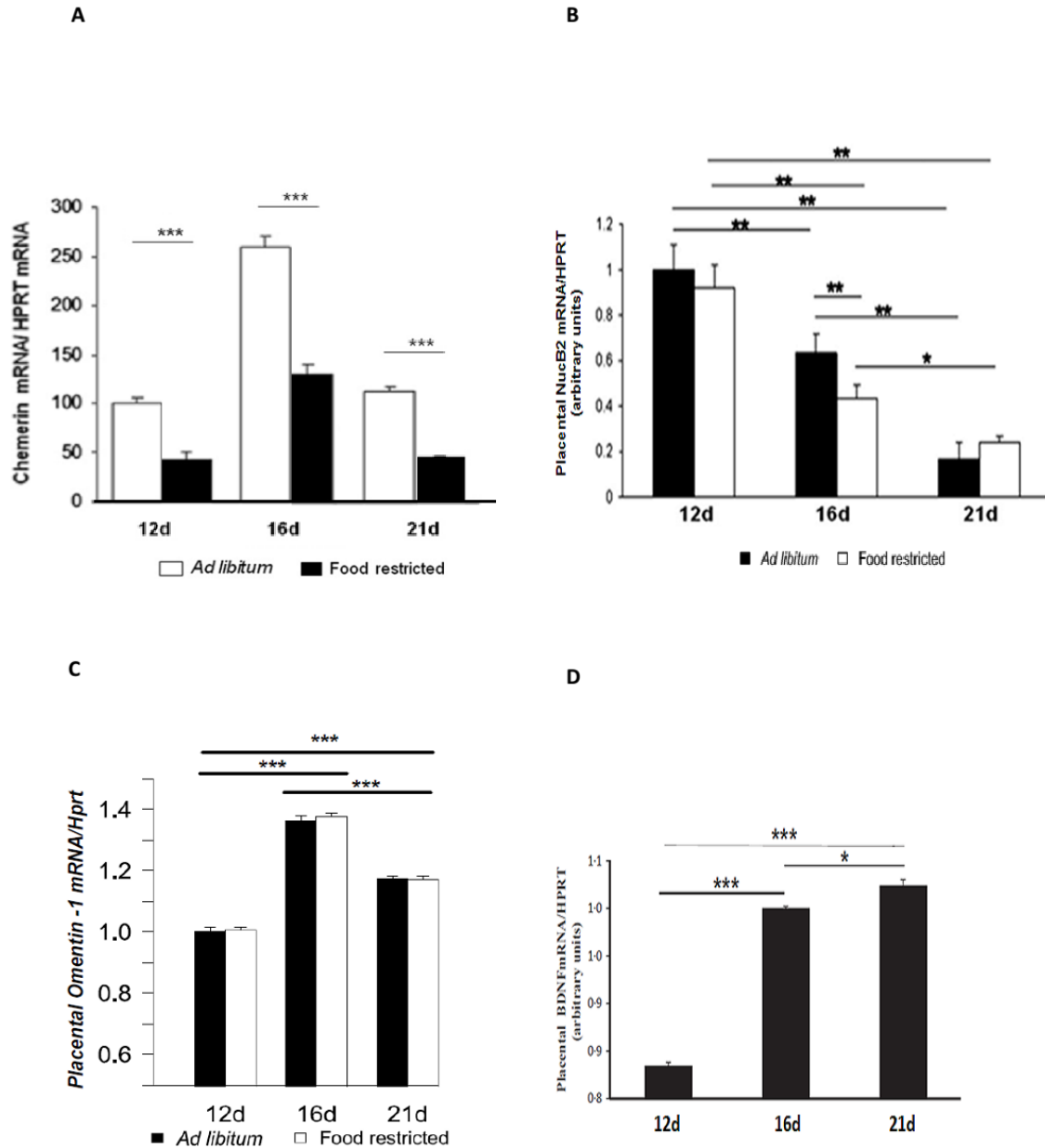


Figura 10. Confirmación de resultados provenientes del análisis del transcriptoma mediante PCR en tiempo real. En esta figura se pueden observar los niveles de expresión relativa correspondientes a Chemerin (A), Nucb2 (B), Omentin-1 (C) y Bdnf (D). Cada uno de estos genes fue analizado a partir de mRNA proveniente de placenta hacia 12, 16 y 21 días de gestación en ratas *ad libitum* y con restricción nutricional. Como punto de normalización se tomó placenta *ad libitum* de 12 días. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La significancia estadística fue asumida a partir de $p < 0.05$.

3.7. Estudio de Inmunoreactividad en placenta

Se estudió la expresión a nivel de proteína de cada gen seleccionado en placenta de rata. A continuación se describen los principales hallazgos en cada caso:

Chemerin: dado que Chemerin es una reconocida adipocitoquina, para el estudio de la inmunoreactividad en placenta de rata, se usó tejido adiposo como control de la técnica. Dicho estudio se realizó en placenta de 19 días de gestación, observando una intensa expresión citoplasmática tanto en trofoblastos de la zona laberíntica, como en el trofoespongio. También se observó inmunoreactividad en células endoteliales fetales (Fig.11 A, B y C).

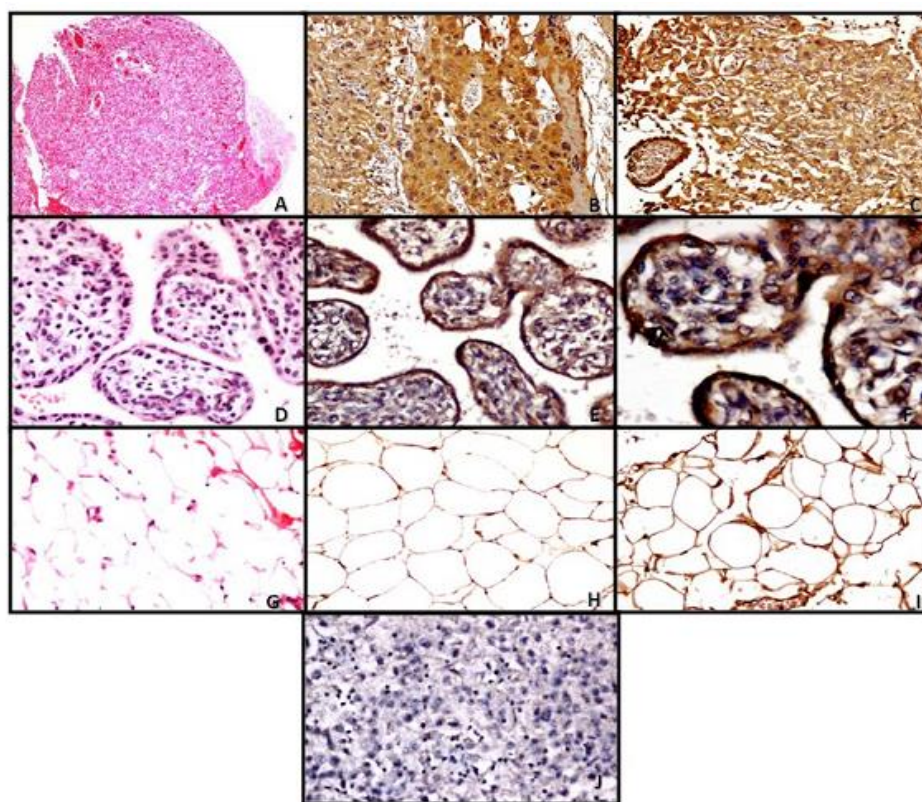


Figura 11. Inmunohistoquímica de Chemerin. (A) Placenta de rata normal de 19 días de gestación, teñida con hematoxilina – eosina y observada en 20X. (B) y (C) Se observa inmunoreactividad citoplasmática tanto en trofoblastos de la zona laberíntica como en trofoespongio (placenta de rata de 19 días de gestación) en 100X.

FNDC5 (Irisin): esta proteína fue analizada en placenta de rata de 16 y 21 días de gestación. Se analizaron tres zonas de la placenta: membranas embrionarias, zona laberíntica y células espongiotrofoblásticas y decidua. En placenta de 16 días se observó inmunotinción débil y principalmente en la zona laberíntica (Fig 12: A1 y B1). Mientras que hacia el día 21 se observó inmunoreactividad intensa en las células del amnios, en decidua y células espongiotrofoblásticas (Fig. 12: A3 y B3).

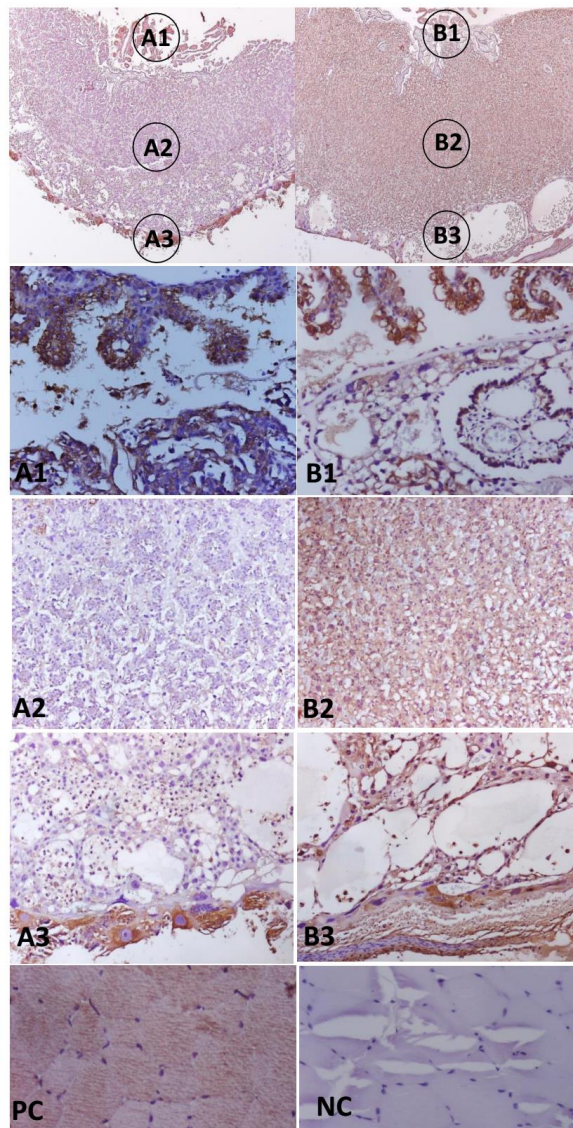


Figura 12. Inmunohistoquímica de Fndc5. Las imágenes A y B corresponden a placenta de rata de 16 y 21 días de gestación, respectivamente, tomadas en 2X. Se analizaron tres zonas placentarias: 1) membranas embrionarias (amnios y saco vitelino);

2) ilustra la porción media (zona laberíntica) y 3) correspondiente a la zona de la placenta (espongiotrofoblasto y decidua). En A1-B3 se muestran las mismas áreas de la placenta con magnificación 20X.

Nucb2/Nesfatin-1: en esta figura se muestra como control de expresión, la inmunolocalización de Nucb2 en mucosa glandular (Fig. 13A) y escamosa (Fig. 13B) de estómago de rata. Se analizó la inmunoreactividad de esta proteína en placenta de 19 días de gestación normal, observando inmunoreactividad en la región correspondiente a membranas embrionarias (amnios) (Fig. 13D) y decidua (Fig. 13E). Además se analizó testículo de rata observando inmunoreactividad leve (Fig. 13G y F). En las secciones (Fig. 13C, F e I), se muestran los respectivos controles negativos de los tejidos antes mencionados.

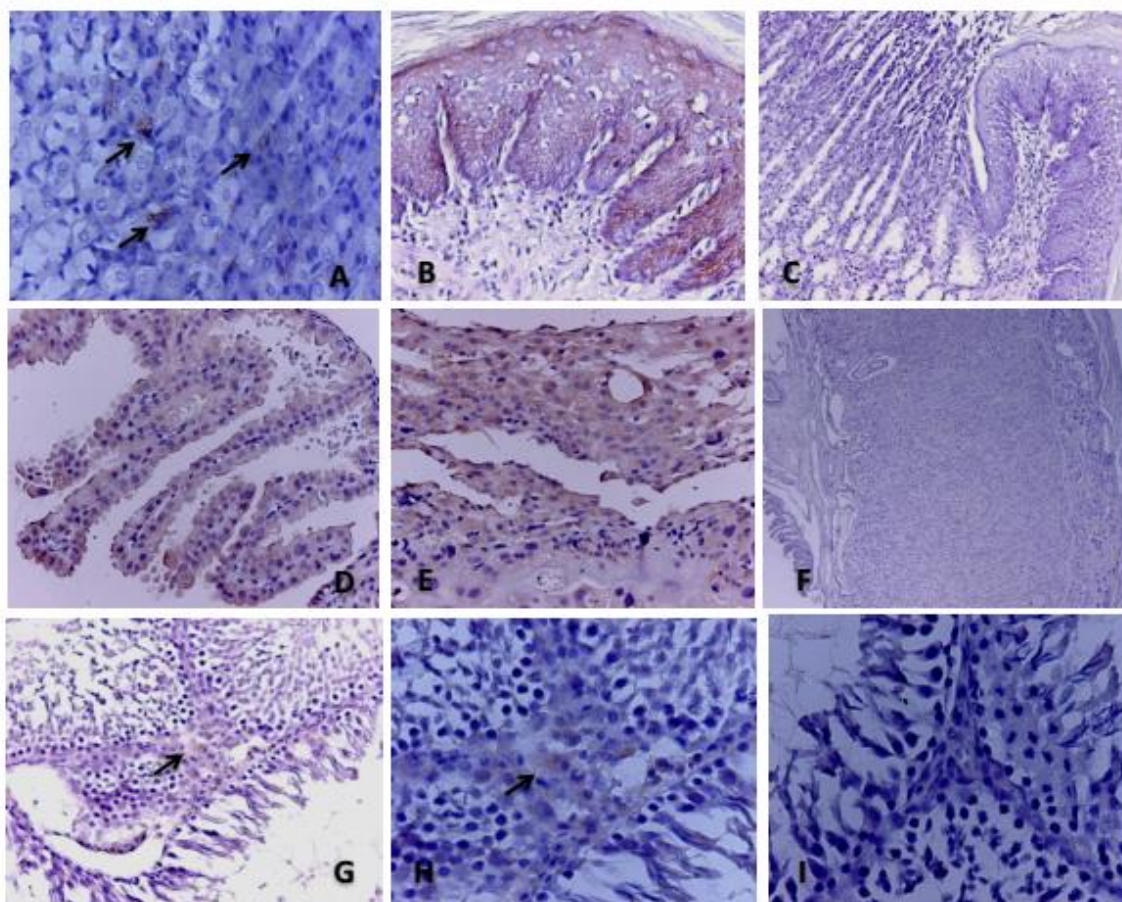


Figura 13. Inmunohistoquímica de Nucb2. Se observó inmunolocalización para Nucb2 en células gástricas de la mucosa glandular (A), además en la mucosa escamosa de estómago de rata (B). Con respecto a la placenta se observó inmunoreactividad moderada en el amnios (D) y la decidua (E), en placenta de 19 días de gestación.

Finalmente, se observó inmunoreactividad leve en células de testículo de rata (G y H). En (C, F e I) se muestran los controles negativos de los tejidos antes mencionados.

BDNF: para el análisis de este gen se abordó el estudio complementario del receptor TrkB. La inmunoreactividad de BDNF y TrkB se analizó en placenta de 12, 16 y 21 días de gestación. El patrón de inmunoreactividad observado para BDNF es interesante en cuanto a que se observa un descenso a medida que transcurre la gestación. De esta manera, se observó intensa inmunoreactividad para BDNF en células deciduales, así como en la porción laberíntica en placenta de 12 días. Posteriormente, se observó un patrón de inmunoreactividad moderada en placenta de 16 días en las mismas localizaciones placentarias y finalmente hacia 21 días se observó una inmunoreactividad leve (Fig.14A, C y E, respectivamente). Por otra parte, se observó inmunoreactividad intensa para TrkB en células deciduales y en la porción laberíntica en placenta de 12 y 16 días de gestación, mientras que en placenta de 21 días se observó inmunoreactividad leve en las porciones placentarias antes mencionadas (Fig.14B, D y F, respectivamente).

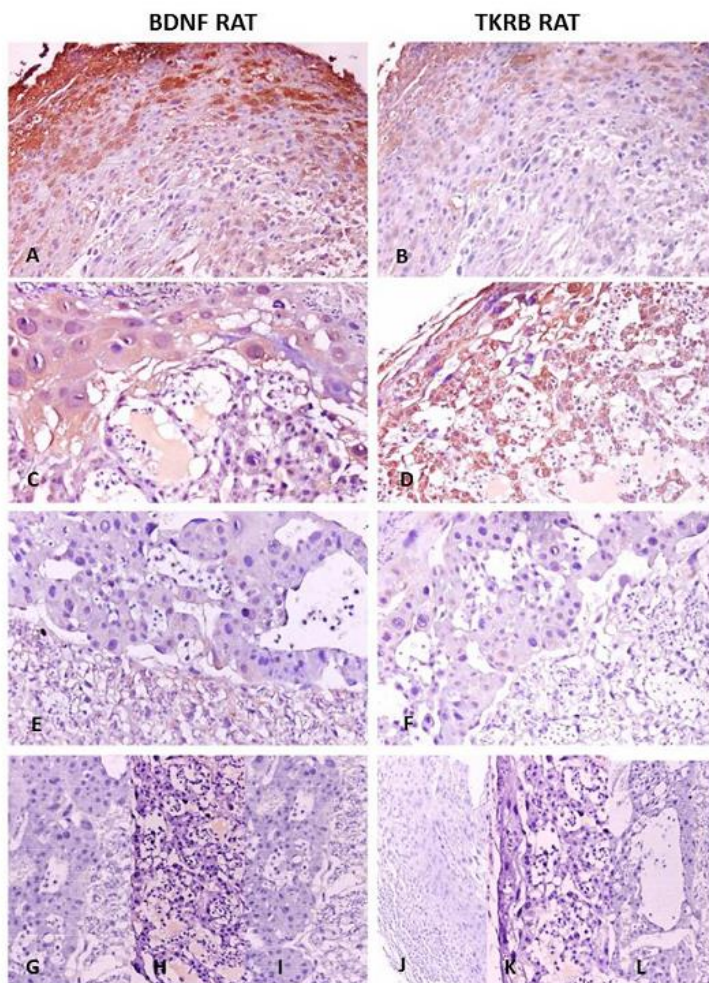


Figura 14. Inmunohistoquímica de Bdnf y TrkB. Se analizó la inmunoreactividad para BDNF y TrkB en placenta de rata de 12, 16 y 21 días de gestación. Se observó intensa inmunoreactividad en placenta de 12 días, moderada inmunoreactividad en placenta de 16 días y leve inmunoreactividad en placenta 12 días para BDNF, en células deciduales, así como en la porción laberíntica del plato coriónico (secciones A, C y E, respectivamente). Además, se observó inmunoreactividad intensa para TrkB en células deciduales y la porción laberíntica en placenta de 12 y 16 días, mientras en placenta de 21 días de gestación se observó inmunoreactividad leve en la misma localización placentaria (secciones B, D y F, respectivamente). Las secciones de G a L corresponden a controles negativos de la técnica, con omisión del anticuerpo primario, en donde (G y J) corresponden a placenta de rata de 12 días, (H y K) corresponden a placentas de 16 días, mientras (I y L) corresponden a placenta de 21 días de gestación.

Omentin-1: se observó inmunoreactividad para Omentin-1 en trofoblastos de la zona laberíntica (Fig.15D y F) y saco vitelino (Fig.15E) en placenta normal de 19 días de gestación. Como control positivo de la técnica se usó tejido adiposo blanco (Fig. 15H) y

como control negativo se usó placenta humana realizando la reacción sin el anticuerpo primario (Fig. 15I).

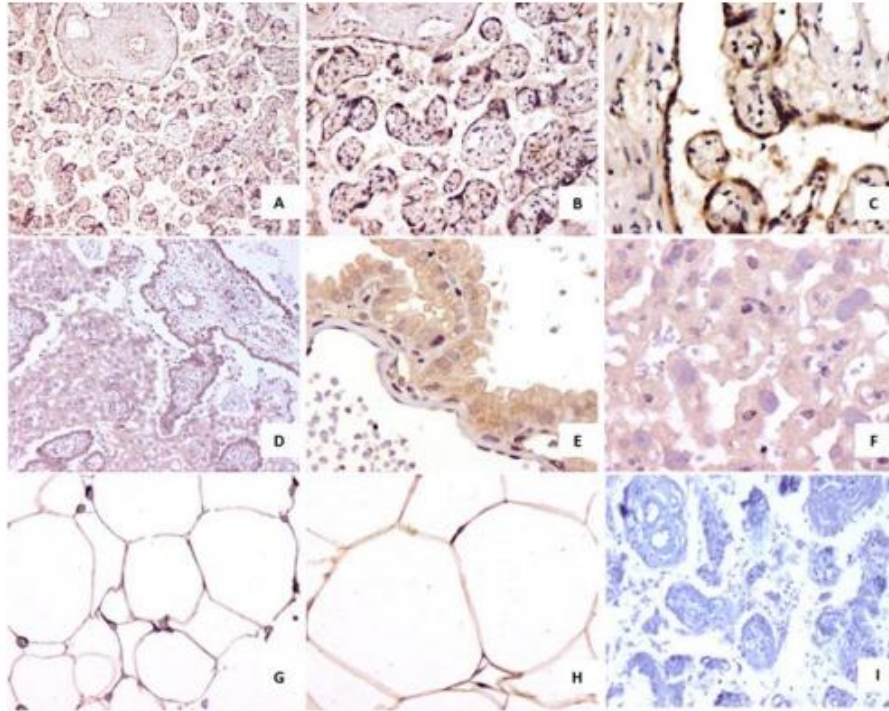


Figura 15. Inmunohistoquímica de Omentin-1. En D, E y F se muestra placenta de 19 días de gestación en 100X, 400X y 400X, respectivamente. Se observa expresión citoplasmática en trofoblastos de la zona laberíntica (D), mientras en F y E, se observa inmunoreactividad en el saco vitelino. En H se observa como control positivo tejido adiposo blanco de rata, finalmente, I corresponde al control negativo de la técnica, sin anticuerpo primario.

3.8. Análisis sérico

A continuación se describen los principales resultados en el análisis de patrones séricos de los productos de los genes seleccionados:

Chemerin: en este ensayo se incluyó como control interno el grupo virgen control (VC), además, se incluyeron dos grupos de edades gestacionales (8 y 19 días de gestación). El perfil sérico de Chemerin muestra un descenso a medida que avanza la gestación.

Observando los mayores niveles hacia el inicio de la gestación (8 días) y los niveles más bajos hacia el final de la gestación (21 días). Al analizar las variaciones entre grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cada una de las comparaciones realizadas: al comparar el grupo de 8 días con el grupo de 12 días ($p<0.01$) y con 16, 19 y 21 días de gestación ($p<0.001$). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de 12 con 16, 19 y 21 días de gestación ($p<0.01$). Finalmente, el grupo virgen control mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar con los grupos de 12 días ($p<0.01$), 16, 19 y 21 días de gestación ($p<0.001$) (Fig. 16). El grupo VC se tomó como grupo de normalización.

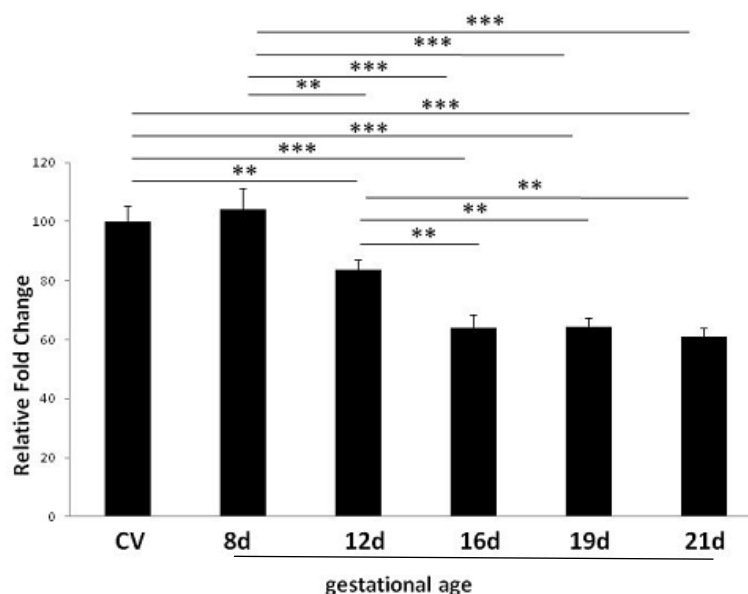


Figura 16. Perfil sérico de Chemerin a través de la gestación. Se presentan los cambios en los niveles de Chemerin a nivel sérico hacia las edades gestacionales 8, 12, 16, 19 y 21 días ($n=12$ en cada grupo) en condición *ad libitum* con respecto al grupo virgen control (CV). Los datos son expresados como media (S.E.M). Las diferencias estadísticamente significativas son indicadas como ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$. Se tomó el grupo virgen control como punto de normalización.

Irisin: el análisis del perfil sérico de Irisin a través de la gestación se realizó en los grupos de edades gestacionales de 12, 16 y 21 días en condición de alimentación *ad libitum* y con restricción. Adicionalmente, se incluyó como control interno el grupo de VC. Los niveles más altos de Irisin se detectaron hacia 16 días de gestación. Al realizar la comparación entre grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre

el grupo VC con 16 días en condición *ad libitum* y de restricción ($p < 0.01$). Además se observaron diferencias significativas al comparar los grupos de 12 con 16 días en condición *ad libitum* ($p < 0.05$) y en restricción ($p < 0.01$) y al comparar el grupo de 16 días con el grupo de 21 días en condición *ad libitum* ($p < 0.05$) y en restricción ($p < 0.001$) (Fig. 17). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las edades gestacionales analizadas entre las condiciones *ad libitum* y con restricción nutricional.

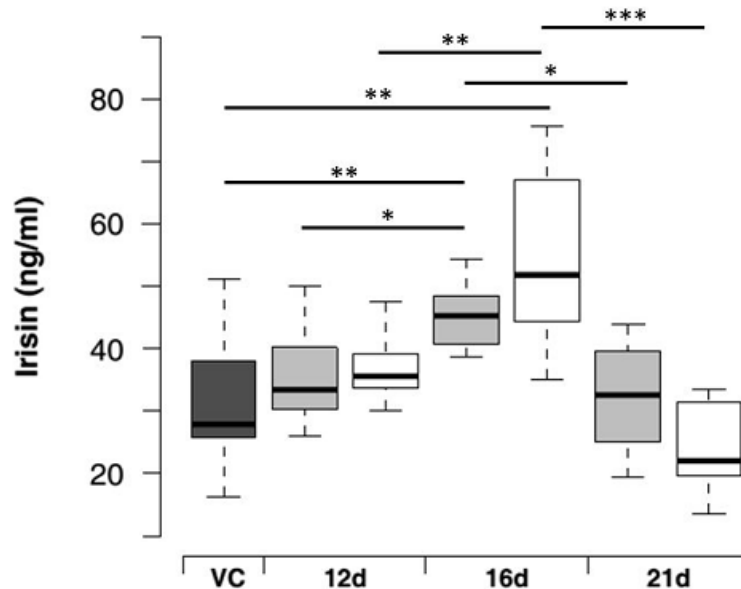


Figura 17. Niveles séricos de Irisin durante la gestación. Se observa el análisis de la variación de los niveles de Irisin a través de la gestación con respecto al grupo virgen control (VC) en condición *ad libitum* y de restricción nutricional. El punto más alto se observó hacia 16 días de gestación y los niveles más bajos se detectaron en el grupo VC. No se encontraron variaciones significativas entre las condiciones nutricionales analizadas (*ad libitum* y con restricción) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nesfatin-1: en este abordaje experimental se incluyó el grupo de 19 días de gestación y el grupo virgen control (VC) como control interno. Se observó un descenso hacia 16 días que se mantuvo hasta 21 días de gestación en condición *ad libitum*, esta variación fue significativa al comparar el grupo VC con los grupos de 16, 19 y 21 días (Fig.18A) (las letras escritas en la parte superior de la figura indican diferencias entre cada uno de los grupos analizados). Además, este ensayo se realizó en condición de restricción

nutricional observando variaciones significativas al comparar el grupo VC con todos los grupos de edades gestacionales y al comparar 12 con 19 días de gestación (Fig. 18B). Finalmente, se observó una variación significativa al comparar entre condiciones *ad libitum* y con restricción hacia 12 días de gestación ($p < 0.001$) (Fig. 18C).

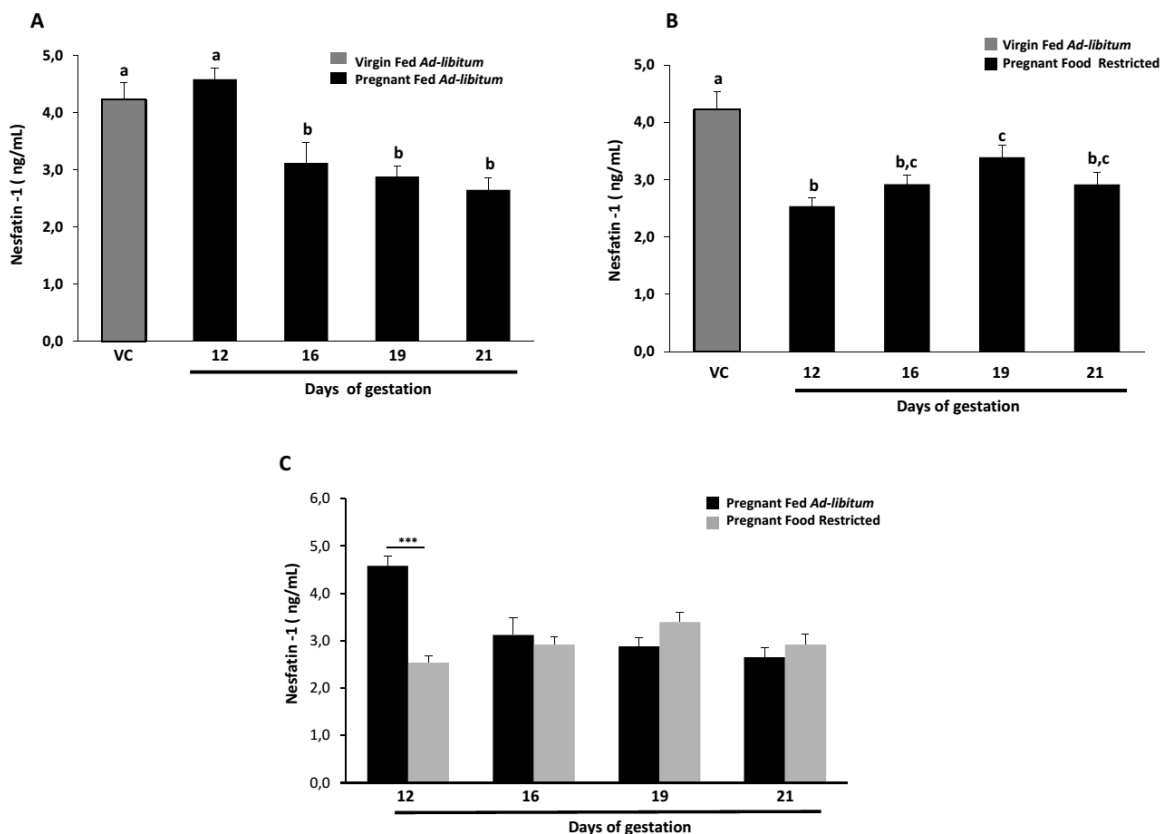


Figura 18. Niveles séricos de Nesfatin-1 a través de la gestación en rata. Los niveles de Nesfatin-1 fueron determinados mediante RIA en un grupo de rata virgen control y gestantes *ad libitum* y con restricción nutricional hacia 12, 16, 19 y 21 días de gestación. Las letras escritas en la parte superior de la figura indican diferencias entre los grupos analizados. La sección A corresponde a los niveles séricos de Nesfatin-1 en las edades gestacionales antes mencionadas, en el grupo de ratas alimentadas *ad libitum* comparados con el grupo virgen control. B corresponde a los niveles séricos de Nesfatin-1 en condición de restricción nutricional en las edades gestacionales antes descritas comparado con el grupo virgen control y C corresponde a los niveles séricos de Nesfatin-1 comparando el grupo de ratas gestantes alimentadas *ad libitum* con el grupo de restricción nutricional en las edades gestacionales antes mencionadas. Los datos se expresaron como la media (S.E.M). Las diferencias significativas se indicaron a partir de $p < 0.05$.

BDNF: se determinaron los niveles séricos de BDNF en el grupo virgen control y en el grupo de ratas gestantes alimentadas *ad libitum*. Los niveles más bajos se observaron hacia 12 días de gestación en comparación con el grupo virgen control (las letras escritas en la parte superior de la figura indican diferencias entre cada uno de los grupos analizados) ($p=0.0012$). No se observaron diferencias significativas entre los demás grupos (Fig. 19).

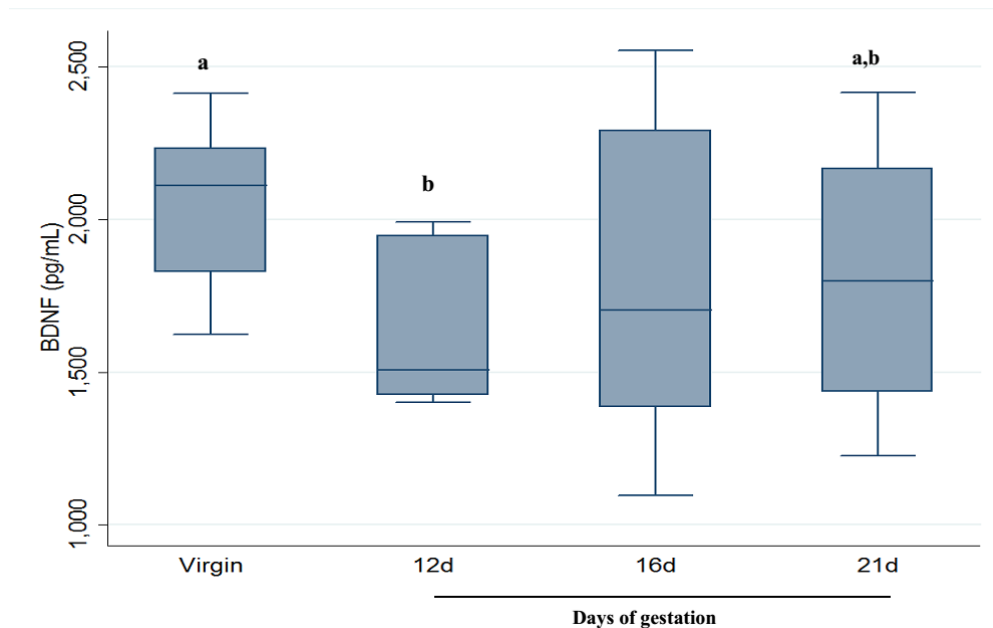


Figura 19. Niveles séricos de Bdnf a través de la gestación en modelo animal de rata. En esta figura se aprecia la variación en los niveles de Bdnf hacia 12, 16 y 21 días de gestación, tomando como punto de comparación el grupo virgen control. Las letras escritas en la parte superior de la figura indican diferencias entre los grupos analizados. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de 12 días de gestación y el grupo virgen control, los demás grupos no mostraron variaciones significativas.

Omentin-1: en el abordaje de este ensayo se incluyeron los grupos de edades gestacionales de 8 y 19 días, además se incluyó el grupo virgen control. El perfil sérico de Omentin-1 muestra un descenso a medida que avanza la gestación, sin que estas variaciones sean estadísticamente significativas. Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles séricos de Omentin-1 del grupo virgen control con el grupo de 21 días de gestación ($p<0.05$) (Fig.20).

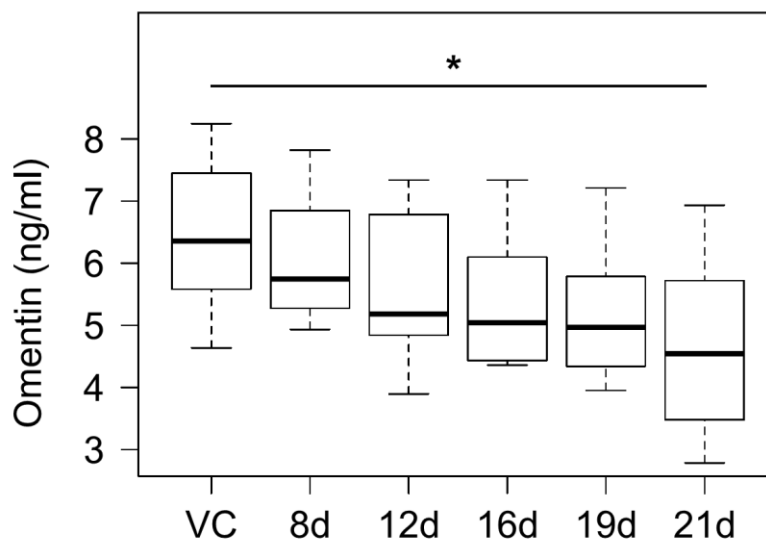


Figura 20. Perfil sérico de Omentin-1 durante la gestación en modelo animal de rata. En esta figura se aprecia la variación de los niveles séricos de Omentin-1 analizados en cinco grupos de edades gestacionales (8, 12, 16, 19, 21) y en el grupo virgen control, todos en condición *ad libitum*. Se observa un descenso con el avance de la gestación ($p = 0.046$ siendo significativamente bajo hacia 21 días comparado con el grupo virgen control ($p = 0.044$)). Otras comparaciones intergrupos no mostraron variaciones significativas.

4. Discusión

En la última década el tejido adiposo ha emergido como un elemento clave en la regulación de la homeostasis corporal, funcionando como una glándula endocrina en la modulación de eventos que incluyen el apetito, la captación lipídica, el metabolismo e incluso la síntesis de sus propias células constitutivas (38). Por esta razón, recientemente el tejido adiposo ha sido definido como un órgano activo con propiedades endocrinas, paracrinas y autocrinas (39).

El tejido adiposo secreta hormonas conocidas como adipoquinas o adipocinas, reflejando su origen y sus efectos como citoquinas en los tejidos blancos. Aunque muchas de estas proteínas se expresan primariamente en el tejido adiposo, se han detectado otros sitios de síntesis, presumiendo así efectos paracrinos para casi todas las proteínas hasta ahora descritas. Dichas adipoquinas están implicadas en procesos como diferenciación de adipocitos, metabolismo energético, la sensibilidad a la insulina, la inflamación, la inmunidad, el cáncer y la regulación de la angiogénesis (39).

El mejor ejemplo de una adipoquina es la Leptina, la cual se expresa de manera abundante durante la diferenciación del adipocito y ha sido identificada en tejidos tan diversos como el epitelio digestivo y el trofoblasto (38). El efecto pleitrópico de la Leptina es evidente en diferentes procesos de la reproducción en mamíferos, como la estimulación de la secreción de la gonadotropina a nivel del eje hipotálamo - hipofisario, contribuyendo a la modulación de la esteroidogénesis ovárica, la embriogénesis, el proceso de implantación y la función placentaria (38).

Por otra parte, a partir de estudios de DNA complementario (cDNA) en tejido adiposo omental humano, se descubrió una proteína expresada por células del estroma del tejido adiposo, que fue denominada Omentin (39,40).

Dicha proteína fue inicialmente descrita en células intestinales de Paneth, con el nombre de intelectin (40,41). Omentin-1, con código *uniprot* Q8WWA0 y con número en el *gene bank*, en la plataforma *nucleotides* AY549722.1, es una nueva adipoquina que está

compuesta por 313 aminoácidos y se expresa principalmente en el tejido adiposo visceral, más específicamente en células del estroma vascular del tejido adiposo visceral. También se ha documentado su expresión en las células endoteliales, el tejido adiposo epicardial humano, el timo, el intestino delgado, el colon, los reticulocitos, el ovario, el pulmón y la placenta (40). Precisamente, a partir de la expresión de algunas adipocitoquinas de la placenta, se ha evidenciado un incremento en sus niveles circulantes, muchos de estos asociados a adaptaciones metabólicas durante la gestación. En este sentido, cambios en los niveles circulantes de adipocitoquinas en mujeres gestantes, se han asociado con complicaciones materno-perinatales, indicando que estas adipocitoquinas, podrían estar asociadas al desarrollo de dichas patologías (42).

De esta manera, los niveles séricos de Omentin-1 han mostrado una correlación negativa con el Índice de Masa Corporal (IMC), los niveles séricos de insulina y el índice HOMA-IR. Además, recientemente se ha sugerido que Omentin-1 podría actuar regulando positivamente adiponectina, lo que a su vez afectaría el metabolismo de lípidos y, por lo tanto, indirectamente incrementaría la sensibilidad a la insulina en humanos (41). Por lo antes mencionado, Omentin-1 ha sido considerada como una adipocitoquina “buena” en términos de regulación metabólica. Por esta razón y como parte de los genes escogidos en la fase inicial del estudio, en el presente trabajo se analizó la expresión de Omentin-1 en placenta de rata en tres periodos gestacionales, 12, 16 y 21 días de gestación, así mismo, se determinó el perfil sérico de esta adipocitoquina en dichos periodos.

En el presente estudio se describió por primera vez el perfil sérico de Omentin-1 a través de la gestación en modelo animal de rata. En dicho perfil se observó un descenso constante conforme avanza la gestación (Fig.20), lo cual podría evidenciar la respuesta ante el estado “diabetogénico” que constituye la gestación y que ha sido antes descrito en otras adipocitoquinas sensibilizadoras de la acción de la insulina como adiponectina (43). Adicionalmente, se detectó inmunoreactividad para Omentin-1 en la zona laberíntica y en el saco vitelino, lo que evidencia su expresión en una zona importante de intercambio de nutrientes y sustancias entre la madre y el feto (Fig.15) (34).

Por otra parte, las proteínas *Nucleobindin* son una clase de proteínas de múltiples dominios de unión al calcio que interactúan con ácidos nucleicos y diferentes proteínas

reguladoras; por lo tanto, juegan un papel importante en diferentes vías de señalización. Actualmente, dos miembros han sido identificados, nucleobindin-1 (NUCB1) y nucleobindin-2 (NUCB2). A pesar de que estas proteínas son codificadas por dos genes no relacionados, NUCB1 y NUCB2 en humano, comparten un 62% de identidad en la secuencia de aminoácidos. En el 2006, Nesfatin-1, fue identificada como una nueva proteína codificada por NUCB-2 (44).

En este sentido, NUCB-2 fue identificado como un gen que se expresaba en adipocitos y células de meduloblastoma, el cual mostró respuesta como ligando del receptor activado por proliferadores peroxisomales gama (PPAR γ) y troglitazona. Este gen fue identificado como una secuencia codificante para Nucb2, el cual genera una proteína compuesta por 396 aminoácidos, que presentan una secuencia altamente conservada a través de especies de mamíferos y no mamíferos, un hallazgo que evidencia su posible importancia funcional (45). Nucb2 es procesado postraduccionalmente por la proenzima hormona convertasa (PC) 1/3, generando tres productos peptídicos diferentes dependiendo del punto de clivaje: N-terminal nesfatin-1 (correspondiente a aminoácidos 1-82), nesfatin-2 (aminoácidos del 85-163) y nesfatin-3 (aminoácidos 166-396), respectivamente. De acuerdo con la literatura, se han descrito diversas funciones para nesfatin-1, contrario a nesfatin-2 y 3, para los que no se ha descrito función biológica (45).

De esta manera, Nesfatin-1 se ha asociado con la supresión de la ingesta mediante dos posibles mecanismos: 1) a través de la activación del sistema melatonina, el cual es independiente de la vía de la leptina, dado que se observó que en ratas Zucker (con mutación en el receptor de leptina) esta hormona inhibió la ingesta, y 2) la inhibición de un factor orexigénico por nesfatin-1. Estudios *in vitro* han mostrado que nesfatin-1 causa hiperpolarización en neuronas del núcleo arcuato que son responsables de la secreción de Neuropeptido-Y (NPY). Esta evidencia se acepta como una posible explicación al efecto sobre la ingesta por parte de nesfatin-1 (46). Además, recientemente Darambazar *et al.*, han demostrado la respuesta de neuronas Nucb2/Nesfatin-1 en el Núcleo Paraventricular hipotalámico de ratón, en modelo *in vitro* e *in vivo*, a la administración de leptina central y periférica, así como el control de la ingesta posterior a esta administración. Así mismo, en ratones Knockdown para Nucb2 en el Núcleo

Paraventricular específico, se observó una disminución de la actividad anorexigénica de leptina, lo que sugeriría que Nucleobrevina-2/Nesfatin-1 en el Núcleo Paraventricular mediaría sustancialmente el efecto anorexigénico de leptina (47).

En el presente trabajo se determinó por primera vez, el perfil de expresión de *Nucleobrevina-2* en placenta de rata a los 12, 16 y 21 días de gestación, además, se describió el perfil sérico de Nesfatin-1, en las edades gestacionales antes mencionadas y la inmunoreactividad de Nucleobrevina-2 en placenta de rata. En lo referente a la expresión a nivel de mRNA de Nucleobrevina-2, se observó un descenso a medida que avanza la gestación, siendo puntos opuestos la expresión observada a los 12 días en comparación con 21 días de gestación, dicha diferencia fue estadísticamente significativa $p < 0.01$ (Fig.10B), no se observaron diferencias significativas entre el grupo alimentado *ad libitum* y de restricción crónica de la ingesta. Por otra parte, a nivel sérico se observó un comportamiento similar al descrito previamente, en donde, los niveles más altos de Nesfatin-1 se observaron a los 12 días y los más bajos hacia los 21 días de gestación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ (Fig.18).

Estos resultados se confirmaron con un análisis de *western blot* en donde se observó el descenso en la expresión de Nucleobrevina-2, a medida que avanza la gestación. Estos resultados concuerdan con el perfil de Nesfatin-1, siendo ésta una proteína anorexigénica, muestra un patrón de expresión en placenta antagónico al de algunos péptidos orexigénicos durante la gestación, como es el caso de la proteína relacionada agouti (AgRP) (48,49). Además, se observó inmunoreactividad para Nucleobrevina-2 en placenta de 19 días en la decidua y el amnion (Fig.13). De esta manera, Nesfatin-1 es una proteína que podría contribuir al balance energético de forma dinámica a través de la gestación (32).

Por otro lado, Chemerin también conocida como *retinoic acid receptor responder protein 2* (RARRES2) y *tazarotene-induced gene 2 protein* (TIG2) es altamente expresado en placenta, hígado y tejido adiposo blanco (50,51). Chemerin es sintetizada como un precursor de 163 aminoácidos. Posteriormente, los primeros 20 aminoácidos de este péptido hidrófobo, son clivados en la región N-terminal, por una proteasa desconocida, para formar pro-chemerin. Este último es secretado como un precursor de 143 aminoácidos, con baja actividad y que puede ser detectado ubicuamente en plasma en

concentraciones nanomolares (52). Dicho precursor sufre un subsecuente clivaje proteolítico en la región C-terminal que activa a Chemerin. Chemerin señala a través de CMKLR1 (chemokine-like receptor 1) o ChemR23 (chemerin receptor 23), los cuales son expresados en macrófagos, células dendríticas, adipocitos y células vasculares (50).

Uno de los tejidos que más aporta a la expresión de Chemerin es el tejido adiposo visceral en donde esta quemoquina regula la diferenciación y la función metabólica de los adipocitos. Chemerin ha sido descrita como una adipocitoquina proinflamatoria, debido a su liberación en tejido adiposo blanco y a que sus niveles circulantes han sido asociados con el aumento en el IMC, la acumulación lipídica, el desarrollo de obesidad y la resistencia a la insulina (52). Tomando esto en consideración, Chemerin podría ser un buen predictor de diabetes (51). La gestación es un proceso pro-diabetogénico fisiológico, en el cual la regulación metabólica juega un papel fundamental, más aun cuando de la acumulación de tejido adiposo en la primera fase, podría depender la viabilidad fetal en la segunda fase.

Así mismo, la gestación constituye un proceso en el que el sistema inmune de la madre experimenta una adaptación que impide el rechazo del feto y permite su desarrollo. Una de las características de la gestación es precisamente el pasar de un perfil de linfocitos Th1 en el inicio de la gestación, lo cual permite la implantación (53), caracterizado por una respuesta pro-inflamatoria mediada por diferentes poblaciones celulares, a un perfil de linfocitos Th2 de tolerancia inmune hacia la mitad de la gestación y posteriormente, regresar al perfil Th1, hacia el final de la gestación y el inicio del proceso de parto lo que facilita la expulsión del feto (54). Chemerin ha sido asociada como un marcador de inflamación, en enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn (52). De este modo los niveles de esta adipoquina se han correlacionado con los niveles de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa), Interleuquina 6 (IL-6) y proteína C reactiva. Adicionalmente, Chemerin se cliva en diferentes fragmentos con acciones pro y anti-inflamatorias (50). Por esta razón, chemerin constituye un blanco de estudio que podría aportar información importante acerca de este fino balance metabólico a partir de su estudio en modelo animal de rata.

En el presente trabajo se estudió la expresión de RARRES-2 en placenta de rata a los 12, 16 y 21 días de gestación y los niveles circulantes de Chemerin en las edades gestacionales antes descritas. El punto de máxima expresión de RARRES-2 se observó hacia el día 16 de gestación y el punto más bajo hacia el día 21 de gestación (Fig.10A). Este incremento en los niveles de expresión de RARRES-2 en la placenta hacia el día 16 de gestación, coincide con el punto en el cual la placenta alcanza su máxima invasividad a la decidua, mediante la acción de trofoblastos extravellosos y las diferentes sustancias que estos secretan, entre estas, metaloproteinasas, citoquinas, interleuquinas tolerogénicas como es el caso de IL-10 y TGF-beta (55). Normalmente, Chemerin ha sido documentado como una adipoquina con acción pro-inflamatoria (51), sin embargo, dado el microambiente de tolerancia inmune que se alcanza en la placenta posterior a la implantación, es probable que la acción quimiotáctica de Chemerin, si bien se esté dando, no genere la respuesta observada en otros contextos celulares, sino más bien un perfil opuesto contribuyendo al contexto tisular de la placenta en ese momento de la gestación. Sin embargo, para apoyar esta hipótesis se requieren estudios funcionales realizados en un ambiente lo más cercano posible al microambiente placentario y a esta edad gestacional.

Adicionalmente, en el presente estudio se determinó el perfil sérico de Chemerin en el modelo animal de estudio, observando que los niveles más altos se alcanzaron en el inicio de la gestación hacia el día 8 de gestación y el punto más bajo hacia el día 21, mostrando un patrón de descenso progresivo y continuo (Fig.16). Este perfil fue descrito en otras adipoquinas como es el caso de adiponectina y Omentin-1 (34). Dicho perfil sérico apoyaría la hipótesis antes expuesta de que Chemerin posiblemente actúe contribuyendo con el establecimiento de un microambiente tolerogénico. Hacia finales de la gestación, cercano al parto, el perfil celular e inmune cambia hacia (Th1) (55), siendo este un patrón pro-inflamatorio, el cual se vería reflejado en los bajos niveles de Chemerin.

De otro lado, los factores neurotróficos o neurotrofinas son proteínas secretadas que promueven el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia neuronal *in vivo* e *in vitro* (56,57). A la fecha se han reportado cinco factores neurotróficos denominados: el Factor de Crecimiento Nervioso (*Nerve Growth Factor* NGF), el Factor neurotrófico derivado de Cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), la Neurotrofina (*neurotrophin- 3*

(NT-3)) y la Neurotrofinas (*neurotrophin-4/5* (NT-4/5)) con alta identidad desde *Xenopus* a humanos (56).

Entre las características de estos factores cabe destacar que solo ejercen su función al unirse al receptor de la proteína madura y presentan alta afinidad por dos clases diferentes de receptores: *tropomyosin-related kinase* (Trk) de la familia de receptores quinasa (TrkA, TrkB y TrkC) y p75^{NTR}. Con respecto al primero de estos, se observó que presenta baja afinidad para el NGF, pero alta afinidad para BDNF y las demás neurotrofinas. Por otro lado, aunque p75 no tiene motivo catalítico, contribuye a la regulación de la supervivencia celular neuronal, la diferenciación y la plasticidad sináptica, además, regula la actividad de los receptores Trk y presenta afinidad por NGF (56).

Diferentes neurotrofinas han sido implicadas en la regulación central de la ingesta, el peso corporal y los procesos patológicos que conducen a la obesidad. Entre estas BDNF ha sido estudiado más extensamente (57). Inicialmente, las alteraciones en los niveles normales de BDNF se asociaron con diferentes estados de enfermedad incluyendo Alzheimer, Parkinson, Huntington, esquizofrenia y depresión (58). Posteriormente, a partir de estudios de manipulación genética en ratón, en los cuales, se deletaba parcialmente el gen que codifica a Bdnf (*Bdnf+/-*), lo que causa que se sintetice la mitad de los niveles de proteína de Bdnf observados en el genotipo *wild-type*, se observó un fenotipo severo de obesidad debido a hiperfagia. En estudios posteriores, se realizó la delección específica en cerebro de Bdnf, la regulación negativa de Bdnf mediante (short hairpin RNA) shRNA usando vectores virales y finalmente, se desarrolló un modelo de alelo hipomórfico de TrkB que expresó solo un cuarto del total observado en genotipos *wild type*. Todos los estudios antes mencionados, se caracterizaron por presentar hiperfagia, obesidad e imbalance metabólico e hiperglicemia (59).

Se ha reportado la expresión de TrkB en neuronas del núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), hipotálamo lateral, núcleo ventromedial (VMH) y núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH). Adicionalmente, se ha observado la expresión del mRNA de Bdnf en el corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el DMH, el PVN, el hipotálamo lateral, el área ventral tegmental, la sustancia nigra y el núcleo del tracto

solitario (58,59). En las áreas en las que se expresan ambos -Bdnf y TrkB-, es posible que ocurra señalización autocrina y paracrina, dada por la activación de TrkB debido a la unión con Bdnf, este último generado a partir de las mismas células o células vecinas (58).

Adicionalmente, se ha demostrado que Bdnf tiene efectos anorexigénicos, reduce el peso corporal, contribuye a la restitución de la sensibilidad a la insulina, la normalidad en los niveles de glucosa en modelo animal de diabetes (ratón *bd/bd*) y al control del gasto energético. Dicho efecto podría resultar a partir de la acción de leptina en las diferentes poblaciones neuronales en las cuales está presente tanto TrkB como Bdnf mediante acción paracrina (58). Adicionalmente, se ha propuesto que la acción anorexigénica de Bdnf puede deberse a la regulación mediada por la señalización a partir del *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (59).

Debido a que la gestación es un estado metabólico dinámico, que se caracteriza por hiperfagia en la primera mitad del embarazo, en donde se ha comprobado que tiene lugar una fuerte regulación central (60), en el presente trabajo se abordó el estudio de la expresión de Bdnf a nivel de mRNA, proteína circulante e inmunoreactividad en placenta de 12, 16 y 21 días de gestación en modelo animal de rata gestante. En el análisis de la expresión del mRNA de Bdnf se observó un incremento de los niveles a medida que avanza la gestación, siendo el punto más bajo hacia 12 días y el más alto hacia 21 días de gestación (Fig.10D). Similarmente, en el estudio de TrkB, el nivel de expresión más bajo se observó hacia los 12 días y posteriormente, se observó un incremento en el nivel de expresión hacia 16 y 21 días de gestación, sin diferencias significativas entre estos. Este patrón de expresión fue similar a los resultados obtenidos a nivel sérico, en donde se observó una disminución en los niveles de Bdnf al comparar el grupo de ratas vírgenes, con el grupo de ratas gestantes de 12 días de gestación, siendo éste el nivel más bajo y posteriormente, hacia el día 16 los niveles aumentan y se mantienen hasta el final de la gestación (Fig.19).

Los análisis de expresión de Bdnf y TrkB en placenta mediante inmunohistoquímica y *western blot*, mostraron el mismo patrón entre estos, detectando la mayor inmunoreactividad hacia los 12 días de gestación y un descenso progresivo a medida

que avanza la gestación, los niveles más bajos se detectaron hacia el día 21 de gestación (Fig.14), siendo este un patrón inverso al observado a nivel de mRNA y sérico.

A nivel genómico la correlación entre los niveles del mRNA y proteína es notoriamente baja, siendo cercana al 40%. Generalmente, las discrepancias se atribuyen a diferentes niveles de regulación subyacentes al transcrito y la proteína resultante (61). Entre las posibles causas de discordancia entre los niveles de mRNA y proteína a nivel general se encuentran: Disponibilidad de secuencias consenso de reconocimiento (Kozak), presencia de proteínas reguladoras, regulación mediada por pequeños RNA (sRNA), sesgo de codón e índice de adaptación de codón, densidad y ocupación ribosomal y tiempo de vida medio de la proteína (62).

Por otro lado, se ha encontrado una correlación pobre entre los niveles de mRNA y proteína de Bdnf posterior a tratamientos con antidepresivos. En este sentido, en un estudio realizado por Musazzi *et al.*, se concluyó que la proteína de Bdnf se eleva rápidamente posterior al tratamiento con antidepresivos por mecanismos postranscripcionales y que la inducción del mRNA de Bdnf es un proceso más lento (63). Las posibles causas de esta regulación pueden ser los puntos de expresión de Bdnf, pues se ha observado que en las neuronas esta proteína se encuentra localizada en las dendritas, en donde podría estar expuesta a una rápida respuesta de control transcripcional (63). Además, diferentes estudios han reportado regulación mediada por miRNAs hacia Bdnf en respuesta a la administración de fármacos antidepresivos, participando en la regulación postranscripcional de tono fino de la proteína madura (64,65). Finalmente, se ha descrito la regulación de la expresión de Bdnf mediada por proteínas; por ejemplo, en la activación en el hipocampo participan diferentes quinasas como PKA, Akt, CaMKs y MAPKs, las cuales pueden estimular la fosforilación de la proteína unida al elemento de respuesta (CREB), el cual incrementa la expresión de BDNF (66).

La discordancia en los resultados obtenidos entre el perfil de expresión observado a nivel de mRNA y los niveles de proteína, refleja los diferentes mecanismos postranscripcionales que podrían modular la expresión de Bdnf en tejidos neuronales y no neuronales, como es el caso de la placenta. Es importante mencionar que el patrón de

inmunotinción observado en la placenta, concuerda con lo descrito previamente (37); sin embargo, este es el primer reporte del perfil de expresión del sistema Bdnf/TrkB en placenta de rata en diferentes edades gestacionales, según el cual se observa un patrón descendente que podría indicar la importancia de la expresión de este sistema en la unidad feto-placentaria, en estadios tempranos de la gestación como ya ha sido descrito (37,67).

Finalmente, el patrón sérico observado muestra los niveles más bajos de Bdnf circulante hacia los 12 días de gestación, posiblemente reflejando una regulación negativa por parte del incremento en la secreción de insulina mediada por el aumento en la ingesta y, por lo tanto, en los niveles de glucosa maternos, característico del inicio de la gestación, lo cual permitiría obtener los requerimientos metabólicos necesarios en los estados de posimplantación (33).

Por otro lado, durante la última década el miocito ha sido identificado como una célula con una alta capacidad secretoria en paralelo con el concepto de adipocito, siendo identificada como una célula endocrina mayor. Aparentemente, las células musculares definidas como mioblastos o miocitos tienen la capacidad de producir cientos de factores secretados (68). Mientras la palabra adipoquina se refiere a factores secretados por el tejido adiposo, el término “mioquina” o miocina, se refiere a proteínas que son secretadas por el miocito. A partir de la caracterización de un número de éstas, se ha establecido que el músculo esquelético es capaz de producir y liberar proteínas que pueden comunicarse con células localmente en el músculo (autocrino/paracrino) o hacia otros tejidos distantes (endocrino) (68).

Las mioquinas son parte de una compleja red de comunicación a nivel corporal y juegan un papel fundamental en el diálogo entre el músculo esquelético y otros órganos como el tejido adiposo, el hígado, el páncreas y el intestino (69). Entre las mioquinas descritas se encuentran: miostatina, IL-6, LIF, BDNF, IL-7, IL-8, IL-15, Folistatina e Irisina (68,69).

En el 2012 Bostrom *et al.*, demostraron que el ejercicio físico tenía la capacidad de incrementar la expresión en el músculo esquelético de diferentes genes asociados al gasto energético y particularmente con el metabolismo de lípidos y glucosa (70). Entre estos genes se encontró *the type I membrane protein fibronectin type III domain*

containing 5 (Fndc5), el cual fue localizado en el locus 1p35.1 y que mostró ser expresado corriente abajo a la activación de *peroxisome proliferator activated receptor* y *co-activator-1 α* (PGC-1 α) (70). El precursor FNDC5 de 32kD es clivado y liberado en circulación, esta forma circulante toma el nombre de Irisin, una proteína de 22kD (70). La expresión de Irisin ha sido reportada en músculo esquelético, músculo cardiaco, tejido adiposo, hígado, cerebro, hueso, páncreas, riñones y ovario en diferentes niveles. De acuerdo con la comprensión actual de Irisin, esta ha sido documentada no solo como una mioquina, sino también como una adipoquina con funciones autocrinas y paracrinas (71).

En este sentido, Wu *et al.*, caracterizaron un tercer tipo de adipocito, los adipocitos beige o *brite* (de la unión de brown y white). De acuerdo con los autores este tipo de adipocito presenta características intermedias entre los adipocitos blancos y pardos. Este grupo demostró la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP-1) en esta clase de adipocitos, así como su capacidad de incrementar la termogénesis al ser activados por frío o activadores β 3-adrenérgicos. El proceso de estimulación de adipocitos *brite* es conocido como *browning*, el cual consiste en el desarrollo de adipocitos *brite* entre depósitos de adipocitos blancos, especialmente de tipo subcutáneo, probablemente a partir de mismo precursor celular (70).

Diferentes estudios han demostrado que Irisin puede incrementar el *browning* en adipocitos blancos de ratón, especialmente adipocitos blancos con alta expresión de CD137. Irisin actúa principalmente sobre el tejido adiposo blanco y mejora el consumo de energía, lo cual puede reducir la resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasa (71). Niveles altos de Irisin se correlacionan positivamente con la reducción de la glucosa y la concentración de insulina, así como el descenso en el consumo de carbohidratos, sugiriendo que Irisin está involucrada en la regulación del metabolismo de la glucosa en individuos con obesidad inducida por dieta (71).

Los niveles circulantes de Irisin se correlacionan positivamente con la masa muscular y negativamente con los niveles de glucosa en ayuno. Moreno-Navarrete *et al.*, identificaron una reducción en la expresión de Fndc5 en tejido adiposo visceral y subcutáneo, así como una correlación negativa con obesidad, leptina, TNF- α y contrario

a esto, encontraron correlación positiva con marcadores del tejido adiposo pardo, marcadores de macrófago, mitocondria y señalización de insulina (71).

Tomando en consideración el perfil de Irisin como una nueva hormona que está asociada con un incremento en el gasto energético, termogénesis y *browning*, es interesante el análisis de la expresión de *Fndc5* en un tejido endocrino y fundamental en la gestación como lo es la placenta. Además, el perfil metabólico de la hembra durante la gestación, especialmente en las etapas tardías es descrito como un estado “diabetogénico”. Por estas razones en el presente estudio se analizó el perfil de expresión de *Fndc5* en placenta de rata hacia 12, 16 y 21 días de gestación, así mismo, se estudió el perfil sérico de Irisin en las edades gestacionales antes mencionadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de inmunoreactividad, en placenta de 16 y 21 días se observa un incremento en la inmunoreactividad para *Fndc5* en la región laberíntica, la decidua y en los espongiotrofoblastos hacia el final de la gestación (Fig.12). Este resultado es concordante con los resultados obtenidos en el *western blot*, en el cual se realizó el estudio de los niveles de expresión de dicha proteína en placenta de 16 y 21 días y en músculo de las mismas edades gestacionales, como tejido de referencia. En placenta se observaron mayores niveles de expresión en placenta de 21 días en comparación con el día 16 de gestación, mientras en músculo se observó un patrón de expresión invertido, con un incremento en los niveles de expresión hacia el día 16 de gestación en comparación con el día 21, perfil similar al observado a nivel sérico (Fig.17).

Por otra parte, los niveles de expresión a nivel de mRNA de *Fndc5* en placenta, mostraron un incremento hacia 16 días de gestación, similar a los niveles circulantes de Irisin en este periodo gestacional (Fig.9D). Estos resultados demuestran que la placenta, a pesar de tener un papel fundamental en la regulación del metabolismo de la unidad materno-fetal durante la gestación, probablemente no sea la principal fuente de Irisin a nivel circulante. Además, debido a que la expresión de *Fndc5* ha sido documentada en diferentes tejidos, entre éstos el tejido adiposo blanco (71), es probable que el perfil sérico observado se deba a un aporte mayor de tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo, los cuales constituyen mayor área corporal en comparación con la placenta.

La regulación de la expresión de *Fndc5*/Irisin es poco comprendida; recientemente, Zang *et al.*, reportaron que el efecto de *browning* inducido por FNDC5, incrementaba debido a la expresión de la UCP1, que a su vez era mediada por la activación de la proteína quinasa mitogénica activada p38 (p38 MAPK) y la proteína quinasa reguladora extracelular (ERK). En este sistema PGC-1 α es regulado mediante la activación de la vía de señalización cAMP/PKA/p38 MAPK y juega un papel fundamental regulando la expresión de FNDC5. Además, Irisin también promueve la expresión de betatrofina (72). Por lo tanto, la expresión de PGC1- α en músculo estimula un incremento en la expresión de FNDC5 y la secreción de Irisin, que actuaría en tejido adiposo blanco estimulando la expresión de UCP1, mediante la vía de activación p38 MAPK, promoviendo la expresión de betatrofina (72).

Por otro lado, Quinn *et al.*, recientemente reportaron en modelo animal de ratón *knockout* para IL-15, el incremento en los niveles de expresión de *Fndc5* en músculo y el incremento en los niveles circulantes de Irisin, dependientes al estímulo con IL-15 y el posible papel de PGC-1 α en dicha estimulación (73). Sin embargo, en la placenta no existen estudios concluyentes que permitan dilucidar los mecanismos moleculares encargados de la regulación de la expresión de *Fndc5* y la secreción de Irisin a partir de este tejido durante la gestación en modelo animal de rata, el presente constituye el primer estudio en este contexto a la fecha.

Capítulo 1b

5. Introducción primer capítulo – microRNAs

El transcriptoma es definido como la colección entera de transcritos de RNA producidos a partir del genoma de una célula en un momento dado. En las últimas décadas, el advenimiento de las tecnologías de secuenciamiento del RNA (RNA-Seq), junto con el análisis computacional ha expandido ampliamente nuestro conocimiento acerca del transcriptoma (74). Las especies de RNAs son extraordinariamente diversas, en estructura, en tamaño y en función. El descubrimiento de los RNAs no codificantes reguladores, como microRNAs (miRNAs), RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y RNAs circulares (circRNAs), además de diferencias en el *splicing* de exones y regiones no traducidas 5'y 3' (UTRs), subraya la importancia de la complejidad de la regulación de la expresión génica (74).

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs, endógenos, no codificantes de aproximadamente 18 a 24 nucleótidos (nt) de longitud, que regulan la expresión génica por unión hacia un blanco complementario RNA mensajero (mRNA). A la fecha más de 2500 miRNAs han sido identificados en el genoma humano, estos pequeños reguladores están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos de gran importancia, incluyendo: desarrollo, proliferación y respuesta al estrés (75).

Se han descrito diferentes vías de biogénesis; a continuación se describe la biogénesis canónica. La transcripción de genes miRNA, es realizada por la RNA polimerasa II, en el núcleo y da lugar a un miRNA primario (pri-miRNA), el cual es procesado hacia el

extremo 5' "capping" y hacia el extremo 3' (Poliadenilación), siendo éste una estructura de doble hebra en forma de tallo y asa. El pri-miRNA es clivado posteriormente por el complejo microprocesador (compuesto por *Drosha* y subunidades del complejo microprocesador DCGR8) generándose el precursor de miRNA (pre-miRNA). Este último es un dúplex que contiene entre 70 a 100nt con regiones sin aparear, adoptando una estructura de bucle (76). Este pre-miRNA, es posteriormente transportado por exportin 5 del núcleo hacia el citoplasma, en donde será procesado por *Dicer* y se genera un miRNA dúplex de 18 a 25nt que se acopla con el complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC), formando el complejo denominado miRISC (76).

Para formar este complejo, Argonauta 2 (*Ago2*), sensa el dúplex y escoge la hebra más inestable termodinámicamente; una vez se descarta la hebra pasajera, la hebra madura del miRNA es la encargada de guiar el complejo miRISC hacia los blancos de mRNA. Los miRNAs se unen hacia el mRNA blanco, mediante complementariedad parcial a través de la región "seed" o "core" del miRNA, hacia las regiones 3'UTR o 5'UTR del gen blanco, generando una regulación negativa de tono fino mediada por represión traduccional, degradación y/o clivaje, lo cual resulta en una reducción en la síntesis de proteínas (76,77).

Aunque la mayoría de miRNAs muestran un efecto modesto sobre los blancos a regular, alteraciones en los patrones de expresión de miRNA pueden tener consecuencias importantes. De esta manera, una lista creciente de miRNAs han sido asociados con la patogénesis de enfermedades humanas incluyendo, enfermedades cardiovasculares, enfermedad hepática, enfermedad renal, desordenes psiquiátricos, obesidad, enfermedades autoinmunes y cáncer (77).

Es llamativo que se hayan identificado múltiples *clusters* de miRNA primate-específicos con expresión restringida a la placenta y a las células trofoblásticas. Esto puede ser un requerimiento fundamental, así como también los roedores tienen familias de clusters de miRNAs específicas, expresados únicamente en la placenta y los trofoblastos. Esto podría deberse a procesos de adaptación materna durante la gestación (74). Durante la gestación, la regulación mediada por miRNAs está implicada en un amplio rango de procesos, incluyendo la preparación del endometrio para la implantación, la regulación de

genes asociados con la respuesta inmune placentaria, el desarrollo placentario y la angiogénesis. Patrones de expresión anormal de estas moléculas, se han asociado con placentación anormal y complicaciones relacionadas con la gestación (78).

Un reporte basado en microarreglos sobre la expresión de miRNAs en placenta, identificó especies de miRNA que son diferencialmente expresadas en la placenta comparado con otros tejidos, como miR-141, miR-23a y miR-136 (79). Otro estudio realizado por Shankar *et al.*, a partir del análisis del transcriptoma de la placenta de la rata, mediante *RNA-seq*, demostró un patrón de expresión diferencial a nivel de mRNA en diferentes regiones de la placenta la rata, hacia 18.5 días de gestación (1). Este resultado es consistente con el dinamismo de la placenta y el gran número de funciones que realiza, siendo este patrón diferencial indicativo de los procesos que cada región placentaria puede desempeñar en cada momento de la gestación.

Posteriormente, Vaswani *et al.*, realizaron un estudio en placenta de rata durante la gestación media (días de desarrollo embrionario E.14.25 a E20), mediante metodología de microarreglos, reportaron alrededor del 7% de expresión diferencial entre el intervalo de edades gestacionales analizadas (80). Este resultado posiblemente se deba al estrecho rango de edades gestacionales analizadas y a la metodología empleada ya que, a pesar de seleccionar 22 mil genes, es posible que genes desconocidos no sean incluidos en el estudio y estos genes representarían un potencial desconocido.

Por otra parte, Saben *et al.*, mediante metodología de *RNA-seq*, demostraron el efecto de la obesidad materna sobre la expresión diferencial (> 70% de los genes se encontraban diferencialmente expresados), en diferentes regiones placentarias y afectando específicamente la señalización de la hormona tiroidea, hacia E18.5 (81). Hasta la fecha, no se encuentran reportes de estudios del perfil de miRNAs en placenta de rata en diferentes momentos de la gestación. Por lo anterior, en el presente estudio, por primera vez se analizó el perfil de miRNAs en placenta de rata hacia los días 12, 16 y 21 de gestación. Además, se analizó el efecto de la alimentación *ad libitum* y con restricción del 35% en la disponibilidad de alimento, sobre el perfil de expresión a nivel de miRNAs. A partir de los resultados obtenidos, se buscar hacer un aporte al conocimiento de la compleja red de regulación transcripcional que tiene lugar en la placenta de rata.

6. Materiales y Métodos

6.1. Animales

El protocolo de procedimientos contemplados en el presente estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales de estudio (ratas hembra Wistar de 200 - 220g), se adquirieron a partir del bioterio del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de luz controlada (12 horas de luz/oscuridad), a una temperatura de 21 +/- 1 °C, en cajas plásticas de poliestireno, ubicadas en instalaciones adecuadas para este fin en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, de acuerdo con la normativa vigente (18). Se realizó el seguimiento del ciclo estral de las hembras mediante análisis al microscopio del frotis vaginal, de acuerdo con metodología previamente descrita (19). Las edades gestacionales se establecieron, tomando como día primero el día siguiente a la copula y se llevó cada grupo a la edad gestacional correspondiente (n=12 / 12, 16 y 21 días de gestación). Posteriormente, cada grupo se subdividió aleatoriamente de acuerdo con las condiciones de la alimentación *ad libitum* y restricción de la ingesta en el 35%. Una vez cumplida la edad gestacional a los animales se les aplicó eutanasia siguiendo la normativa legal vigente (18). Se tomaron placentas sin contaminación fetal y de membranas coriovitelinas de acuerdo a la metodología previamente descrita (20).

6.2. Aislamiento de RNA

Los tejidos embebidos en Trizol® Invitrogen (en una proporción 1mL/100mg), fueron homogenizados usando el microhomogenizador de tejidos PRO2000®. Para la extracción del RNA total se empleó el kit PureLink® RNA mini kit – Life Technologies. El RNA total fue cuantificado mediante fluorescencia usando el kit Quibit®, Life Technologies, Invitrogen y el estudio de calidad del mismo, se realizó mediante un

corrido electroforético en condiciones denaturantes, en el cual se visualizaron las bandas 18S y 28S. Finalmente, se realizó un pool biológico a partir del RNA total de seis placentas provenientes de distintas ratas de la misma edad gestacional y equivalentes en términos de cantidad y calidad de RNA total, de acuerdo a la metodología previamente descrita (1).

6.3. Preparación de librerías y secuenciamiento de RNA

Las librerías de DNA complementario (cDNA) se construyeron de acuerdo a la metodología previamente descrita (22). Para el análisis de miRNAs se empleó el kit TruSeq® Stranded Total RNA with Ribo-Zero™ Gold Human/Mouse/Rat, en el cual, el paso inicial involucra la remoción de RNA ribosomal (RNAr), usando oligos blanco específicos biotinilados, en combinación con perlas removedoras de RNAr Ribo-Zero™. El kit Ribo-Zero Gold Human/Mouse/Rat depleta el RNAr citoplasmático y mitocondrial. Seguido de una purificación, el RNA resultante fue fragmentado por el tratamiento con cationes bivalentes a 94°C. Los fragmentos cortos de cDNA, purificados fueron ligados a los adaptadores de secuencia Illumina®.

Las bandas correspondientes a un rango de tamaño de 20-30nt, fueron separadas y purificadas a partir del gel de acrilamida y posteriormente unidas a adaptadores 3p y 5p, en dos pasos subsecuentes, cada uno seguido por una purificación en gel de acrilamida. Luego, se sintetizaron los cDNAs y se generó una librería templete de cDNA mediante amplificación por PCR. Las librerías amplificadas fueron sometidas a control de calidad y validación, los *clusters* que pasaron los controles fueron secuenciados en el secuenciador Illumina HiSeq™ 2500. Los detalles de la secuenciación son los siguientes: el tamaño de las librerías fue de 100nt y la longitud de las lecturas fue de miRNAs 50nt, se empleó el primer de secuencia *forward*, es importante anotar que las lecturas de estas librerías se realizaron con un duplicado técnico.

6.4. Procesamiento de datos provenientes de miRNAseq

Los datos provenientes del proceso de secuenciamiento fueron procesados usando la plataforma web Galaxy (23), empleando dos herramientas: 1) FastQC-ReadQC para

realizar el control de calidad a los datos crudos y posteriormente 2) Tophat-BOWTIE para alinear las lecturas secuenciadas con el genoma de *Rattus norvegicus* (rn5). En este punto, se generó una tabla de cuentas que fue analizada en pasos subsecuentes como se describirá más adelante.

6.5. Procesamiento de las lecturas

Se empleó el software R en el análisis estadístico de los datos provenientes del secuenciamiento (24). Las cuentas de genes se normalizaron y se reportaron como valores RPKM (*Reads per kilobase of transcript per million reads*). Se identificó un subgrupo de genes diferencialmente expresados ajustando a un punto de corte >2.0 veces de cambio (*fold change*) para placenta (25). Los perfiles de expresión diferencial se obtuvieron contrastando las diferentes condiciones metabólicas (*ad libitum* y restricción) y la edad gestacional (12,16 y 21 días).

6.6. Análisis de Componentes Principales

Los RPKM de genes diferencialmente expresados fueron sumariados mediante análisis de componentes principales (ACP) para discriminar las diferentes condiciones estudiadas a partir de los perfiles de expresión obtenidos. Este análisis se realizó empleando la matriz de correlaciones de Pearson. Para realizar este análisis se empleó el paquete de Excel XLSTAT Versión 2016.02.28540.

6.7. Análisis bioinformático de los datos

Con el objetivo de identificar los miRNAs de interés a partir de la expresión diferencial que éstos presenten, se seleccionaron los genes expresados diferencialmente y se agruparon en *clusters*. Posteriormente, se realizó el análisis de predicción de genes blanco de los miRNAs y finalmente se determinaron las anotaciones biológicas predominantes en cada *cluster* de miRNAs. El procedimiento antes mencionado se realizó empleando el software R (versión 3.1.0) tomando librerías de Bioconductor (82,83).

6.7.1. Análisis de expresión diferencial

En el análisis de expresión diferencial se emplearon los siguientes contrastes entre condiciones: p12 *ad libitum* (l) Vs p12 restringida (r), p16l Vs p16r, p21l Vs p21r, p12l Vs p16l, p12l Vs p21l, p16l Vs p21l, p12r Vs p16r, p12r Vs p21r, p16r Vs p21r. Para establecer el listado de genes expresados diferencialmente se normalizo usando la librería DESeq (84), la cual hace una estimación de la dispersión y la media de los conteos de cada gen y posteriormente, aplica un test basado en la distribución binomial negativa de los datos (85). El listado de los genes expresados diferencialmente se complementó usando la regla *fold-change*. De esta manera, los genes expresados diferencialmente, fueron aquellos con un *False Discovery Rate* (FDR) <0.05 y /o un *fold-change* absoluto >2 . A partir de este procesamiento se eliminaron miRNAs que no mostraron expresión diferencial.

6.7.2. Agrupamiento de miRNAs

Para la determinación de tendencias de expresión diferencial entre los grupos o comportamientos similares entre los grupos de genes, se empleó un análisis de agrupamiento o *clustering*. Se evaluaron los algoritmos jerárquicos de agrupamiento, *K-means* y *Self-Organizing Maps* (SOM) (86,87). En la selección del algoritmo y el número óptimo de *clusters* se utilizó el Índice de Homogeneidad Biológica (BHI) que mide la proporción de pares de miRNAs agrupados con la misma función (88). Se usaron las librerías *clValid* y *MmPalateMiRNA* (89,90). Al finalizar la etapa, cada miRNA fue asignado a un único cluster.

A partir de los genes identificados en el análisis de expresión diferencial, se realizó un nuevo procedimiento de agrupamiento, empleando el programa *MultiExperiment Viewer* (91), usando los parámetros por defecto. Se probaron los algoritmos *K-means* y *Self-Organizing Maps* (SOM) (86,87) y *Self-organizing Tree Algorithm* (SOTA) (92), usando los parámetros por defecto.

6.7.3. Análisis de redes de relevancia

Con el fin de establecer posibles redes de co-expresión entre familias de miRNAs o entre miRNAs individuales, se realizó un análisis empleando el algoritmo de redes de relevancia (93), usando los parámetros por defecto en el programa MultiExperiment Viewer (91), a partir del subgrupo de genes expresados diferencialmente.

6.7.4. Identificación de genes blanco

A partir de la lista de miRNAs expresados diferencialmente, se importó la lista de genes blanco a partir de la base miRDB (94), la cual es una base de dominio público <http://mirdb.org>. miRDB utiliza una herramienta bioinformática, miTarget, que realiza la predicción de los targets basada en máquinas de soporte vectorial (SVM) y conjuntos de datos de entrenamiento (95). Los targets predichos en miRDB tienen puntajes de predicción entre 50 y 100, dependiendo de la afinidad entre el miRNA y las posiciones de enlace en la región 3'UTR del mRNA. Entre mayor sea el puntaje, mayor la confianza sobre la predicción. Además, esta información se complementó con los coeficientes de correlación de Pearson entre los perfiles de expresión del miRNA y cada gen blanco. Coeficientes cercanos a -1 indicaban una fuerte asociación lineal entre sus perfiles de expresión, reforzando el supuesto de represión del miRNA sobre el gen blanco (96).

6.7.5. Análisis de enriquecimiento funcional

A partir del listado de genes blanco, se aplicó un análisis de enriquecimiento funcional usando la prueba exacta de Fisher. En el análisis se usaron las anotaciones ontológicas (GO) de los genes blanco (26). El análisis se realizó en cada *cluster* de miRNAs independientemente, seleccionando los genes blanco con puntaje de predicción superior a 60 y correlaciones significativas y superiores a -0.6 (94). Como resultado, se obtuvo un listado de anotaciones GO representadas significativamente en los *clusters* de miRNAs (Fig.21).

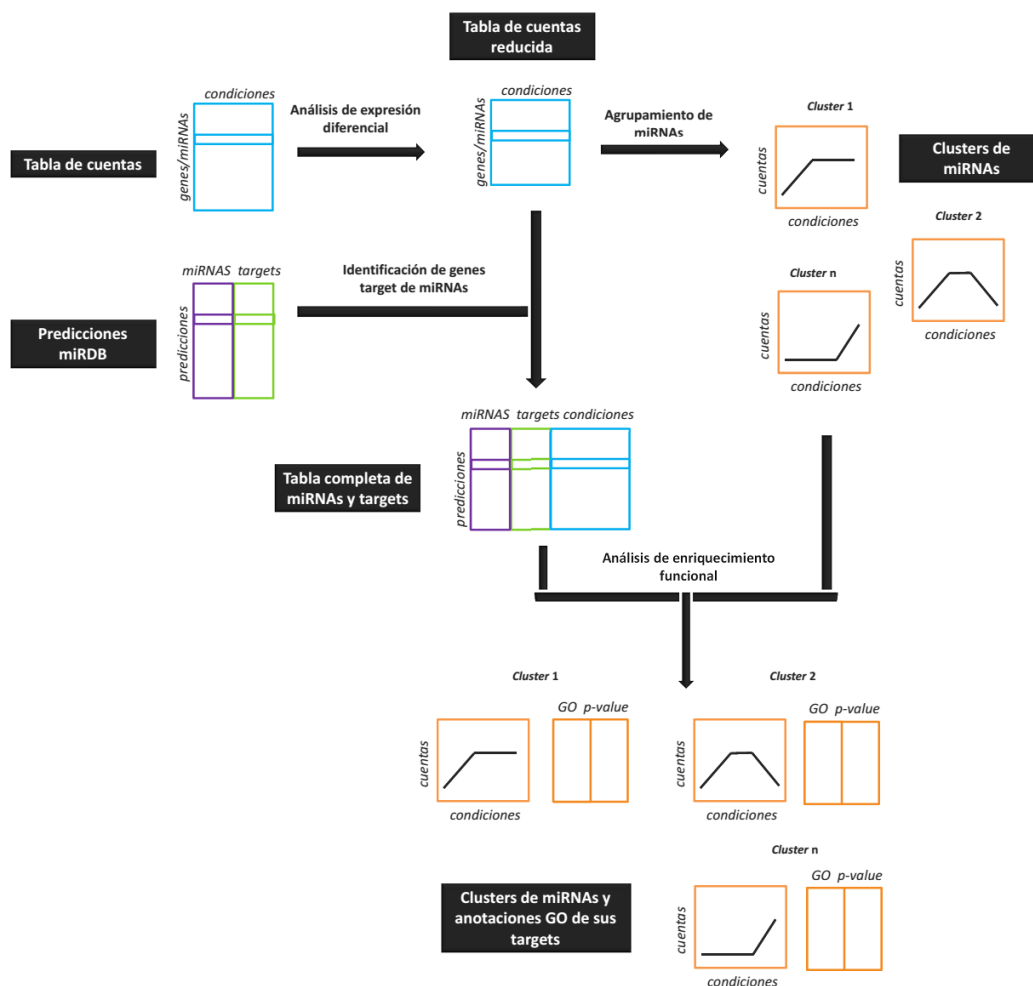


Figura 21. Metodología empleada en el análisis de los datos de miRNAs. Los datos fueron seleccionados por expresión diferencial y posteriormente, complementados con los datos de miRDB. Paralelamente se realizó un agrupamiento de los miRNAs en *clusters* según sus perfiles de expresión. Los resultados de ambas etapas convergen en un análisis de enriquecimiento funcional a partir de la información contenida en los *clusters*.

7. Resultados

7.1. Análisis de expresión diferencial

El análisis de los contrastes por edad gestacional y condición nutricional se realizó a partir de la combinación de genes mRNA y miRNAs en cada condición. De esta manera, se observó mayor expresión de genes en el contraste 12dL Vs. 16dL (1193 genes), en comparación con el contraste 16dL Vs. 21dL (503 genes). Por otra parte, al analizar los contrastes por condición nutricional se observó un ligero incremento en el nivel de expresión génica en el contraste 16dL Vs. 16dR (499 genes), en comparación con los contrastes 12dL Vs. 12dR (455 genes), mientras en el contraste 21dL Vs. 21dR se observó una marcada disminución en la expresión génica (283 genes) (ver tabla 3).

Tabla 3. Análisis de expresión diferencial por edad gestacional y condición nutricional.

Contrastes de condiciones analizadas								
P12dL Vs. P16dL	P16dL Vs. P21dL	P12dL Vs. P21dL	P12dL Vs. P12dR	P16dL Vs. P16dR	P21dL Vs. P21dR	P12dR Vs. P16dR	P16dLR Vs. P21dR	P12dR Vs. P21dR
1193	503	1045	455	499	283	1112	633	999

Posteriormente, se realizó el proceso de depuración de los datos de expresión génica para miRNAs. Este proceso inició a partir de una base de datos de expresión de miRNAs compuesta por 373 registros. Una vez realizada la depuración y la normalización de los datos, la base se redujo a 196 registros (Fig.22A).

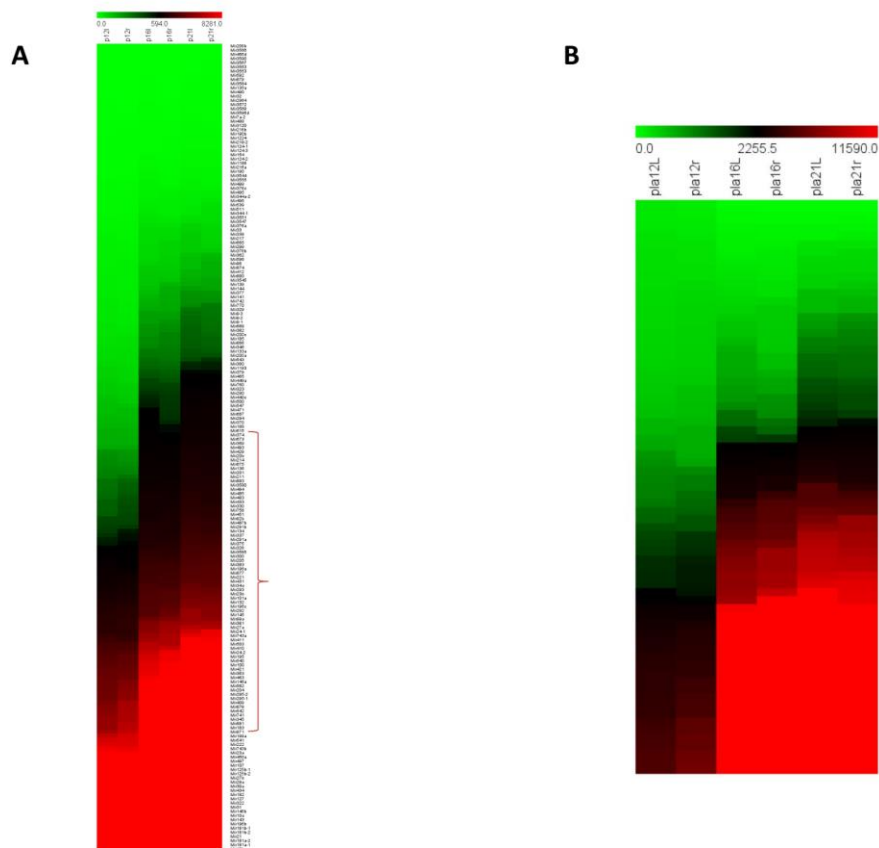


Figura 22. Mapa de calor de expresión diferencial de miRNAs de placenta de rata. Empleando la representación gráfica de mapa de calor se muestran los miRNAs con baja expresión (color verde), los miRNAs con alta expresión (color rojo) y los genes de expresión neutra (color negro). A: en la primera figura se muestra el perfil de expresión diferencial en el total de miRNAs (196 genes). B: en la segunda figura se muestra el perfil de expresión de 71 miRNAs, seleccionados por representar la mayor variación en el conjunto de datos analizados.

7.2. Análisis de Componentes Principales

Con el propósito de contrastar los niveles de expresión génica entre las condiciones analizadas, se incluyó el análisis exploratorio de los niveles de expresión génica mediante Análisis de Componentes Principales. De esta manera, los datos se filtraron por expresión diferencial e intensidades de expresión reportadas como RPKM.

Se seleccionaron los componentes principales (PC) que retuvieron la mayor varianza. En la Figura 23 se muestran los dos primeros componentes que corresponden al 97.14% de la varianza total. El círculo de correlación mostró una oposición entre los perfiles de

expresión observados hacia los 12 días de gestación con respecto a los 16 y 21 días, tanto en estados de alimentación *ad libitum* como con restricción.

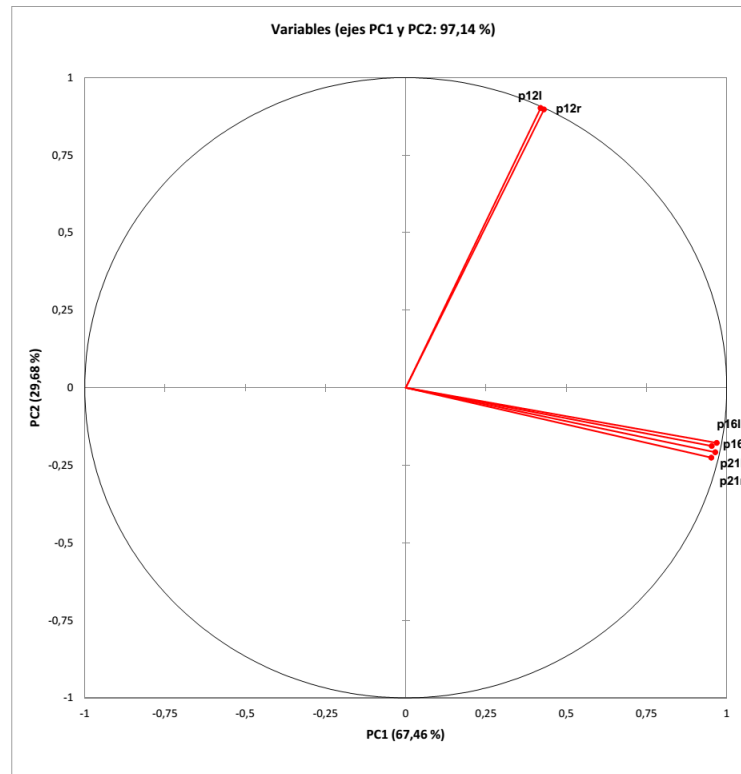


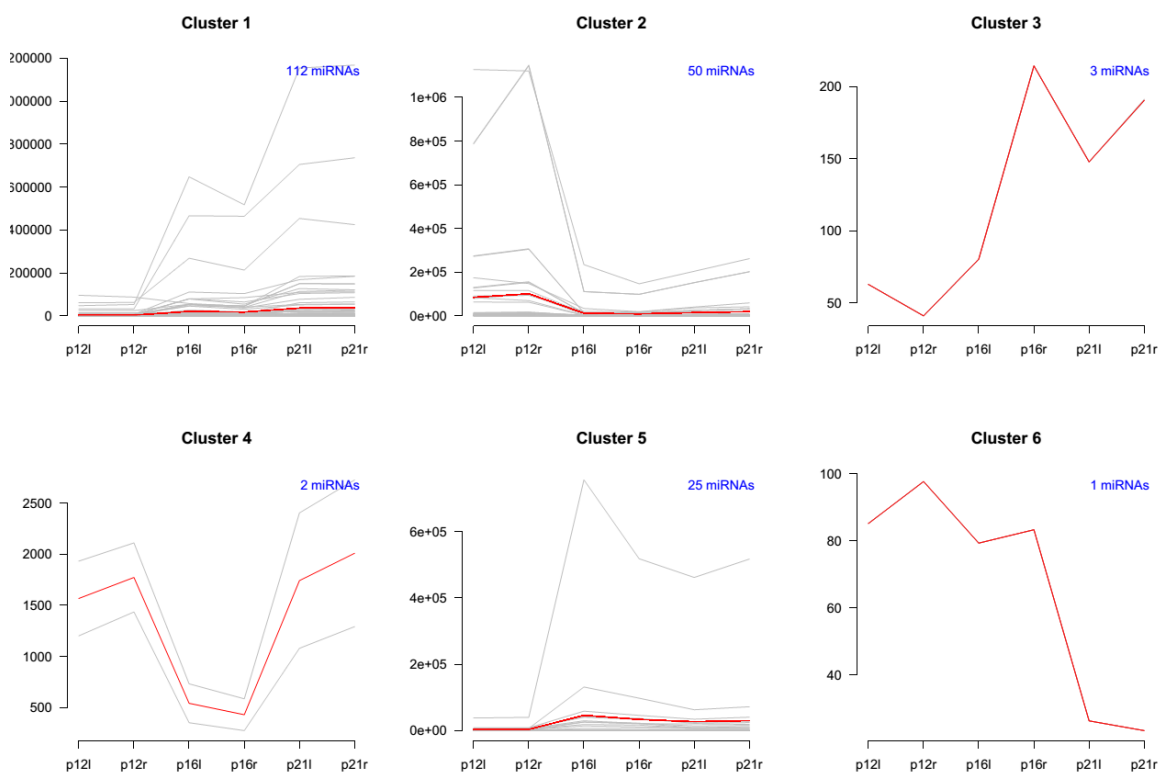
Figura 23. Análisis de Componentes Principales. En el círculo de correlación se muestra diferenciación de los datos a partir de cada condición analizada. Se muestra el porcentaje de varianza explicada (VE) por cada componente principal

7.3. Agrupamiento de miRNAs

A partir de la base de datos de expresión para miRNAs compuesta por 196 registros, se procedió a realizar el análisis de agrupamiento. En este análisis se encontraron ocho *clusters*, que agruparon totalidad de los registros, de tal manera que cada gen fue agrupado en un cluster de acuerdo al perfil de expresión en las edades gestacionales analizadas. De esta forma, en el cluster 1 se agruparon 112 miRNAs, cuya tendencia mostró un leve incremento hacia 16 días, el cual se mantiene y es progresivo hasta el final de la gestación. En el *cluster 2*, se agruparon 50 miRNAs cuya tendencia mostró los

niveles más altos hacia 12 días y un marcado descenso hacia 16 días y es constante hasta el final de la gestación, mientras el *cluster 3* fue compuesto por tres miRNAs, con un perfil de expresión que muestra un descenso hacia 12 días en restricción, un incremento hacia 16 días y una leve disminución hacia 21 días de gestación.

En el *cluster 4* se agruparon dos miRNAs que muestran un marcado descenso hacia 16 días de gestación, seguido de un incremento en la expresión hacia 21 días de gestación. Perfil contrario al observado en el *cluster 5*, compuesto por 25 miRNAs, en el cual se observó un leve incremento hacia 16 días de gestación, seguido de un leve descenso que se mantiene hasta el final de la gestación. El *cluster 6* y 7 fueron compuestos por un miRNA, en el *cluster 6* se observó un perfil descendente conforme avanza la gestación, mientras en el *cluster 7* se observó un perfil de expresión que sugiere un efecto de la restricción nutricional, al observar una disminución en los niveles de expresión en 12 y 16 días en restricción y los niveles más bajos hacia el final de la gestación. Finalmente, en el *cluster 8* que agrupó dos miRNAs se observaron los niveles más altos hacia 16 días de gestación y un descenso hacia el final de la gestación (Fig.24).



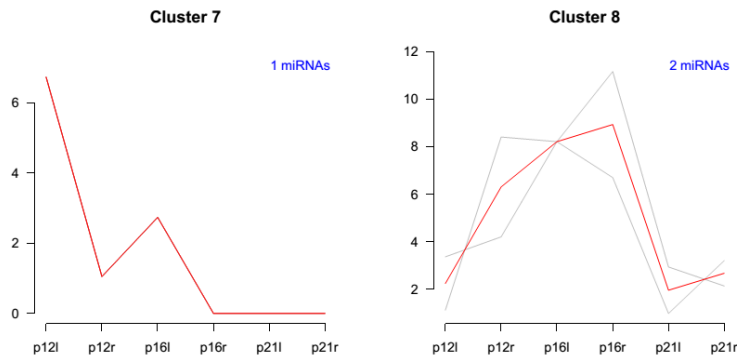


Figura 24. Perfiles de expresión identificados por técnicas de agrupamiento. En estas figuras se pueden identificar los diferentes perfiles de expresión encontrados en los ocho *clusters*, compuestos por la totalidad de genes diferencialmente expresados. En cada figura se muestra el total de genes agrupado en cada *cluster*.

Posteriormente, a partir del análisis de expresión diferencial, se tomaron 71 genes, en los cuales se encontró la mayor variación (Fig. 22B). A partir de este análisis, se obtuvieron cinco *clusters* en los cuales cada miRNA tuvo una única asignación. En el *cluster 1* se agruparon 21 miRNAs, los cuales mostraron un incremento hacia 16 días de gestación y este perfil se mantiene hasta el final del periodo gestacional. En el segundo *cluster* se agruparon 12 miRNAs, los cuales mostraron un incremento en la expresión hacia 16 días y los niveles más altos hacia el final de la gestación, mientras en el *cluster 3* se agruparon dos genes sin variación aparente en las edades gestacionales analizadas. El *cluster 4* agrupó 20 miRNAs, los cuales muestran los niveles más altos de expresión hacia 12 días de gestación, mientras en el *cluster 5*, compuesto por 16 miRNAs, se observó un incremento progresivo conforme avanza la gestación (Fig.25).

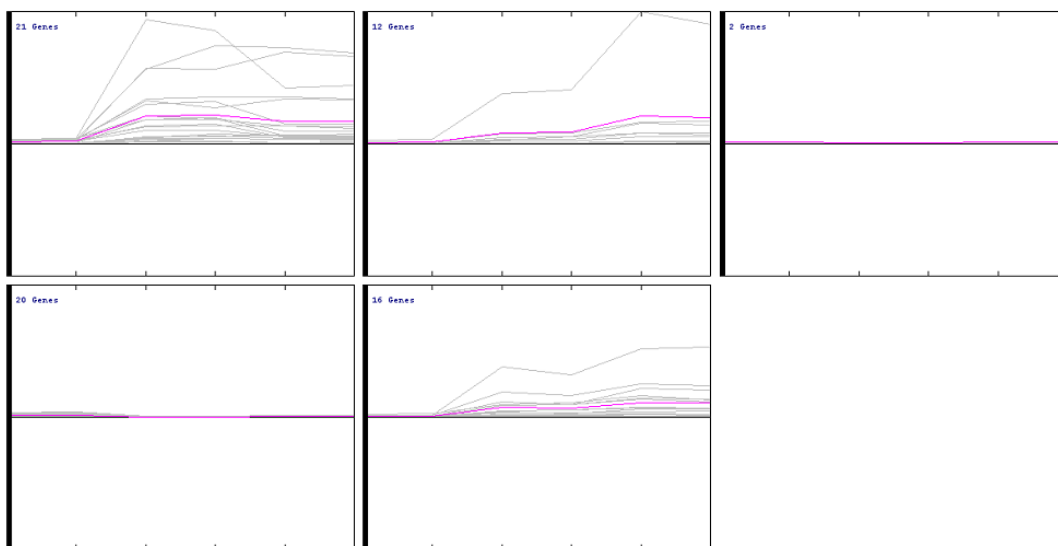


Figura 25. Perfiles de expresión identificados por técnicas de agrupamiento. En estas figuras se muestran los diferentes perfiles de expresión encontrados en los cinco *clusters*, compuestos por el subgrupo de genes seleccionados por contener la mayor variación, con respecto al conjunto de datos analizados. En cada recuadro se muestra el total de genes agrupado en cada *cluster*.

7.4. Análisis de enriquecimiento funcional

A partir del análisis de agrupamiento realizado, inicialmente se hizo un estudio de enriquecimiento funcional para los genes blanco de estos miRNAs. Como se muestra en la tabla 4, para cada uno de los *clusters* identificados se establecieron los términos ontológicos más predominantes. De esta manera, en el *cluster* 1 se encontraron genes regulados cuya función está asociada predominantemente, con morfogénesis y desarrollo.

Tabla 4. Términos Ontológicos más representativos de los clusters identificados en el total de genes diferencialmente expresados.

No. de Cluster	No. de miRNAs	GOBPID	TERMINO	Enriquecimiento	P valor
1	112	GO:0048308	<i>“organelle inheritance”</i>	6.48	1.45E-02
		GO:0043620	<i>“regulation of DNA-templated transcription in response to stress”</i>	3.23	3.93E-02
		GO:0002011	<i>“morphogenesis of an epithelial sheet”</i>	3.11	4.19E-02
		GO:0008360	<i>“regulation of cell shape”</i>	2.30	3.35E-02
2	50	GO:0003281	<i>“ventricular septum development”</i>	4.08	1.94E-03
		GO:0016050	<i>“vesicle organization”</i>	2.94	5.49E-06
		GO:1903364	<i>“positive regulation of cellular protein catabolic process”</i>	2.87	1.61E-02
		GO:0008361	<i>“regulation of cell size”</i>	2.63	1.36E-03
4	2	GO:0007169	<i>“transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway”</i>	5.07	1.88E-02
		GO:0007167	<i>“enzyme linked receptor protein signaling pathway”</i>	4.29	5.02E-03
		GO:0048468	<i>“cell development”</i>	2.65	3.26E-03
5	25	GO:0006446	<i>“regulation of translational initiation”</i>	4.11	6.76E-03
		GO:1903308	<i>“regulation of chromatin modification”</i>	2.77	4.45E-02
		GO:0031647	<i>“regulation of protein stability”</i>	2.72	1.26E-03
7	1	GO:0031323	<i>“regulation of</i>	2.29	4.61E-02

			<i>cellular metabolic process</i>		
		GO:0019222	<i>“regulation of metabolic process”</i>	2.18	3.90E-02
8	2	GO:0010035	<i>“response to inorganic substance”</i>	3.29	6.45E-03
		GO:0048545	<i>“response to steroid hormone”</i>	3.06	2.15E-02
		GO:0042592	<i>“homeostatic process”</i>	2.38	1.18E-02

GOPBID: Gene Ontology Biological Process ID

En el *cluster 2* se agruparon genes regulados cuya función se asoció con desarrollo y organización celular, en el *cluster 4* se encontraron genes relacionados con señalización celular y desarrollo, en el *cluster 5* se identificaron genes asociados con la regulación de traducción, en el *cluster 6* se agruparon genes asociados con regulación de procesos metabólicos y en el *cluster* se encontraron ocho genes cuya función está relacionada con respuesta a hormonas, sustancias y procesos homeostáticos. Los cluster de 3 y 7 estaban compuestos por miRNAs sin genes blanco descritos.

Posteriormente, a partir del grupo de 71 genes se realizó nuevamente un análisis de agrupamiento y enriquecimiento funcional. A partir de este análisis, se identificaron cinco *clusters*, los cuales mostraron funciones biológicas más homogéneas entre grupos. De esta manera, en el *cluster 1* se encontraron genes blanco asociados con funciones de regulación negativa de neurogénesis, desarrollo y diferenciación celular. Mientras en el *cluster 2*, los genes blanco estaban relacionados con funciones de regulación positiva del ciclo celular, diferenciación y desarrollo celular. Por otra parte, los genes que conformaron el *cluster 3*, estaban asociados con la regulación de las vías de señalización y desarrollo celulares y de tejidos.

En el *cluster 4* se encontraron genes blanco cuya función biológica estaba mayormente representada por la regulación de procesos de transporte celular y procesamiento de proteínas y finalmente, en el *cluster 5* los genes blanco estaban mayormente asociados con la regulación de la homeostasis metabólica y del desarrollo (tabla 5).

Tabla 5. Términos Ontológicos más representativos de los clusters identificados en el subgrupo de genes seleccionados.

No. de Cluster	No. de miRNAs	GOBPID	TERMINO	Enriquecimiento	p valor
1	22	GO:0048259	"regulation of receptor-mediated endocytosis"	4.80	8.34E-03
		GO:0010977	"negative regulation of neuron projection development"	3.45	2.27E-02
		GO:0016050	"vesicle organization"	3.05	2.04E-02
2	12	GO:0002011	"morphogenesis of an epithelial sheet"	6.84	2.91E-04
		GO:1901989	"positive regulation of cell cycle phase transition"	4.96	3.01E-02
		GO:0050770	"regulation of axonogenesis"	3.33	4.44E-03
3	2	GO:0007169	"transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway"	5.07	1.88E-02
		GO:0007167	"enzyme linked receptor protein signaling pathway"	4.29	5.02E-03
		GO:0048468	"cell development"	2.65	3.26E-03
4	20	GO:0034067	"protein localization to Golgi apparatus"	7.46	4.01E-02
		GO:0042147	"retrograde transport, endosome to Golgi"	4.45	4.49E-02
		GO:0032436	"positive regulation of proteasomal"	3.91	4.93E-02

			<i>ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>		
5	16	GO:1903311	<i>“regulation of mRNA metabolic process”</i>	3.29	4.68E-02
		GO:0009791	<i>“post-embryonic development”</i>	3.17	4.76E-02
		GO:0016570	<i>“histone modification”</i>	2.48	3.59E-03

GOPBID: Gene Ontology Biological Process ID

7.5. Identificación de redes de relevancia

Se realizó un análisis de redes de relevancia con el propósito de identificar posibles interacciones entre familias de miRNAs o miRNAs individuales. Se identificaron dos redes de interacción; en la primera se identificó la interacción entre 52 miRNAs (Fig.26A) y en la segunda red se identificó la interacción entre 7 miRNAs (Fig.26B). Este análisis revela la interacción independiente de 59 miRNAs del subgrupo de 71 genes diferencialmente expresados. Las líneas en rojo presentaron las interacciones positivas, mientras las interacciones negativas se observaron con líneas azules.

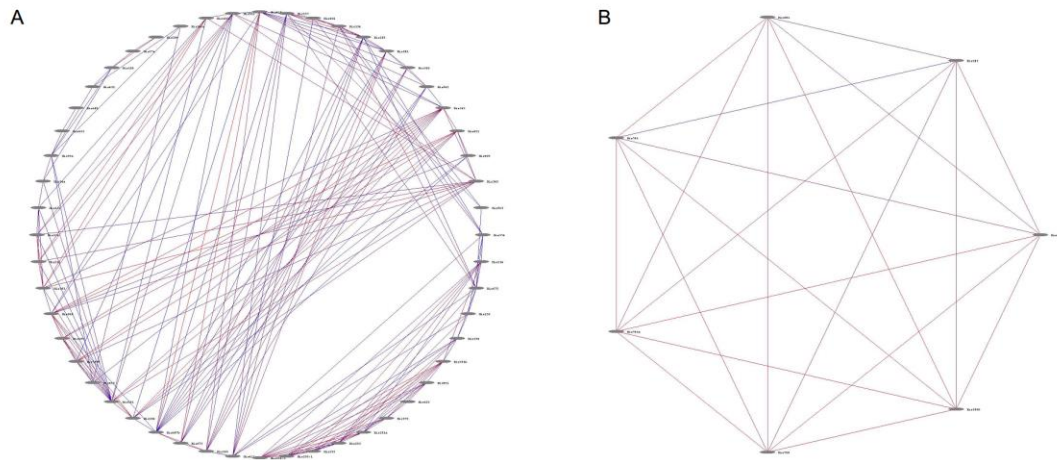


Figura 26. Redes de relevancia identificadas de miRNAs en placenta de rata. En esta representación gráfica se pueden identificar dos redes. A: Esta red fue compuesta por 52 miRNAs, algunos de los cuales tienen líneas azules representando menores conexiones con otros genes y de esta manera, las líneas rojas representan genes con mayor número de conexiones. B: Esta red fue compuesta por siete miRNAs (Mir-881, Mir-741, Mir-743a, Mir-758, Mir-3580, Mir-883, Mir-183).

7.6. Identificación de genes blanco

A partir del análisis de genes blanco se determinó que 22 miRNAs identificados en el presente estudio y que se encontraban expresados diferencialmente, no tienen reportado a la fecha gen blanco. En el segundo análisis, a partir de los 71 miRNAs escogidos, no se les identificó gen blanco a cuatro miRNAs. En este análisis, se determinó el *score* teórico de interacción entre miRNAs y los genes blanco predichos, además, se identificaron genes con coeficientes de correlación positivos y negativos. Finalmente, se determinó el máximo *fold change* de los genes blanco predichos con respecto a la posible acción de los miRNAs (tabla 6).

Tabla 6. Representación de genes blanco de miRNAs identificados.

miRNA	Gen blanco	Fold change	Score	Correlación
rno-miR-300	Map2k3	1.4	62	-0.99
rno-miR-363	Ptpro	19	85	-0.97
rno-miR-495	Prdm1	2.1	77	-0.97
rno-miR-543	Vegfa	5.1	56	-0.96
rno-miR-466d	Nova1	7	60	-0.96
rno-miR-204	Trip12	2.2	71	-0.95
rno-miR-23a	Psg19	14	71	-0.94
rno-miR-204	Atp1b3	3	62	0.99
rno-miR-871	Cpne4	5.2	58	0.99
rno-miR-382	Negr1	66	51	0.98
rno-miR-200c	Smarca4	5.3	72	0.98
rno-miR-20b	Sema4b	2.2	62	0.96
rno-miR-3580	Usp9x	4.7	92	0.96
rno-miR-743b	Cast	2.8	79	0.96

Fold change: Máximo *fold change* observado con respecto a los niveles de expresión del gen blanco. *Score*: score de afinidad entre el miRNA y el gen blanco.

8. Discusión

En el estudio exploratorio de los datos se realizó un análisis de componentes principales, esta técnica permite reducir la dimensionalidad de los datos y crear nuevas variables que expliquen la variabilidad de los mismos. De esta manera, a partir de los registros de expresión génica (que constituirían *eigenvalues*), se crean *eigenvectores* que representan de forma global la variabilidad contenida en el grupo de datos de estudio (97,98), permitiendo un abordaje exploratorio de los mismos. En el presente estudio, se detectó un patrón según el cual, los *eigenvectores* correspondientes a la variabilidad de los datos de expresión de miRNAs en placenta de 12 días de gestación, en ambas condiciones de alimentación (*ad libitum* y con restricción), tienen un perfil opuesto al observado en 16 y 21 días de gestación. Por el contrario, los *eigenvectores* correspondientes a la variabilidad de los datos de expresión de miRNAs en placenta de 16 y 21 días de gestación, muestran un perfil similar entre estos (Fig.3); es importante mencionar que esta representación reúne la variabilidad del 97.14% de los datos analizados.

Esta diferenciación entre edades gestacionales, se había observado previamente en el análisis de expresión de mRNA, presentado en el primer capítulo (Fig.3 capítulo 1a), identificando un perfil de expresión no correlacionado por edad gestacional analizada, pero correlacionados en cada punto con respecto a la condición de alimentación. Sin embargo, en esta figura se observa un perfil opuesto entre 12 y 21 días de gestación y como punto intermedio en el plano factorial, 16 días de gestación, diferente a lo observado en el análisis de miRNAs. Este análisis es valioso ya que a la fecha el presente trabajo constituiría el primer reporte de análisis de expresión a nivel de mRNA y miRNA en placenta de rata hacia 12, 16 y 21 días de gestación.

Por otro lado, en el presente estudio se realizó un análisis preliminar de expresión diferencial haciendo contrastes entre las edades gestacionales y las condiciones de alimentación estudiadas. A partir del conjunto de datos inicial (196 registros), se obtuvo un primer perfil, el cual se presentó de acuerdo al radio de expresión, usando el grafico de mapa de calor. De esta manera, los genes con expresión más baja se observan en la

parte superior del gráfico, mientras los genes con los niveles más altos de expresión se ubicaron en la sección inferior de la representación gráfica, lo que permitió identificar la zona de mayor variabilidad en términos de expresión génica (zona intermedia), en el conjunto de datos analizado (Fig.22A y 22B). A partir de esta zona de mayor variabilidad compuesta por 71 genes, se realizó un nuevo análisis de agrupamiento del cual se obtuvieron cinco *clusters* con funciones biológicas bien diferenciadas, las cuales se presentan en la tabla 5.

Partiendo del objetivo de las técnicas de agrupamiento, el cual es subdividir el conjunto de datos de tal manera que los registros con características similares correspondan a un mismo grupo y aquellos con perfiles diferentes se ubiquen en grupos distantes (99), en el segundo análisis a partir de los 71 registros, se obtuvo un patrón más homogéneo en los grupos y más distante entre estos, lo cual fue validado mediante enriquecimiento funcional con términos ontológicos de función biológica. De tal manera, que el *cluster 1* es caracterizado por la presencia de genes blanco relacionados con regulación negativa del desarrollo axonal, mientras el *cluster 2* es caracterizado por la presencia de genes blanco asociados con regulación positiva del ciclo celular y la axogénesis, representando perfiles antagónicos. Por otra parte, en el *cluster 3* se encontraron genes blanco asociados con la regulación de la señalización celular, en el *cluster 4* genes blanco asociados con procesos de localización y transporte de proteínas, mientras en el *cluster 5* se observó un mayor enriquecimiento con términos asociados a la regulación de la homeostasis metabólica.

Un resultado valioso del presente trabajo, es la identificación de perfiles de expresión génica en grupos de genes, ya que ésto podría implicar la co-regulación de grupos de genes en la placenta, a partir de miRNAs, durante la gestación. De esta manera, en el primer *cluster*, el cual agrupó 21 genes, se observó un incremento hacia 16 días, el cual se mantiene hasta el final de la gestación (Fig.25). Mientras el *cluster 2*, mostró un incremento progresivo a través de la gestación, con un pico hacia 21 días de gestación. Mientras el *cluster 4*, que fue compuesto por 20 genes, mostró un descenso hacia 16 días, el cual se mantuvo hacia el final de la gestación. En este sentido Yu *et al.*, demostraron que en genes regulados por la misma maquinaria transcripcional, se pueden encontrar co-expresados y pueden compartir una misma función (100). Sin embargo,

para determinar la co-regulación entre los grupos de miRNAs identificados, son necesarios estudio funcionales complementarios.

A partir de los resultados antes mencionados y ante la posibilidad de encontrar redes de regulación, en el presente estudio se realizó un análisis de redes relevantes. En el cual se observaron nodos con grados variables de conectividad cruzada. De esta manera, cada nodo fue interconectado con otros nodos formando una red (93). Este método permite la conexión entre diferentes características y correlaciones tanto positivas como negativas (101). Se identificaron dos redes de interacción génica; la primera compuesta por 52 miRNAs y la segunda por siete miRNAs. En la primera red de interacción se observan correlaciones positivas y negativas entre los diferentes miRNAs, mientras que en la segunda red solo se observan interacciones con correlación positiva, lo que sugiere la identificación de un grupo de genes posiblemente co-regulados.

Al realizar una búsqueda de la literatura, no se encontraron registros que asociaran previamente a este grupo de siete miRNAs (mir-881, mir-183, mir-883, mir-3580, mir-758, mir-743a y mir-741). Por otro lado, al realizar un análisis del perfil de genes con correlación positiva y negativa, la mayoría de estos miRNAs están asociados con la regulación de genes blanco involucrados con señalización, crecimiento celular y metabolismo. Sin embargo, son necesarios estudios funcionales para validar esta hipótesis.

Finalmente, se realizó un análisis predictivo de los genes blanco a regular, lo cual permitió establecer el tipo de regulación (positiva o negativa), mediante estudio del coeficiente de correlación de Pearson. Además, se estableció el *score* de interacción entre miRNAs y genes blanco predichos y el máximo *fold change* de los genes blanco predichos con respecto a los niveles de expresión del miRNA correspondiente. En la tabla 6 se observa una pequeña selección de los miRNAs y los genes blanco predichos, así como los parámetros antes mencionados. Estos datos se deben confirmar por técnicas de PCR en tiempo real y metodologías complementarias, para determinar la validez de la predicción.

Capítulo 2

9. Introducción Capitulo 2- Traslación hacia la fisiología de la gestación humana

La gestación es un estado fisiológico caracterizado por el dinamismo y la plasticidad en los procesos que darán lugar a nuevos tejidos, órganos y la regulación de cada uno de ellos. Se han identificado periodos críticos para el desarrollo y para la influencia de factores medioambientales, traducido este efecto en marcas epigenéticas que condicionaran el perfil de desarrollo de un órgano o el sentido de una vía de regulación hormonal, metabólica o inmune, entre otras.

En este sentido, a mediados de la década de los 80s, David Barker demostró el efecto de la hambruna a la que fueron sometidas mujeres gestantes holandesas en lo que se denominó '*hunger winter*' que tuvo lugar durante la segunda guerra mundial, sobre el incremento en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares e hipertensión temprana durante la edad adulta (102). Este precepto, según el cual una nutrición deficiente en periodos críticos de desarrollo *in útero*, podría incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades en la vida adulta, fue denominada inicialmente "Hipótesis de Barker", posteriormente, "El origen fetal de las enfermedades adultas" y actualmente se le conoce como "El origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo" (*the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)*) (102).

En la hambruna holandesa, la disponibilidad de alimento pronto regresó a la normalidad, creando un "*mismatch*" entre las señales correspondientes a los niveles de inanición *in útero* y una adecuada nutrición posnatal, resultando esencialmente en una mala

adaptación y conduciendo a una mayor susceptibilidad a enfermedades crónicas en la vida adulta. Posteriormente, estudios longitudinales y retrospectivos en humanos, han descubierto que, además del desarrollo *in útero*, el periodo que comprende la infancia temprana también juega un papel importante en el bienestar en la vida adulta (103).

De esta manera, como lo mencionó Barker, el ambiente materno influye importantemente en la programación fisiológica del nuevo ser, constituyendo la placenta un papel fundamental en dicha programación, al representar la primera vía de comunicación entre la madre y el producto de la gestación. Recientemente, se han identificado patrones de metilación como respuesta a estímulos y agresiones a nivel del microambiente placentario, los cuales influirían directamente sobre la salud del producto de la gestación a corto y largo plazo (104). Dichas alteraciones son asociadas a complicaciones a corto plazo que incluyen el crecimiento fetal y un incremento de la morbilidad perinatal, así como consecuencias adversas a largo plazo en la salud de la descendencia. De acuerdo con la teoría *DOHaD* una prevención exitosa de enfermedades metabólicas en el adulto, se podría alcanzar mediante una correcta intervención durante la gestación (105).

La placenta es un órgano transitorio, con una capacidad evolutivamente conservada de adaptación a las características del entorno. De esta manera, el perfil de desarrollo placentario y fetal, dependerá de la información proporcionada a partir del entorno en forma de regulación hormonal, niveles de nutrientes y oxígeno, entre otros. Por lo tanto, ante condiciones de estrés en las que se ve comprometido el aporte de la madre hacia el feto, las funciones placentarias, incluyendo el transporte transplacentario de nutrientes y el crecimiento placentario, pueden ser inhibidos directamente, contribuyendo a un descenso en el crecimiento fetal. En contraposición, en condiciones de sobre-nutrición, el monitoreo placentario de nutrientes, puede conducir a un incremento en la función, contribuyendo directamente al sobre-crecimiento fetal (105).

Por otra parte, la preeclampsia es la principal causa de morbilidad y mortalidad materna a nivel mundial, siendo responsable de complicaciones en alrededor del 2 al 8% de las gestaciones, las cuales pueden conllevar a consecuencias serias en la salud de la madre y el feto (106). A nivel materno, además de hipertensión y proteinuria, la patología puede progresar con una extendida microangiopatía que afecta principalmente el hígado, el

riñón y el cerebro. Como consecuencia de la enfermedad se puede presentar trombocitopenia, disfunción hepática, anemia hemolítica, falla renal aguda, abrupcio de placenta, alteraciones visuales, convulsiones y muerte materna. En el feto, el desarrollo de preeclampsia se ha asociado con restricción en el crecimiento intrauterino y prematuridad (106).

Además, una particularidad de esta enfermedad es el hecho que puede ser resuelta mediante la remoción de la placenta, siendo esto una prueba del papel central de este órgano en su fisiopatogenia. Esto es apoyado por la asociación entre preeclampsia y placentas grandes así como, con múltiples gestaciones. Por otra parte, se ha identificado una asociación entre el desarrollo de preeclampsia y el bajo (4 - 5 veces) como el alto peso al nacer (2 - 6 veces) (2), lo cual tiene que ver directamente con la salud perinatal y las consecuencias futuras en la salud de la población joven.

Entre los mecanismos moleculares asociados con el desarrollo de preeclampsia, se encuentra un desbalance en la expresión de genes, asociados con procesos de gran importancia en la madurez placentaria, la angiogénesis y la invasión placentaria, generando un patrón de expresión génica y sérico característico de dicha enfermedad. Entre estos genes se encuentra *Fms-like tyrosine kinase 1* (Flt-1) el cual funciona como receptor para el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial 1 (VEGF-1) y para el Factor de Crecimiento Placentario (PlGF). En mujeres preeclámpticas se ha observado un incremento en los niveles séricos de Flt-1 y endoglina soluble, acompañado de una disminución en los niveles de VEGF y PlGF, a lo largo de la gestación (106,107).

Por otra parte, en cuanto a la alteración en la invasividad placentaria, actualmente se manejan diferentes hipótesis que involucran diversos componentes de la fisiología placentaria, entre los cuales se encuentran la regulación mediada por las células *Natural Killer* uterinas (uNK), alteración en los procesos de remodelación de las arterias espirales uterinas y de "pseudovasculogénesis", en el cual los citotrofoblastos se diferencian de un fenotipo epitelial a uno endotelial, lo cual favorece el proceso de invasión vascular (106,107).

Una evaluación temprana, antes del establecimiento de la disfunción placentaria, podría contribuir a un mejor pronóstico y tratamiento oportuno en la práctica clínica. Numerosos

estudios han demostrado que la concentración anormal de marcadores séricos durante el primer trimestre, están asociados al establecimiento de preeclampsia y parto pretérmino (108).

Sin embargo, la preeclampsia es una enfermedad heterogénea, lo cual implica un desafío para su diagnóstico y tratamiento oportunos. A pesar del avance en la comprensión de los mecanismos moleculares asociados a esta patología, un porcentaje importante de pacientes, no presentan el perfil sérico antes descrito, ni una sintomatología que permita su identificación temprana. Por lo anterior, este es un campo de estudio en el que se busca la implementación de modelos de diagnóstico y seguimiento robustos, que permitan la identificación de características comunes entre las diferentes presentaciones de la enfermedad. En este sentido, el estudio del transcriptoma, el proteoma y el secretoma de la placenta y su extrapolación a nivel sérico, representa una alternativa innovadora que promete develar nuevos mecanismos hasta ahora desconocidos y posibles nuevos blancos terapéuticos. Adicionalmente, para evaluar la función placentaria se ha establecido la necesidad de incluir la determinación del índice de flujo de arterias uterinas mediante Doppler y recientemente se incluyó el seguimiento de parámetros antropométricos como peso previo y ganancia de peso durante la gestación. Todo esto con el fin de caracterizar con mayor rigurosidad la gestante y así identificar características que pueden ser de importancia clínica.

De acuerdo con el boletín del Sivigila para la semana epidemiológica 09 de 2016 en Colombia se han notificado 68 muertes maternas. Un 20% corresponde a trastornos hipertensivos, siendo la fuente causal con mayor porcentaje, seguido de las complicaciones hemorrágicas y sepsis obstétrica con 14 y 12%, respectivamente (109). Teniendo en cuenta este panorama en nuestro país, es necesaria la exploración e implementación de alternativas para el diagnóstico y seguimiento oportuno de las gestantes en los diferentes contextos sociales y culturales que nuestro medio representa.

En el presente trabajo, por primera vez se realizó el estudio y seguimiento de una cohorte longitudinal de mujeres gestantes que asistieron al servicio de ginecología del Hospital de Engativá, Bogotá D.C., entre 2012 y 2015, con el fin de extrapolar los resultados obtenidos en el análisis del transcriptoma de la placenta de rata, hacia la

fisiología de gestación humana. Además, se analizaron diferentes parámetros bioquímicos, antropométricos y de imágenes diagnósticas, con el propósito de obtener la mayor cantidad de información posible, en cada una de las edades gestacionales analizadas que permita predecir o diagnosticar tempranamente los desenlaces materno-perinatales y contribuir al conocimiento de la fisiología durante la gestación.

10. Materiales y Métodos

10.1. Población y diseño del estudio

El presente trabajo se realizó en el marco del proyecto “Valor de biomarcadores séricos en la predicción del desenlace materno-perinatal de la gestante y su evolución a 6 meses”, el cual fue financiado por Colciencias (código: 110154531660). En total se captaron 477 mujeres gestantes entre las semanas 11 a 13 de gestación, las cuales asistían al servicio de Ginecobstetricia - Promoción y Prevención del Hospital de Engativá, Bogotá .D.C. Todas las mujeres incluidas en el estudio firmaron el formato de consentimiento informado avalado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. La edad gestacional fue determinada por el reporte de la fecha de la última menstruación y confirmada por ecografía de primer trimestre.

Los criterios de inclusión fueron: gestación con feto único, IMC normal, curso clínico normal, con edad gestacional comprendida entre las 11 y las 13 semanas, facilidad de seguimiento hasta los seis meses posparto y firma del consentimiento informado. Los criterios de exclusión consistieron en antecedentes de hipertensión crónica, enfermedad vascular, enfermedad renal, historia familiar de diabetes mellitus, diabetes mellitus gestacional, síndrome de ovario poliquístico o el uso de corticoides, beta bloqueadores, agonistas del receptor beta adrenérgico y otros medicamentos que pueden tener efecto directo sobre el metabolismo.

Las variables analizadas fueron peso, talla, IMC, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, presión arterial media y variables bioquímicas como la concentración sérica de glucosa, insulina, HOMA IR, perfil lipídico completo y proteína C reactiva. Además, se realizó el estudio de flujometría Doppler de las arterias uterinas. Estas variables se midieron durante los tres periodos de la gestación y a los tres meses posparto. Las pacientes fueron seguidas a lo largo de la gestación con anamnesis, examen físico, laboratorio de control prenatal usual y ultrasonido obstétrico.

Para el análisis comparativo del perfil sérico de los productos de cada uno de los genes estudiados entre gestantes sanas y gestantes con preeclampsia, se realizó un diseño de estudio de casos y controles anidado en la cohorte. La incidencia de preeclampsia en la cohorte estudiada coincidió con lo reportado en la literatura, como se describirá más adelante.

La cohorte final la conformaron un total de 450 mujeres gestantes seguidas durante el primero (semanas 11-13), segundo (semanas 24-25) y tercer periodos de la gestación (semanas 34-36). Los casos fueron constituidos por un subgrupo de mujeres que desarrolló preeclampsia durante el seguimiento (n=30) y los controles fueron mujeres con desenlace obstétrico y perinatal normales, quienes fueron seleccionadas aleatoriamente a partir de la cohorte ensamblada inicialmente. Dicha selección aleatoria fue representativa en términos de datos demográficos.

El diagnóstico de preeclampsia se basó en el criterio expuesto por *the American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG)*, establecido a partir de las recomendaciones del *the Task Force on Hypertension in Pregnancy*. Según el cual, debido a la naturaleza de dicha enfermedad este comité de expertos eliminó la dependencia de la presencia o ausencia de proteinuria para el diagnóstico de preeclampsia (110).

Por lo tanto, en ausencia de proteinuria la preeclampsia debe diagnosticarse en asociación con otras características clínicas del síndrome, tales como: trombocitopenia (un conteo de plaquetas por debajo de 100.000/uL), alteración en la función hepática (niveles elevados de transaminasa hepática, doblando el valor normal), desarrollo de falla renal (niveles elevados de creatinina sérica mayores de 1.1mg/dL o el doble en ausencia de

otra enfermedad renal), edema pulmonar o cerebral o alteraciones visuales (110). Dicha recomendación obedeció al alto porcentaje de casos diagnosticados con preeclampsia en los cuales no se detectó proteinuria o fue de inicio tardío (111). En este sentido, el desarrollo de preeclampsia leve se definió como la presencia de hipertensión (presión $\geq 140/90$ mmHg o superior en al menos dos ocasiones separadas en al menos 4 horas), detectada por primera vez posterior a las 20 semanas de gestación y hasta 24 horas posterior al parto. Combinado con proteinuria (≥ 300 mg en orina de 24 horas) en algunos casos, en los cuales dicha determinación se realizó como parte del seguimiento médico realizado en la institución médica que atendió el evento; en los demás casos, como se mencionó, el diagnóstico se hizo en asocio con otros síntomas del síndrome. Las pacientes fueron diagnosticadas con preeclampsia leve en un promedio de 34-34.9 semanas de gestación. Ninguna de las mujeres que desarrollaron preeclampsia o los controles, recibieron medicamentos antes de la toma de muestra.

En el presente estudio también se incluyó un grupo de 20 mujeres sanas no gestantes, emparejadas por edad con respecto a la población de seguimiento, quienes fueron seleccionadas de acuerdo al análisis de los niveles de progesterona, glucosa, insulina y el perfil lipídico. Esta captación se realizó en paralelo con el seguimiento de la cohorte de mujeres gestantes, durante la fase folicular (días 3-5) y lútea (días 21-23) del ciclo menstrual. El periodo de tiempo que constituyó el ciclo menstrual en cada caso fue determinado a partir del primer día de sangrado menstrual, hasta el día anterior al siguiente ciclo menstrual.

10.2. Análisis bioquímicos

Para las diferentes determinaciones bioquímicas, la toma de muestra se realizó por venopunción en la región antecubital del brazo de acuerdo al Manual para Obtención y Envío de Muestras para Análisis de Eventos de Interés en Salud Pública (112), usando el sistema *venoject*. La muestra se tomó en condición de ayuno de 10 a 12 horas, tanto en el caso de las mujeres gestantes como en el caso de las mujeres no gestantes. Las

muestras de suero fueron separadas posterior a una centrifugación a 4500 rpm por 8min, divididas en alícuotas y almacenado a -80°C hasta el desarrollo de los ensayos.

La determinación de las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL, se realizó usando métodos enzimáticos (LIAISON® Analyzer, Saluggia, Italy). La determinación de los niveles de insulina sérica se llevó a cabo por quimioluminiscencia (Elecsys 2010, Roche Diagnostics. Mannheim, Germany). El score de resistencia a la insulina “*The homeostasis model assessment (HOMA-IR)*”, fue calculado usando la fórmula propuesta por Matthews *et al.*, (concentración de insulina sérica en ayuno expresada en IU/mL x concentración sérica de glucosa en ayuno expresada en mmol/L / 22.5) (113). En mujeres no gestantes se determinó la concentración sérica de progesterona por quimioluminiscencia (Roche Elecsys 1010 Inmmunoanalyzer, Boulder, CO, USA) de acuerdo con la metodología descrita previamente por Rouen *et al.*, (114).

10.3. Análisis sérico de las proteínas de estudio

La selección de las proteínas de estudio en el modelo humano de gestación, se realizó a partir del análisis del transcriptoma de la placenta de rata, descrito previamente en el capítulo I. Con base en la lista de genes confirmados y cuyo patrón sérico fue estudiado en modelo de rata gestante, se determinó la lista de proteínas de interés a estudiar en suero de mujeres gestantes. De esta manera, entre las proteínas a medir se encontraron: Chemerin, BDNF, Irisin, Folistatin, Meteorin y Omentin-1.

Para el estudio de cada una de estas proteínas se adquirieron kits de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) comercialmente disponibles. Para el análisis del perfil sérico de Chemerin se empleó el kit Adipo Bioscience, Inc; Cat. No. SK00171-01. La sensibilidad de este ensayo fue de 15.6 pg/mL, los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 4-6% y 8-10%, respectivamente. Con un rango de detección entre 31.25 y 2000 pg/mL. Por otra parte, los niveles circulantes de BDNF se determinaron usando el kit Cat. No. ab99978.; Abcam, el límite de detección fue de 80 pg/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron <10 y <12%, respectivamente. El

análisis sérico de Omentin-1 se realizó usando el kit Millipore Co.; Cat. No. EZH0MNTN1-29K-USA. La sensibilidad de este ensayo fue de 0.23 ng/mL, mientras que los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron <8 y <10%, respectivamente.

La determinación de los niveles séricos de Irisin se realizó usando el kit Phoenix Pharmaceuticals, Inc; cat. No. EK-067-52, el rango de detección fue de 0.07–1024.0 ng/mL, los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 8.0% y 9.0%, respectivamente. El análisis del perfil sérico de Meteorin se llevó a cabo usando el kit Uscn Life Science Inc. Cat. No. SEH662Hu, el rango de detección fue de 0.156–10 ng/mL y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 9 y 10%, respectivamente. Finalmente, la evaluación de los niveles circulante de Folistatin se realizó usando el kit Cat. No. ab113319. Abcam, Cambridge, MA, USA. Con una sensibilidad de <0.5 ng/ml y unos coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 10 y 12%, respectivamente.

Adicionalmente, se analizó el perfil sérico de factores pro y anti-angiogénicos, cuyos perfiles séricos están ampliamente descritos como fue el caso de endoglina soluble (sEng) (ab100507), Factor de Crecimiento Placentario (PIGF) (ab100629) y el Receptor 1 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular soluble (sVEGFR-1) o Flt-1 (ab119613). El análisis de estos biomarcadores contribuyó al diagnóstico de preeclampsia, como complemento al seguimiento antes descrito, de acuerdo a lo reportado en estudios previos (115). Se verificó el perfil sérico del grupo control.

Por otra parte, en el presente trabajo se realizó el análisis de algunas proteínas previamente descritas de importancia metabólica durante la gestación, las cuales no solo sirvieron como control interno de las muestras usadas, sino que contribuyeron al análisis estadístico y de plausibilidad biológica en algunos casos. De esta manera, el análisis de adiponectina, una adipocitoquina cuya acción incrementa la sensibilidad a la insulina y está asociada con reducción de peso y de la resistencia a la insulina en diferentes poblaciones (116), se realizó en dos momentos del estudio: inicialmente al hacer el análisis de Chemerin y posteriormente para contrastar las determinaciones de Irisin y Omentin-1. En el primer caso, se empleó el kit Human HMW Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit. Cat. No. DHWADO. La sensibilidad del ensayo fue de 0.195 ng/mL, mientras que los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 2.6–3.7% y 8.3–8.6%, respectivamente. El rango de detección fijo es de 3.9–250 ng/mL.

En el segundo caso, se empleó el kit Abcam; cat. No. ab99968, en el cual la concentración mínima detectable de adiponectina fue menor a 25.0 pg/mL, los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 10 y 12%, respectivamente. Los resultados de esta ELISA correspondieron al perfil previamente descrito (117,118). Todos los análisis se realizaron por duplicado, se obtuvo la media y la desviación estándar de cada determinación, la cual fue usada en los análisis estadísticos posteriores; en todos los casos los datos se encontraron en el rango establecido por la curva de calibración. Cada kit fue específico para humano y sin reactividad cruzada detectada o previamente descrita.

10.4. Estudio de inmunoreactividad

El análisis de inmunoreactividad para las proteínas seleccionadas se realizó como se describe a continuación:

La inmunoreactividad de BDNF y su receptor TrkB se realizó en placenta humana, tejido adiposo blanco y músculo esquelético. Las muestras de placenta humana se obtuvieron de pacientes hacia las semanas 11 y 24 (obtenidas a partir de aborto espontáneo sin alteraciones histopatológicas) y hacia la semana 38 de gestación (gestación a término). Se emplearon anticuerpos policlonales de conejo anti-BDNF (Abcam –Anti-BDNF antibody – ab6201) y anti- TrkB (LS-B8691 IHC-plus™); estos anticuerpos mostraron inmunoreactividad para humano y rata. Por otra parte, la inmunoreactividad para Omentin-1 se analizó en secciones de tejido adiposo visceral normal y placenta humana de tercer trimestre; para este estudio se empleó el anticuerpo policlonal de ratón anti-ITLN-1 (intelectin-1) (Cod. A00020-09-100 Adipo Bioscience, USA).

En el estudio de inmunoreactividad para Meteorin se empleó tejido adiposo blanco y placenta humana de 11 semanas de gestación (obtenidas a partir de aborto espontáneo sin alteraciones histopatológicas). En la reacción se usó el anticuerpo policlonal de conejo anti-METRN (Abcam antibody–ab131619). Finalmente, para el

análisis de inmunoreactividad de FNDC5 se emplearon secciones de tejido adiposo blanco, músculo esquelético y placenta humana de los tres trimestres de gestación, como se describió para BDNF. En la reacción se usó el anticuerpo policlonal de conejo anti-FNDC5 Abcam; ab131390. Todos los tejidos empleados se obtuvieron del servicio de patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Los bloques de tejidos fueron fijados en formalina buferada neutral al 10%, embebidos en parafina e inmunoteñidos usando el método descrito previamente (35). Con respecto al control negativo se empleó un anticuerpo de conejo IgG no específico en lugar del anticuerpo primario en cada caso en el paso de incubación, mientras los demás reactivos fueron usados como lo indica la técnica.

10.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el programa estadístico Stata 11.0 (StataCorp. 2009. *Stata Statistical Software: Release 11*. College Station, TX, USA; StatCorp LP) y el software R (versión 3.11). Se usó el test de *Shapiro–Wilk* para probar la hipótesis de distribución normal en los datos. En cuyo caso los resultados se informan como medias +/- desviación estándar (desviación a partir de la media), mientras los datos con distribución no normal, se reportan como medianas y rangos intercuartílicos (IQR); los datos categóricos se presentaron como proporciones. La significancia estadística entre dos grupos se determinó mediante el test t-*Student* o ANOVA, cuando dicha comparación se realizó entre más de dos grupos. Para mediciones repetidas entre grupos, se usó el test de *Friedman*, al analizar diferencias estadísticas sobre variables metabólicas y antropométricas, seguido por la prueba del rango de signos de *Wilcoxon*. Se usó el test t-*Student* para comparar grupos no apareados de mujeres gestantes y no gestantes cuando las variables mostraron una distribución normal, de lo contrario se usó el test no paramétrico *Wilcoxon–Mann–Whitney*.

El estudio de correlación entre los niveles séricos de las diferentes proteínas y las variables de interés a través de la gestación, se hizo usando el coeficiente de correlación de *Pearson* cuando se cumplían los supuestos de normalidad bivariada, dicho análisis se realizó en cada trimestre de forma independiente. En caso de no cumplirse los

supuestos, el análisis de correlación se llevó a cabo mediante un estudio univariado en los grupos usando el coeficiente de correlación parcial de *Spearman* con un ajuste por edad gestacional. Finalmente, cuando los datos lo permitieron, se realizó un modelo de regresión lineal multivariado, para estimar el efecto de la proteína estudiada sobre parámetros de interés como el índice HOMA IR. Esto se realizó ajustando variables como: índice de masa corporal, edad gestacional, concentración de triglicéridos, colesterol total y adiponectina. Los valores p se ajustaron usando la corrección de *Bonferroni*. Los valores estadísticamente son presentados como *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001. Para todas las pruebas se tomó como significativo un valor de p < 0.05.

10.5.1. Criterios para la realización del algoritmo para predicción de preeclampsia

Se formuló un modelo de clasificación para predicción del desarrollo de preeclampsia en edades gestacionales temprana y media (correspondiente a primero y segundo trimestres, respectivamente). La clasificación entre preeclámplicas y mujeres gestantes normales se basó en el abordaje de un árbol de decisión, el cual fue construido usando el programa Weka (versión 3.6.10) (119) empleando el algoritmo J48 (120), con una validación cruzada de 10 veces para probar la predicción. Aquellas variables que mostraron diferencias significativas entre medias de grupos fueron incluidas en el modelo. Además, se incluyó la variación (delta) de dichas variables, entre el primer y segundo trimestre. El desempeño de la clasificación se evaluó usando medidas como sensibilidad, especificidad y la curva de características operativas para el receptor (ROC) (121).

11. Resultados.

11.1. Características demográficas de la población

En la tabla 1 se muestran las características demográficas y clínicas de la población de estudio, incluyendo el grupo de mujeres no gestantes, mujeres gestantes sanas, mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia y mujeres sanas a los tres meses posparto.

11.2. Análisis de Inmunoreactividad

En el estudio de la inmunoreactividad para BDNF y TrkB se usaron placentas de 11, 24 y 38 semanas de gestación, como se describió previamente. Hacia la semana 11 se observó inmunoreactividad moderada a intensa en sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y células de Hofbauer. Además, se obtuvo inmunoreactividad moderada a intensa en el citoplasma de las células deciduales (Fig. 27a). Con respecto a la inmunoreactividad de TrkB, se observó inmunoreactividad moderada en las células sincitiotrofoblásticas, además, se detectó inmunoreactividad débil en citotrofoblastos y en células Hofbauer. También se observó inmunoreactividad moderada e intensa en células deciduales, similar a lo observado para BDNF (Fig. 27b). En el estudio de placentas de 24 y 38 semanas de gestación se observó inmunoreactividad moderada y leve, respectivamente, en sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y en el citoplasma de células deciduales (Fig. 27c,e). Además, en estos periodos gestacionales se observó inmunoreactividad moderada para TrkB en sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y células deciduales (Fig. 27d,f). Las figuras 27g, h e i muestran los controles de inmunoreactividad negativa para la técnica de inmunohistoquímica para BDNF y las figuras 27j, k y l, muestran los controles negativos de inmunoreactividad para TrkB.

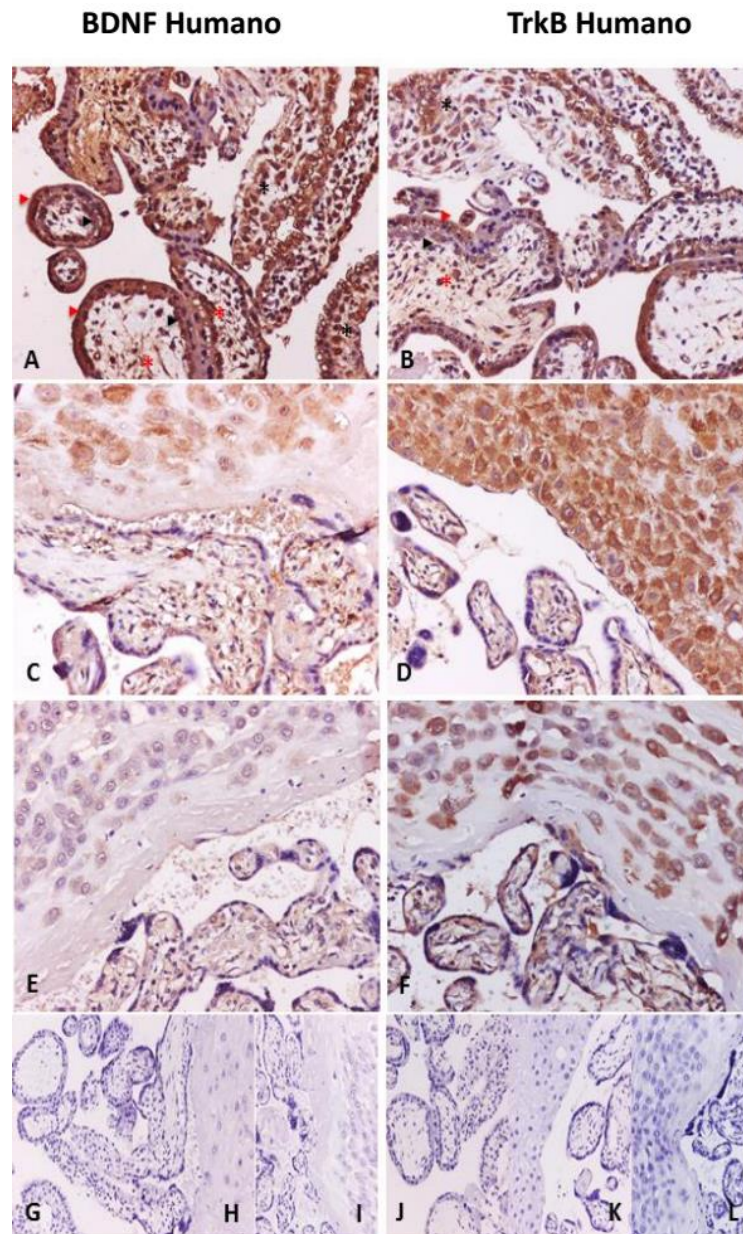


Figura 27. Inmunotinción de BDNF y TrkB en placenta humana en los tres periodos de la gestación analizados. A: Se observó Inmunoreactividad moderada e intensa para BDNF en células sincitiotrofoblásticas (flecha roja), citotrofoblastos (flecha negra), células deciduales (asteriscos negros) y células de Hofbauer (asteriscos rojos). B: Se observó inmunoreactividad moderada para TrkB en células del sincitiotrofoblasto (flechas rojas) e inmunoreactividad leve en citotrofoblastos (flechas negras, mientras en células de Hofbauer (asterisco rojo), se observó una inmunoreactividad moderada. C y E corresponden a placentas humanas hacia la semana 24 (material de aborto) y 38 semanas de gestación (gestación a término). En estas muestras se observó inmunoreactividad moderada y débil para BDNF en células deciduales, así como en sincitiotrofoblastos y citotrofoblastos. D y F corresponden a placentas humanas de 24 (material de aborto) y 38 semanas de gestación (gestación a término), en donde se

observó inmunoreactividad moderada en sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y células deciduales para TrkB. G - L corresponden a controles negativos de la técnica. G y J: placenta humana de 11 semanas de gestación, H y K placenta humana de 24 semanas de gestación y (I y L) placenta humana de 38 semanas de gestación.

Por otra parte, la inmunotinción de FNDC5 mostró localización citoplasmática en tejido adiposo, músculo esquelético y placenta en los tres trimestres analizados (Fig.28). En la placenta para cada uno de los trimestres estudiados se observó inmunotinción para FNDC5 en células sincitiotrofoblásticas, citotrofoblásticas y de la decidua (Fig. 28A, C y D, secciones de músculo esquelético y tejido adiposo se usaron como controles positivos (Fig. 28G y 28H, respectivamente). En las figuras 28B, D y F se encuentran los respectivos controles negativos de la técnica.

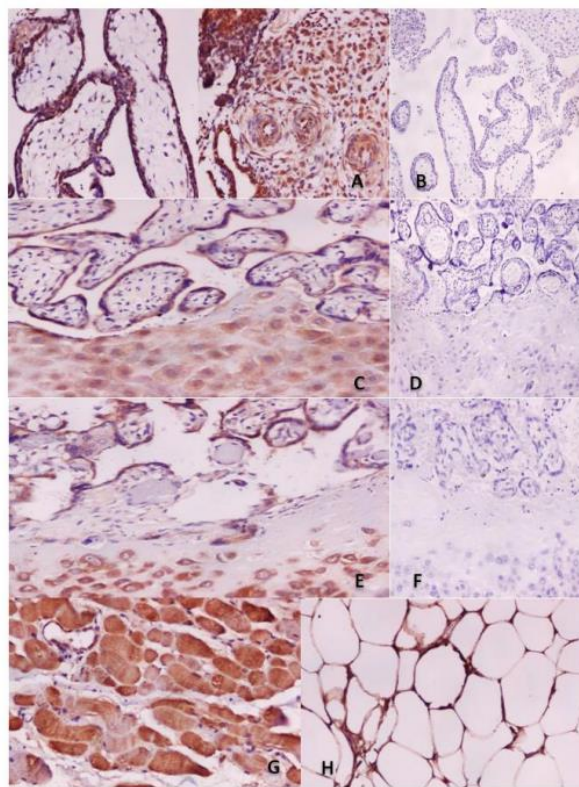


Figura 28. Tinción inmuistoquímica de tejido adiposo, músculo esquelético y placenta con anticuerpos dirigidos a FNDC5. En placenta para cada uno de los tres periodos gestacionales analizados se observó inmunotinción en células deciduales, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto (páneos A, C y E), como controles positivos se analizaron músculo esquelético (G) y tejido adiposo (H). B, D y F: Controles negativos de la técnica. Las muestras de placenta se obtuvieron a partir de pacientes en las semanas 11, 24 y 38 de gestación.

Con respecto a la inmunotinción de Meteorin, se observó inmunoreactividad en la decidua mesenquimal inmadura y en las vellosidades en placenta de primer trimestre (Fig. 29A, 29B y 29C, respectivamente). Se observó inmunoreactividad moderada en citotrofbastos, sincitiotrofbastos y células de la decidua. En la figura 29D se observa el control negativo de la técnica. Finalmente, en el análisis de Omentin-1 se observó inmunoreactividad en células citotrofbásticas, sincitiotrofbastos, células de Hofbauer y células endoteliales del tallo veloso (Fig. 30A-C). Como control positivo de la técnica se usó tejido adiposo blanco (Fig. 30G) y en la figura 30I se observa el control negativo de la técnica.

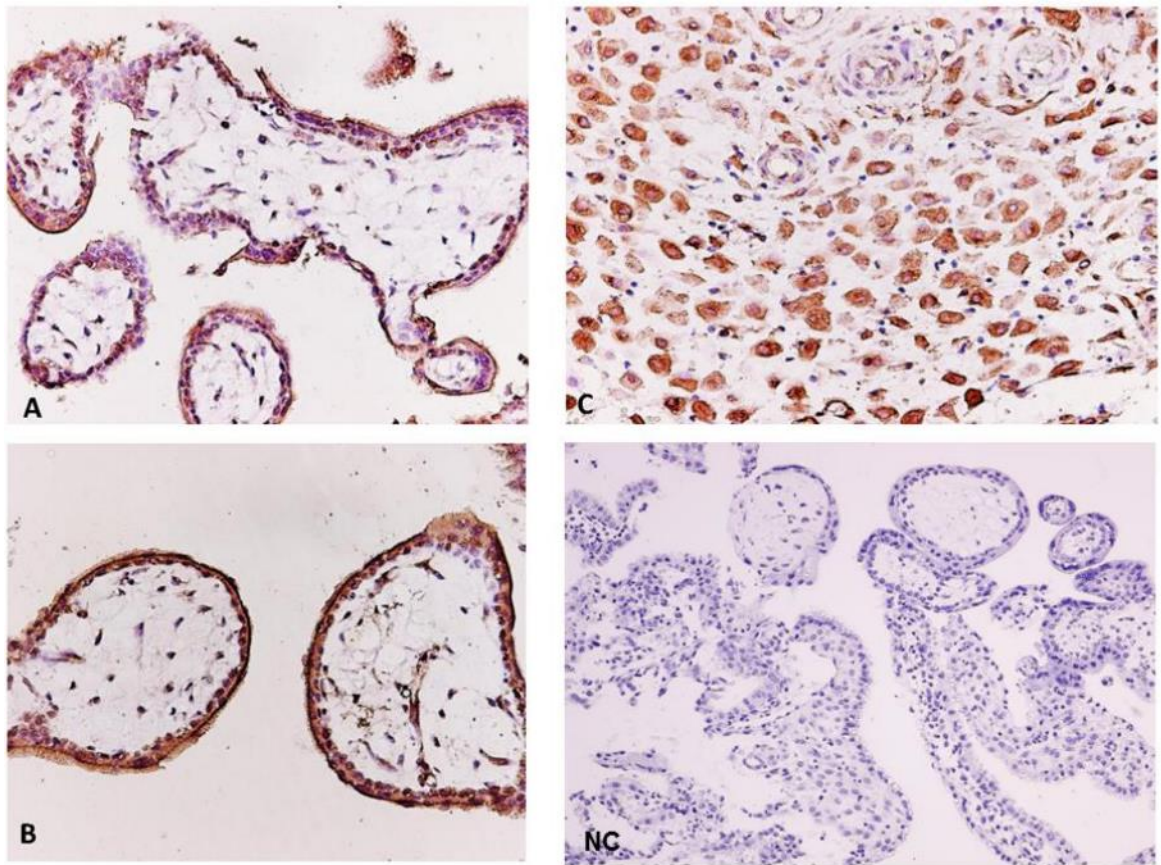


Figura 29. Inmunohistoquímica de Meteorin en placenta. Se muestra placenta humana de primer trimestre de gestación (aborto espontáneo). En células citotrofbásticas, sincitiotrofbásticas y células de la decidua, se observó inmunoreactividad citoplasmática moderada para Meteorin (20x). Se empleó un control negativo de la técnica como se especificó en materiales y métodos.

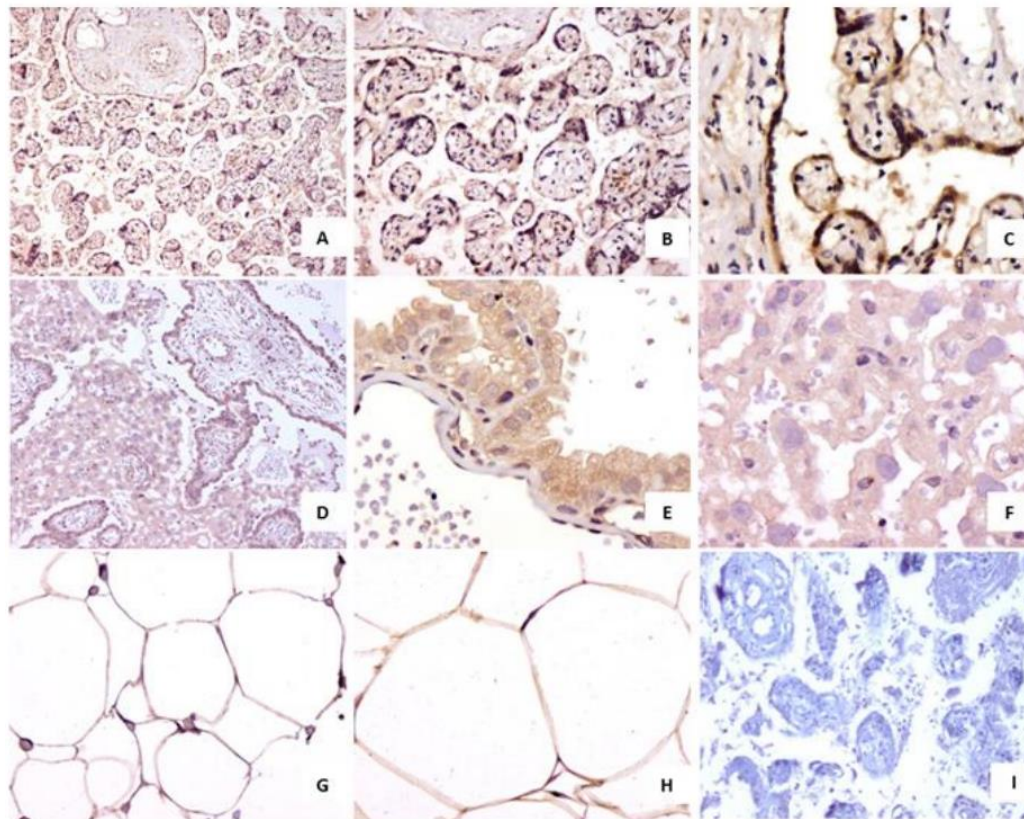


Figura 30. Inmunohistoquímica para Omentin-1. A, B y C muestran placenta de tercer trimestre 100X, 200X y 400X, respectivamente. La inmunoreactividad citoplasmática puede observarse en citotrofoblastos, sincitiotrofoblastos, células de Hofbauer y células endoteliales del tallo veloso. G: Se observó inmunoreactividad en la membrana de tejido adiposo visceral humano 400X. I: muestra el control negativo en placenta humana sin el anticuerpo primario.

11.3. Parámetros bioquímicos analizados

En el presente estudio en el grupo de mujeres gestantes sanas, se observó un leve descenso en los niveles de glucosa a medida que avanza la gestación, además de un incremento en la concentración basal de insulina en el tercer trimestre, con respecto al primero y segundo trimestres de gestación. En consecuencia, el índice HOMA IR muestra un incremento en el tercer trimestre, al ser un parámetro dependiente de la concentración basal de insulina. Con respecto al perfil lipídico, los niveles de triglicéridos muestran un incremento conforme avanza la gestación, mostrando los niveles más altos en el tercer trimestre. Además, el perfil del colesterol total mostró un patrón similar al de los

triglicéridos, con el punto más alto en el tercer trimestre de gestación, los anteriores resultados se ajustan al perfil bioquímico de la mujer durante la gestación normal, como ha sido previamente descrito (122).

Los niveles más bajos de colesterol HDL (col-HDL) se observaron en primer trimestre y se observó un pico hacia segundo trimestre, con un ligero descenso hacia tercer trimestre. La presión arterial sistólica, diastólica y la presión arterial media, no muestran variación a través de la gestación. Con respecto al grupo de mujeres sanas tres meses posparto, es importante mencionar que en la totalidad de los parámetros bioquímicos analizados en el presente estudio, se observó un comportamiento similar al grupo de mujeres no gestantes sanas, demostrando la readaptación metabólica de la mujer en este momento de la evaluación posnatal.

Con respecto al perfil metabólico de las mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia, además de las alteraciones en los parámetros clínicos correspondientes a la evaluación de la presión arterial, se observó un llamativo aumento de peso a medida que avanza la gestación, en comparación con el grupo de mujeres gestantes sanas. Además, se detectó un ligero incremento en las concentraciones de glucosa e insulina basal, lo cual afecta directamente el índice metabólico HOMA IR. Es importante mencionar la significativa diferencia que se observa entre los niveles de col-HDL en la población de mujeres gestantes sanas y la de mujeres preeclámpticas, llama la atención al ser considerado este un patrón de protección cardiovascular (ver tabla 7).

Para constatar que las mujeres no gestantes se encontraban en fase lútea, se verificaron los niveles de progesterona, los cuales se detectaron significativamente más altos en la fase lútea del ciclo menstrual comparado con la fase folicular, (6.43 ng/mL (3.79-13.45) vs 0.49 ng/mL (0.33-0.66), respectivamente) $p < 0.0001$, estos datos se ajustan a lo descrito previamente (123) (Tabla 7).

Variable	Mujeres no gestantes sanas (n=20)	Gestantes normales (n=28)			Gestantes con diagnóstico de preeclampsia (n=20)			Mujeres sanas 3 meses postparto (n=13)
		GT	GM	GTa	GT	GM	GTa	
Edad. Años (mediana (IQR))	20 (19-22)	23.5 (19-30)	23.5 (19-30)	23.5 (19-30)	19.5 (18-26)	19.5 (18-26)	19.5 (18-26)	24 (19-25)
Peso. Kg. (media +/-SD)	55.5 (+/- 6.3)	57.1 (+/- 7.4)	61.8 (+/- 8.4)	66 (+/- 9.2)	59.5 (+/- 7.4)	65.4 (+/- 7.3)	72.9 (+/- 8.1)	59.6 (+/- 7.0)
Índice de Masa Corporal. Kg/m ² (mean +/-SD)	21.6 (+/- 2.2)	22.9 (+/- 2.3)	24.8 (+/- 2.5)	26.4 (+/- 2.6)	24 (+/- 2.8)	26.4 (+/- 2.8)	29.4 (+/- 2.7)	23.9 (+/- 2.2)
Edad gestacional. semanas (mediana (IQR))	.	12.1 (11.4-12.5)	24.4 (24.2-24.6)	34.6 (34.2-35.42)	12.2 (11.5-12.6)	24.2 (24.0-24.5)	34.9 (34.2-35.5)	.
Presión arterial sistólica. mm Hg (mediana (IQR))	110 (104-115)	93 (90-100)	90 (86-100)	97 (90-103)	105 (100-110)	100 (100-110)	107 (100-113)	100 (90-108)
Presión arterial diastólica. mm Hg (mediana (IQR))	71 (65-76)	60 (58-62)	60 (58-62)	61 (58-67)	68 (60-70)	63 (60-68.5)	60 (60-70)	62 (60-64)
Media de presión arterial. mm Hg (mediana (IQR))	85.3 (78.7-87.7)	72 (67.8-74.1)	70 (67.8-74)	72.33 (69.8-78.5)	80.3 (73.1-82.3)	76.6 (74.3-81.6)	80 (74.8-81)	73.33 (70-76.6)
Glucosa. mg/dL (mediana (IQR))	84.2 (80-90.2)	78.5 (73-82.2)	75 (69.7-78.2)	74.5 (68.7-76.5)	80.5 (75.9-84)	78.5 (70-82)	73 (69.7-78)	79 (77-83)
Insulina. uU/mL (mediana (IQR))	9.1 (4.2-12.8)	11.3 (7.9-15.4)	11.55 (9.7-14.6)	12.3 (8.1-16.7)	11.5 (9.7-13.5)	15.05 (11.3-17.9)	14.9 (11.4-18.2)	5.8 (4.4-6.8)
HOMA IR (mediana (IQR))	1.80 (0.95-2.72)	2.12 (1.51-2.87)	2.14 (1.74-2.73)	2.41 (1.55-3.13)	2.40 (1.84-2.71)	2.94 (2.24-3.56)	2.57 (2.14-3.48)	1.10 (0.81-1.26)
Colesterol total. mg/dL (mediana (IQR))	157 (142-174)	165 (146-192)	208 (189-230)	237 (209-269)	173 (160-189)	219 (196-243)	234 (209-255)	167 (144-181)
Col-HDL. mg/dL (mediana (IQR))	49.6 (46.1-59.1)	56.9 (51.4-65.4)	67.6 (59.8-76.1)	64.8 (59.8-71.9)	51.7 (44.3-58.5)	62.78 (51.6-73.9)	54.8 (51.6-62.5)	48 (39.1-53)
Triglicéridos. mg/dL (mediana (IQR))	70 (62-91)	109 (89-137)	188 (139-231)	263 (215-316)	105 (77-133)	165 (133-203)	243 (191-316)	81 (51-117)
Progesterona. ng/mL (mediana (IQR))	Fo:0.49 (0.33-0.66) Lu: 6.43 (3.79-13.45)

Las variables con distribución normal se muestran como media +/- desviación estándar (SD). Las variables con distribución no normal se muestran como mediana y rango intercuartílico (IQR). Mujeres no gestantes – fases del ciclo menstrual: folicular (Fo) y lúteo (Lu). Periodos de la gestación: gestación temprana (GT), media (GM) y tardía (GTa). HOMA IR (Homeostasis Model Assessment). Un valor de p <0.05 fue estadísticamente significativo.

Tabla 7. Características antropométricas y metabólicas de la población de estudio.

11.4. Estudio de los perfiles séricos de las proteínas de interés

En el análisis de los niveles séricos de Chemerin se observó que durante la gestación temprana estos decrecen levemente en comparación con el grupo de mujeres no gestantes; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En las primeras semanas de gestación, Chemerin alcanza sus niveles más bajos e incrementan a medida que la gestación avanza (Fig.31). De esta manera, el punto en el que se detectaron los niveles más altos de Chemerin correspondió a la gestación tardía en comparación con la gestación temprana ($P < 0.001$) y media ($P = 0.001$).

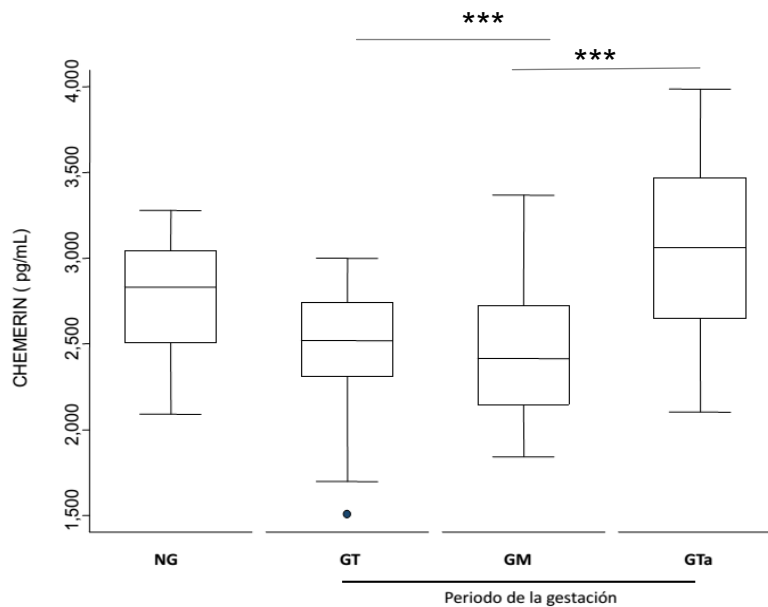


Figura 31. Niveles séricos de Chemerin en la población de estudio. NG: No gestante, GT: Gestación Temprana, GM: Gestación Media y GTa: Gestación tardía. Los círculos representan casos atípicos (*Outlier case*).

En este estudio se realizó la medición de los niveles séricos de adiponectina, cuya concentración disminuyó con el progreso de la gestación. Sin embargo, estos cambios no alcanzaron significancia estadística (Fig.32); esta tendencia se ajusta a lo descrito

previamente (118). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de Chemerin la comparar las dos fases del ciclo menstrual estudiadas (117).

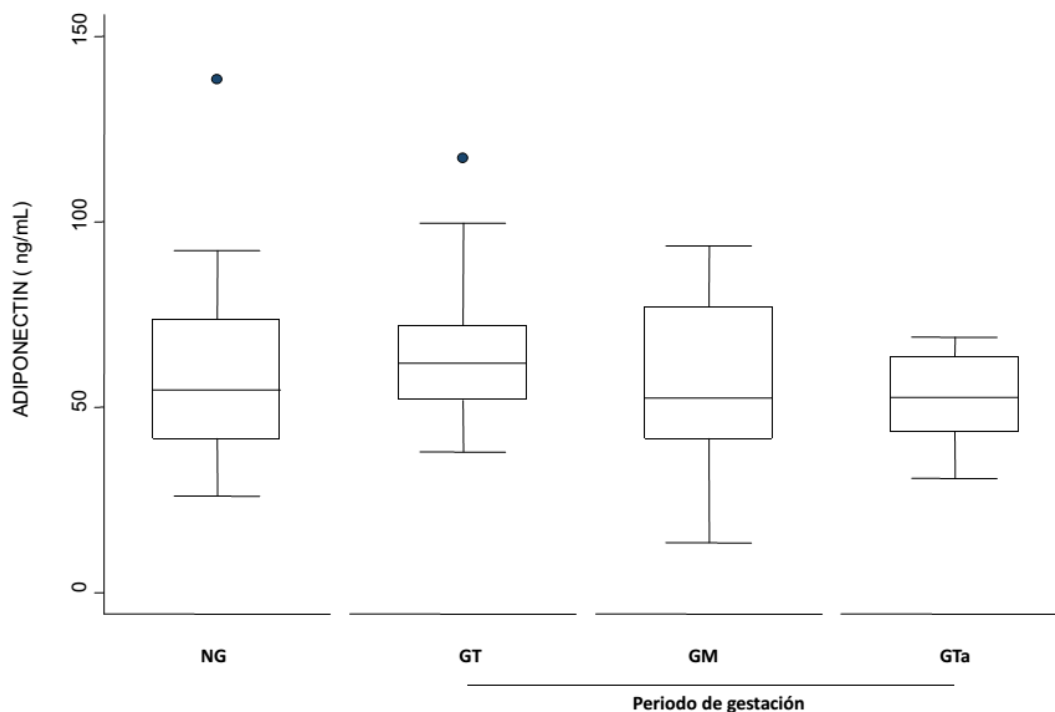


Figura 32. Niveles séricos de adiponectina en la población de estudio. NG: No gestante, GT: Gestación Temprana, GM: Gestación Media y GTa: Gestación tardía. Los círculos representan casos atípicos *Outlier case*.

Por otra parte, en el análisis sérico de BDNF se observó un descenso en los niveles hacia el inicio de la gestación ($p < 0.0148$), con un incremento hacia la gestación media ($p < 0.0012$), el cual se mantiene hasta el final de la gestación. Al comparar el grupo de mujeres no gestantes y los grupos de gestación temprana, media y tardía, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.00$, $p=0.0058$ y $p=0.0081$, respectivamente) (Fig.33). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de BDNF en las fases del ciclo menstrual analizadas (33).

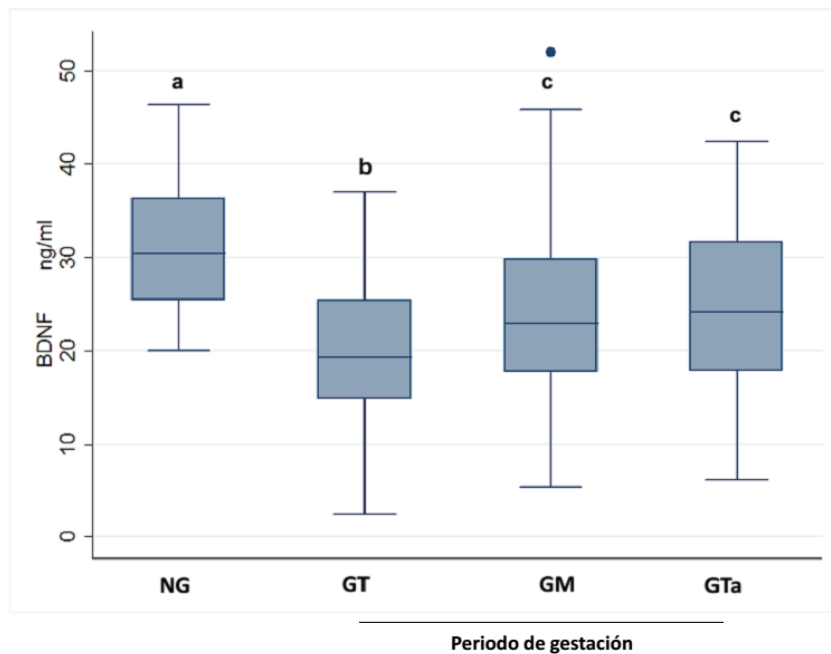


Figura 33. Niveles séricos de BDNF en la población de estudio. Se determinó en tres periodos de la gestación en un grupo de mujeres gestantes (n=42) y un grupo de mujeres no gestantes (n=16). Los valores escritos en la parte superior con letras diferentes representan valores significativamente diferentes. (NG) no gestantes, (GT) gestación temprana, (GM) gestación media y (GTa) gestación tardía. El círculo representa caso atípico (*Outlier case*).

Los niveles séricos de Irisin fueron más altos durante la fase lútea comparada con la fase folicular del ciclo menstrual, con un incremento cercano al 26%, (64.0 +/- 20.0 ng/mL vs 47.4 +/- 10.2 ng/mL, respectivamente, $p= 0.002$) (Fig.34). Con respecto al estudio realizado a lo largo de la gestación, durante la gestación media los niveles de Irisin fueron más altos en comparación con la gestación temprana, con un incremento de cerca del 16% (129.1 +/- 51.9 ng/mL vs 107.9 +/- 32.0 ng/mL, respectivamente, $p=0.0047$) y comparando los niveles observados durante la gestación tardía, estos fueron más altos en comparación con la gestación temprana, con un incremento cercano al 21% (136.4 +/- 52.4 ng/mL vs 107.9 +/- 32.0 ng/mL, respectivamente, $p= 0.0013$).

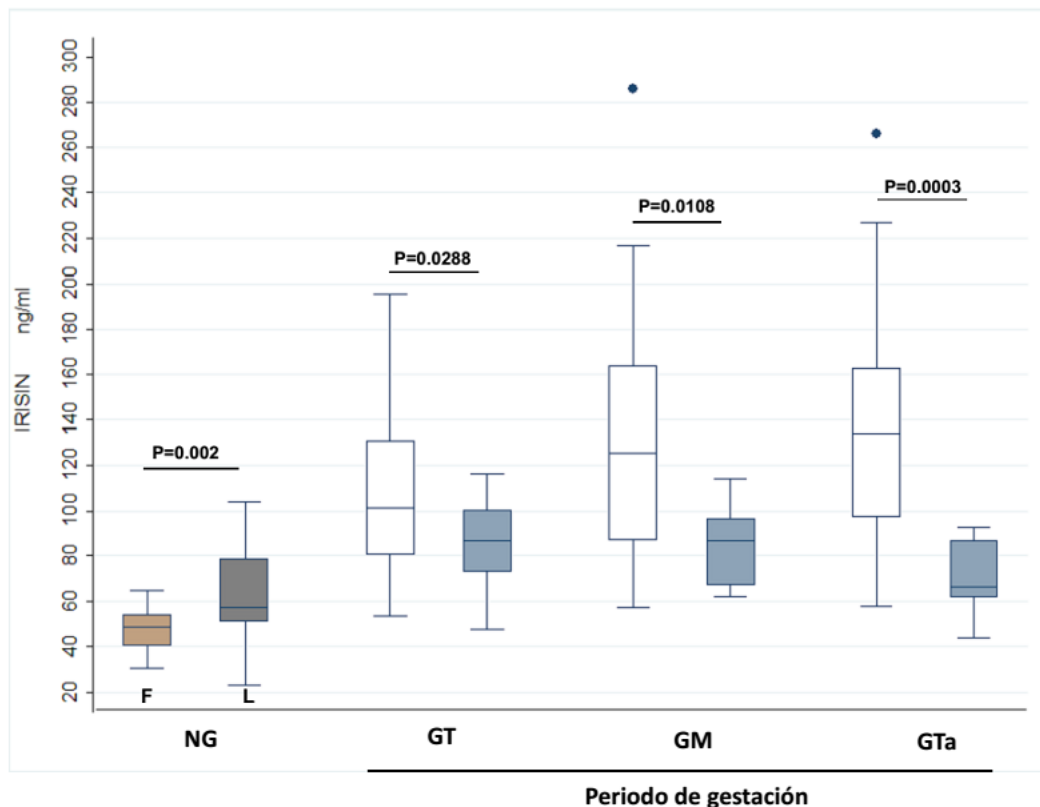


Figura 34. Box plot comparando los niveles séricos de Irisin a través de la gestación comparado con un grupo de mujeres no gestantes y con mujeres con preeclampsia. Se muestra una figura de cajas y bigotes con el valor de la mediana, rango intercuartílico, así como valores adyacentes. Los datos atípicos son representados por círculos llenos negros. (NG) no gestantes, (F) fase folicular, (L) fase lútea. En las gestantes las cajas claras corresponden a gestantes normales y las sombreadas son gestantes con preeclampsia. (GT) gestación temprana, (GM) gestación media y (GTa) gestación tardía. Un valor de $p < 0.01$ se consideró estadísticamente significativo.

Los niveles de Irisin fueron más altos en el tercer trimestre de la gestación normal, al compararlos en la misma edad gestacional con el grupo de mujeres con preeclampsia (136.4 ± 52.4 ng/mL vs 70.0 ± 16.3 ng/mL, respectivamente, $p=0.0003$), mostrando diferencias en los niveles cercanas al 49% (Fig.34), no se observaron diferencias significativas al comparar las demás edades gestacionales entre el grupo de mujeres sanas y mujeres preeclámpicas. Finalmente, los niveles de Irisin en mujeres no gestantes (tanto en fase folicular como lútea), fueron más bajos al comparar con cualquier edad gestacional analizada (124).

En el estudio del perfil sérico de Omentin-1 no se observaron diferencias significativas entre las edades gestacionales estudiadas. Sin embargo, los niveles séricos de Omentin-1 hacia el final de la gestación fueron significativamente más bajos al compararlos con el grupo de mujeres no gestantes ($p = 0.0145$). Los resultados sugieren una relación inversa entre los niveles séricos de Omentin-1 y los niveles séricos de triglicéridos durante la gestación. En el presente estudio, no se pudo establecer una asociación significativa entre los niveles séricos de Omentin-1 y los de adiponectina (Fig.35) (34).

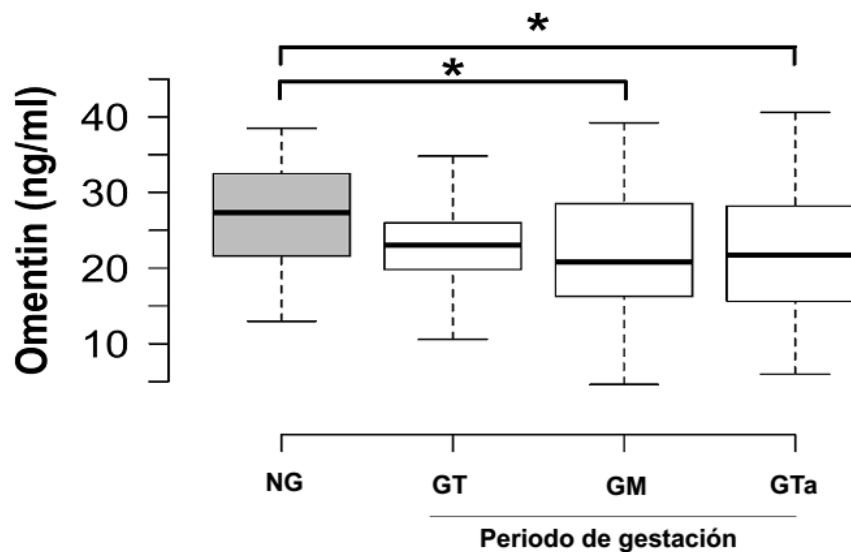


Figura 35. Niveles séricos de Omentin-1 en un grupo de mujeres gestantes durante los tres trimestres de gestación y un grupo de mujeres no gestantes. Se observó un descenso en los niveles de Omentin-1, durante la gestación tardía (GTa) ($p=0.040$) y la gestación media (GM) ($p=0.022$), al comparar con el grupo de mujeres no gestantes (NG). No se observaron variaciones significativas durante la gestación temprana (GT), en los niveles circulantes de Omentin-1 ($p=0.119$).

En el estudio del perfil sérico de Meteorin, el diagnóstico de preeclampsia se complementó con el uso de marcadores pro y anti-angiogénicos como sEng, PIGF y sVEGFR-1, en la población de mujeres gestantes sanas y con diagnóstico de preeclampsia y los resultados coincidieron con el perfil previamente descrito (115), datos no mostrados. Los niveles de Meteorin fueron significativamente más altos hacia el inicio de la gestación al compararlos con el grupo de mujeres no gestantes jóvenes ($P<0.001$) (Fig.36). Los niveles circulantes de Meteorin fueron significativamente más altos en primer trimestre en comparación con el segundo y el tercer trimestres de gestación (p

<0.01) (Fig.36). No se observaron diferencias significativas entre los niveles séricos de Meteorin durante la gestación media en comparación con la gestación tardía y estos fueron similares a los observados en el grupo de mujeres no gestantes. Finalmente, los niveles séricos de Meteorin fueron más altos en mujeres gestantes normales en comparación con mujeres preeclámplicas durante el periodo gestacional temprano ($p < 0.0001$) (Fig.37) (125).

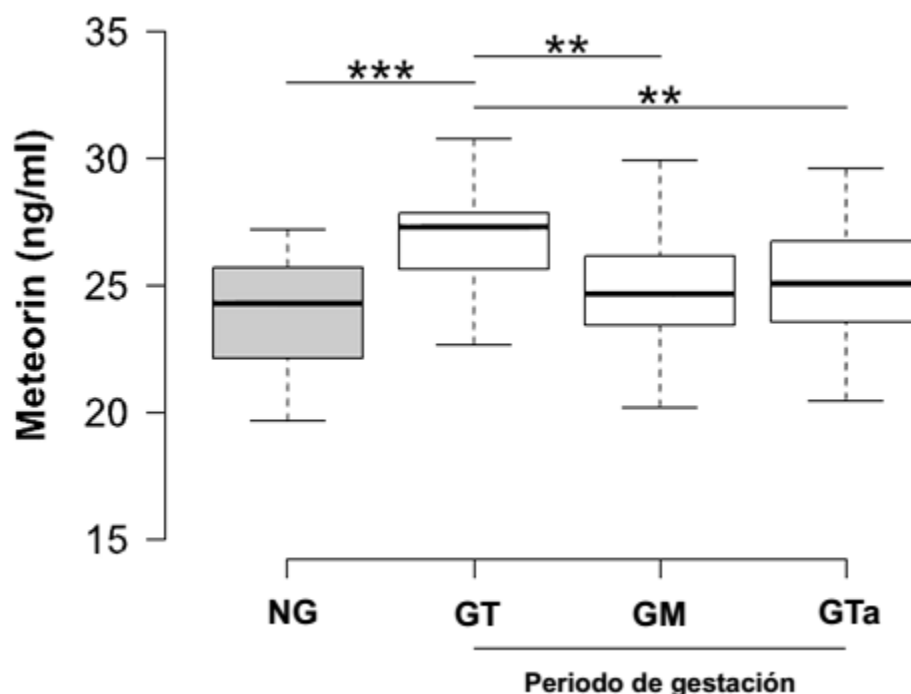


Figura 36. Niveles séricos de Meteorin en los tres periodos de la gestación analizados y en un grupo de mujeres no gestantes. Los niveles más altos de Meteorin se observaron en la gestación temprana (GT) y declinaron con el avance de la gestación en los periodos subsecuentes, gestación media (GM) y gestación tardía (GTa); esta reducción de los niveles de Meteorin fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles séricos de Meteorin en el grupo de mujeres no gestantes (NG) con el grupo de gestación temprana (GT) (** $p < 0.001$).

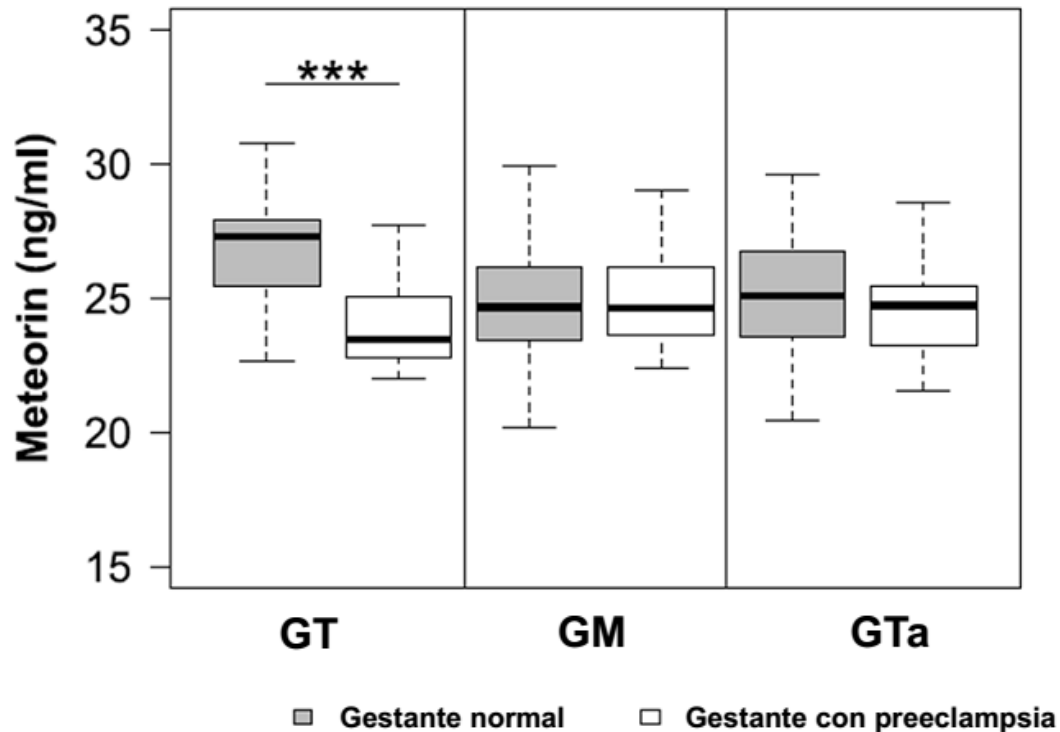


Figura 37. Niveles séricos de Meteorin en mujeres gestantes sanas y mujeres con diagnóstico de preeclampsia. Se observó un descenso en los niveles de Meteorin sérico en el grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia al compararlos con el grupo de mujeres gestantes sanas, hacia el inicio de la gestación (GT) (** $p < 0.001$). Los demás periodos analizados no mostraron variaciones significativas en los niveles séricos de Meteorin.

Similar a lo observado en el perfil sérico de Irisin, en el grupo de mujeres no gestantes, se observaron niveles circulantes más altos de Folistatin en la fase lútea del ciclo menstrual en comparación con la fase folicular ($p < 0.05$) (Fig.38). Además, los niveles séricos de Folistatin en ambas fases del ciclo menstrual son significativamente más bajos al compararlos con los niveles en cada una de las edades gestacionales estudiadas ($p < 0.001$) (Fig.38). El perfil sérico observado muestra un incremento conforme avanza la gestación, en el grupo de mujeres gestantes sanas, con un pico hacia el final de la gestación ($p < 0.001$). Los niveles séricos de Folistatin en el grupo de mujeres a los tres meses posparto, muestra un descenso con respecto a lo observado en el tercer trimestre y alcanza los niveles observados en el grupo de mujeres no gestantes ($p > 0.05$) (Fig.38). Finalmente, los niveles circulantes de Folistatin en mujeres preeclámpticas fueron

similares a los observados en mujeres gestantes sanas en la gestación temprana y media (Fig.39). Sin embargo, en la gestación tardía los niveles séricos de Folistatin fueron significativamente más bajos en mujeres con diagnóstico de preeclampsia comparado con el grupo de mujeres gestantes sanas ($p < 0.05$) (Fig.39) (126).

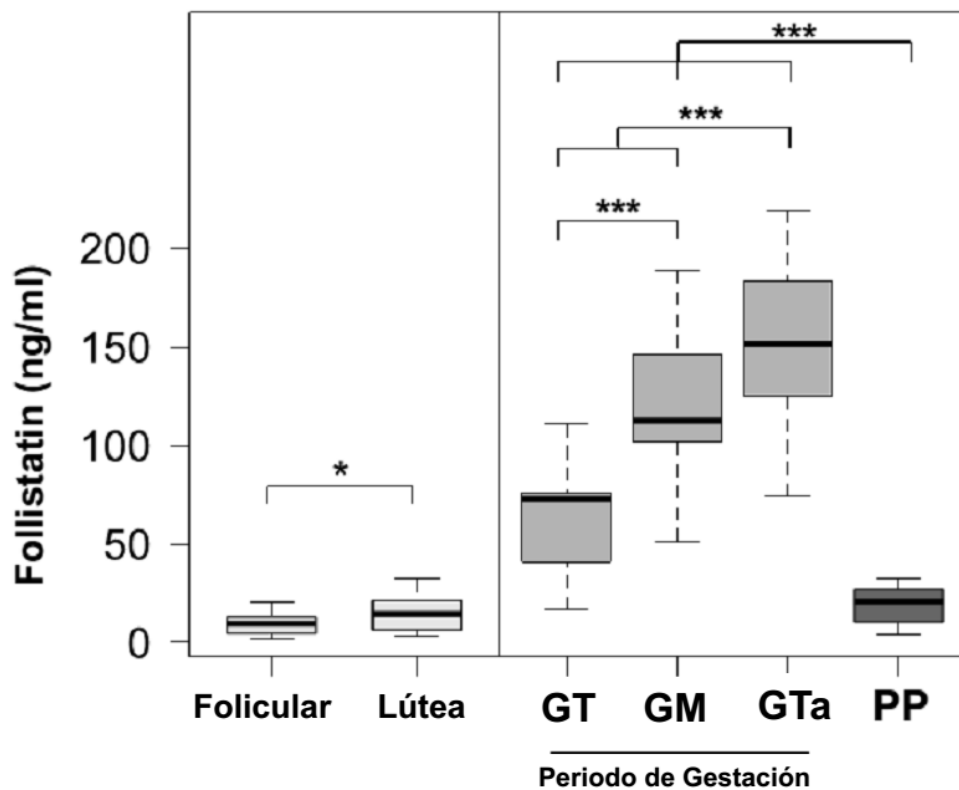


Figura 38. Gráfico de cajas y bigotes representando los niveles séricos de Folistatin, en un grupo de mujeres gestantes durante los tres periodos de la gestación (GT, gestación temprana; GM, gestación media; GTa, gestación tardía), tres meses posparto (PP) y un grupo de mujeres no gestantes, durante la fase folicular y lútea del ciclo menstrual. Se observó un incremento progresivo significativo a través de la gestación al ser comparado con mujeres no gestantes y el grupo de tres meses posparto. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

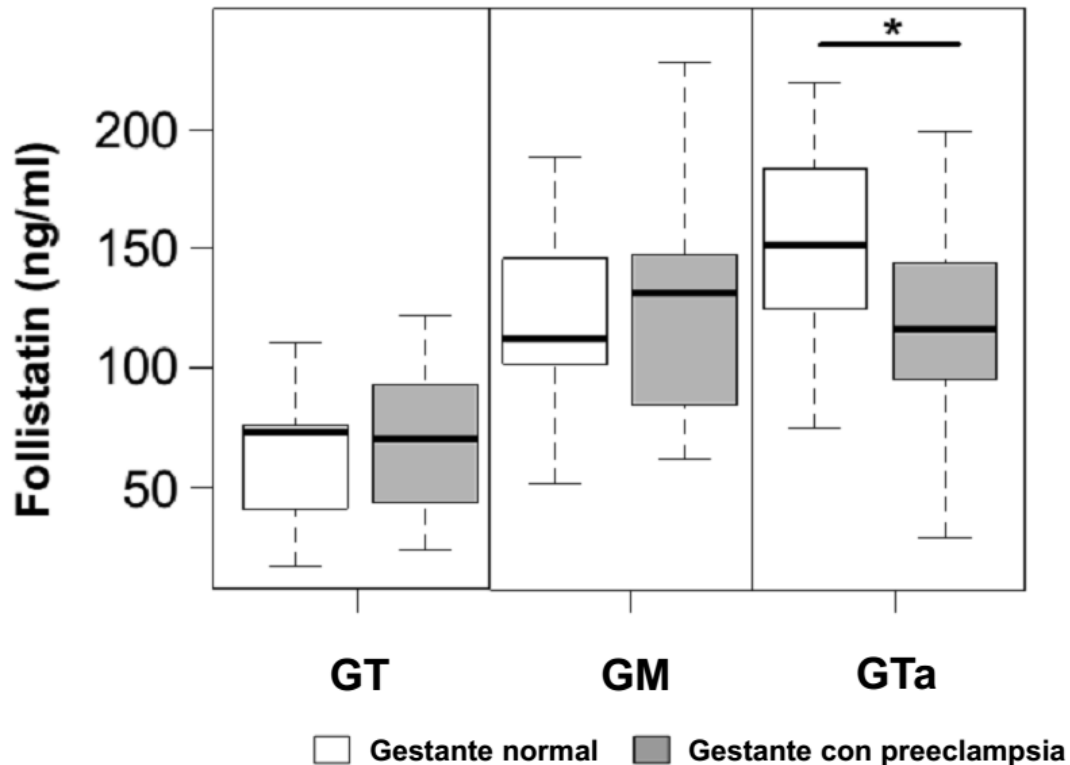


Figura 39. Gráfica de cajas y bigotes de los niveles séricos de Folistatin en una cohorte de mujeres gestantes sanas y un grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia durante la gestación, (GT, gestación temprana; GM, gestación media; GTa, gestación tardía). Se observó un descenso significativo en los niveles séricos de Folistatin en el grupo de gestantes con diagnóstico de preeclampsia comparado con el grupo de gestantes sanas durante la gestación tardía (GTa). * $p < 0.05$

11.5. Estudio de correlación entre los perfiles séricos y los parámetros de interés

En los tres periodos gestacionales analizados se observó una correlación negativa entre los niveles séricos de Chemerin y los niveles de adiponectina ($r = -0.1643$) (Fig.40). Adicionalmente, al incluir el grupo de mujeres no gestantes en el estudio de correlación, el coeficiente de correlación fue más negativo ($r = -0.2471$). No se observó una asociación significativa entre los niveles séricos de Chemerin con el índice HOMA-IR, glucosa, triglicéridos, colesterol total y col-HDL (117).

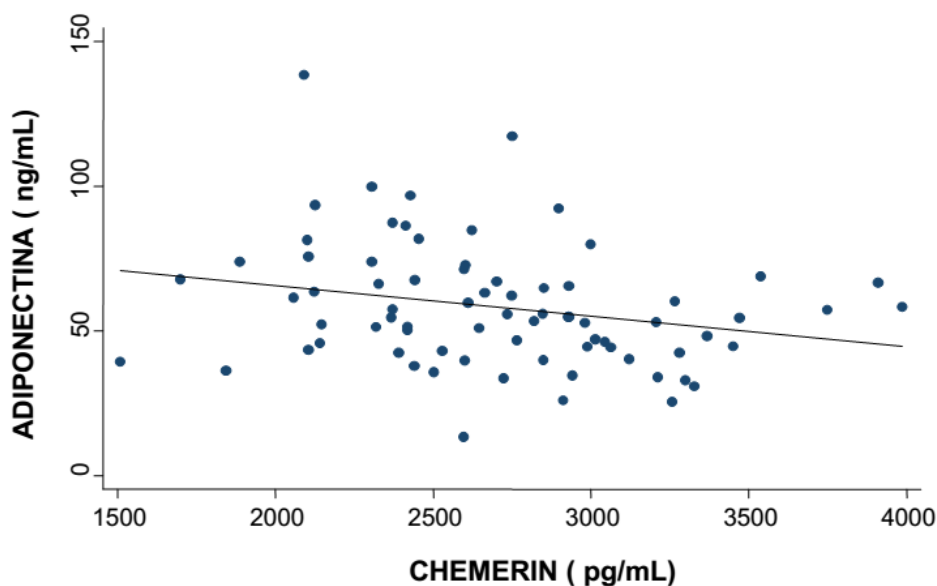


Figura 40. Scatterplot de los niveles séricos de adiponectina en relación con los niveles circulantes de Chemerin ($r = -0.3933$; $p < 0.0053$)

Por otra parte, en el análisis de correlación de BDNF se obtuvo una correlación negativa entre los niveles séricos de BDNF hacia las semanas 24-26 de gestación y la edad gestacional al nacer (gestación media, $r = -0.3220$, $p = 0.0400$ (Fig.41A). Además, se identificó una correlación negativa entre los niveles séricos de BDNF y la concentración de glucosa ($r = -0.1674$, $p = 0.0465$) (Fig.41B), no se encontró una correlación significativa entre el perfil sérico de BDNF y otros parámetros bioquímicos o antropométricos de interés (Fig.41C-F) (33).

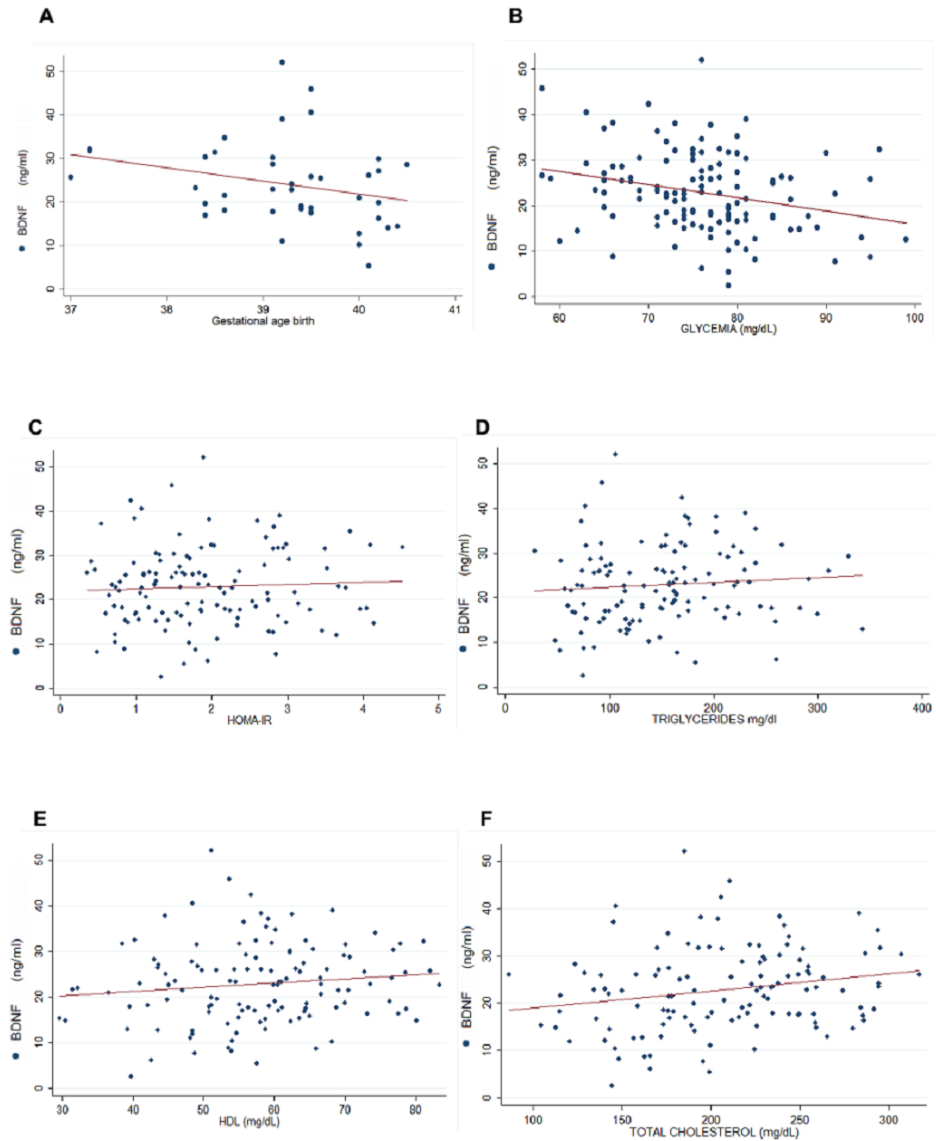


Figura 41. Coeficientes de correlación de los niveles séricos de BDNF con variables químicas y bioquímicas en el grupo de mujeres gestantes. A; con edad gestacional al nacer, **B:** con glicemia en ayunas, **C:** con índice HOMA, **D:** con triglicéridos, **E:** con col-HDL y **F:** con colesterol total.

Con respecto al análisis de correlación del perfil sérico de Irisin, solo el índice HOMA-IR mostró una correlación significativa en el primer trimestre de gestación ($r=0.43$, p

=0.006), no se encontró correlación significativa en segundo o tercer trimestres. El modelo de regresión lineal multivariado mostró una relación lineal positiva entre los niveles séricos de Irisin con el índice HOMA-IR ($p= 0.003$, $r^2 =0.22$), después de ajustar por: índice de masa corporal, triglicéridos, edad gestacional, colesterol total y adiponectina (124).

En el análisis de correlación de Meteorin, los niveles séricos de Meteorin se ajustaron por edad gestacional, observando que los niveles séricos de Meteorin se asociaban negativamente con los niveles de glucosa ($r = -0.39$, $p = 0.01$) y positivamente con los niveles de triglicéridos ($r = 0.34$, $p = 0.03$), solamente durante la gestación temprana. Por otra parte, los niveles séricos de Meteorin no mostraron una correlación estadísticamente significativa con los demás parámetros clínicos, antropométricos o metabólicos de interés (125).

Para el análisis de la relación entre los niveles séricos de Meteorin y los demás parámetros de interés, se formuló un modelo de regresión logística. Dicho modelo asocia la respuesta binaria de preeclampsia y no preeclampsia, como una función del predictor: edad gestacional, índice de masa corporal (IMC), presión arterial sistólica (SBP), triglicéridos y niveles de Meteorin, todas estas variables demostraron explicar significativamente el *odds* de preeclampsia con un intervalo de confianza del 95%. En este modelo se observó que el *odds* de preeclampsia decrece entre 1 y 35%, cuando los niveles de Meteorin incrementan 1ng/mL (125).

Finalmente, es importante señalar que se encontró una correlación significativa entre los niveles circulantes de Folistatin con los niveles de colesterol total durante la gestación temprana en el grupo de mujeres gestantes sanas ($r=0.50$, $p=0.045$), mientras que se observó una correlación directa negativa entre los niveles de Folistatin y la glicemia durante la gestación tardía en el grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia ($r= -0.66$, $p <0.01$) (126).

11.6. Algoritmo predictivo para la detección de preeclampsia

Se diseñó una aproximación basada en un árbol de decisión para el diagnóstico de preeclampsia, antes del tercer trimestre de gestación. En el presente trabajo se identificaron variables que mostraron diferencias significativas en los primeros periodos gestacionales analizados. De esta manera, durante la gestación temprana (peso, presión arterial sistólica [SBP], niveles séricos de insulina, niveles séricos de Meteorin y el índice HOMA IR), en la gestación media (peso, SBP, niveles séricos de insulina, niveles séricos de Meteorin, el índice HOMA IR y colesterol HDL). Además, en esta aproximación se usaron los deltas de las variables peso, SBP, niveles séricos de insulina y el índice HOMA IR. Posteriormente, aplicando el algoritmo J48, se incluyeron en el árbol solamente las variables con mayor importancia (Fig.42).

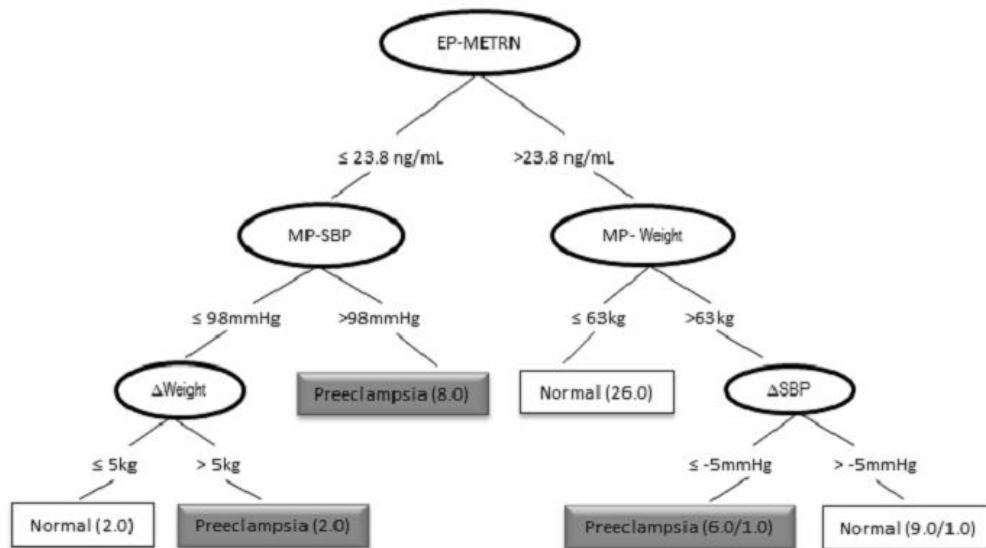


Figura 42. Modelo de clasificación basado en árbol de decisión. Los nodos de decisión son representados por círculos, los nodos de decisión muestran las variables significativas usadas para realizar la clasificación: EP-METRIN (niveles de Meteorin en la gestación temprana), MP-SBP (presión arterial sistólica en la gestación media), MP-Weight (peso en la gestación media), Δ Weight (delta de peso entre la gestación media y la gestación temprana: Δ weight = Mp.weight - EP.weight) y Δ SBP (delta de la presión arterial sistólica entre la gestación media y la gestación temprana: Δ SBP = MP.SBP - EP.SBP). Cada rama representa una prueba dado el nodo de decisión y los nodos hojas,

son representados por cuadrados. Los nodos hoja, muestran la condición en la cual la paciente es clasificada (normal o preeclampsia). Los nodos hoja, también muestran el total de mujeres a partir de la cohorte que fueron clasificadas apropiadamente / el total de mujeres a partir de la cohorte sin clasificación.

El árbol de decisión realizó una clasificación válida en ambas condiciones, normal y preeclámpica. Después de probar el árbol de decisión mediante validación cruzada, este mostró una sensibilidad del 69% y una especificidad del 76% en la detección de la preeclampsia. Además, el área bajo la curva ROC fue de 0.73, confirmando un buen nivel de precisión en la clasificación (Fig.43). En el árbol, los niveles séricos de Meteorin en la gestación temprana constituyeron el primer nodo de decisión (en la parte superior del árbol) y por lo tanto la variable más importante para clasificar. El modelo de clasificación propuso un nivel crítico de concentración sérica de Meteorin, 23.8ng/mL. En nuestra cohorte longitudinal 10 de 16 mujeres quienes presentaron niveles de Meteorin por debajo del nivel crítico (<23.8ng/mL) desarrollaron preeclampsia, estas 10 mujeres mostraron también SBP alta en la gestación media (>98mm Hg) o un incremento de peso superior a 5Kg (Δ peso > 5kg) entre el primero y el segundo trimestres de gestación. Las 10 mujeres clasificadas por el árbol de decisión como preeclámpicas fueron correctamente clasificadas.

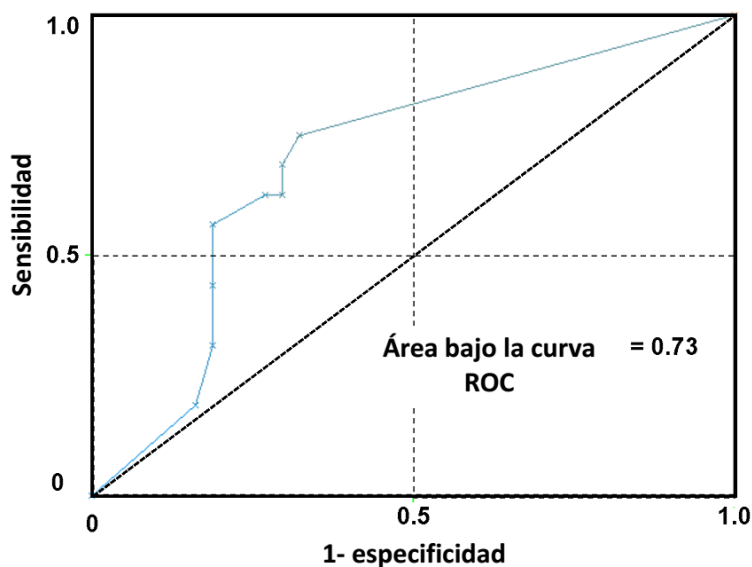


Figura 43. Curva de Característica Operativa del Receptor (ROC) del árbol de decisión. La curva ROC demuestra la capacidad para diagnosticar preeclampsia. Se usó una validación cruzada de 10 veces, para probar las predicciones y obtener los puntos sobre la curva ROC.

Por otra parte, en este estudio se encontraron seis mujeres cuyos niveles séricos de Meteorin excedían el umbral (>23.8 ng/mL), durante la gestación temprana. Estas mujeres mostraron no solo un incremento de peso en la gestación media (>63 kg), sino también, un descenso considerable en el Δ SBP (Δ SBP < -5 mmHg). En el árbol de decisión, la clasificación sobre la vía derecha fue ligeramente menos precisa (Fig.42). Por esta vía, cinco mujeres preeclámpticas de la cohorte fueron correctamente clasificadas y una no fue clasificada (125).

12. Discusión

Chemerin es reconocida como una proteína quimioatrayente que actúa como un ligando para el receptor acoplado a proteína G, CMKLR1 (*chemokine receptor-like 1*), también conocido como ChemR23. Se ha descrito su función en el sistema de inmunidad innata y adaptativa. Además, Chemerin es una proteína secretada por el tejido adiposo blanco, por lo tanto es considerada como una adipocitoquina (127). Algunos investigadores han reportado que Chemerin aumenta la señalización a la insulina y potencia la captación de glucosa estimulada por la acción de la insulina en adipocitos 3T3-L1. Mientras otros autores, han reportado que Chemerin exacerba la intolerancia a la glucosa, incrementando los niveles de insulina y disminuyendo la captación tisular de glucosa en ratones obesos/diabéticos, y también, actúa induciendo la resistencia a la insulina en músculo esquelético humano (128). Estudios previos han demostrado la expresión de Chemerin en diferentes tejidos como ovario, placenta y tejidos adiposo visceral y subcutáneo (51).

Además, a partir de los estudios realizados en diferentes poblaciones se ha encontrado una fuerte asociación entre los niveles séricos de Chemerin y marcadores de inflamación como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleuquina 6 (IL-6) y proteína C reactiva, así como, con parámetros antropométricos como el índice de masa corporal y el índice HOMA IR (129,130).

Por lo anterior, en el presente estudio se describió por primera vez el perfil sérico de Chemerin durante la gestación y en un grupo de mujeres no gestantes sanas. A partir de este análisis se estableció un patrón sérico según el cual, esta adipocitoquina disminuye al inicio de la gestación y aumenta conforme avanza el periodo gestacional, observando el punto más alto hacia el tercer trimestre de gestación. Estos resultados coinciden con los obtenidos posteriormente por el grupo de Kasher-Meron *et al.*, (127) quienes además describieron un incremento en los niveles circulantes de Chemerin cuatro días posteriores al parto. Por otra parte, se ha descrito un descenso en los niveles séricos de Chemerin seis meses posterior al parto (131). Estos resultados sugieren, que una de las posibles funciones que desempeña Chemerin durante la gestación está asociada con el

mantenimiento de un estado pro-inflamatorio característico del tercer trimestre y el trabajo de parto y que perdura por unos días posterior al mismo, debido posiblemente, a las lesiones que se causan durante el parto, la recuperación de estas y además a la regulación hormonal en este periodo caracterizado por el inicio de la lactancia. En el presente estudio además se encontró una correlación negativa con los niveles de adiponectina, estos resultados son concordantes con otros estudios en estados de resistencia a la insulina como el síndrome de ovarios poliquísticos (132).

Por otra parte, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de Chemerin en el grupo de mujeres no gestantes con respecto a los niveles observados en tercer trimestre. Finalmente, a partir de estudios realizados en modelo animal de rata, se identificó la expresión de Chemerin en placenta de rata y de humano mediante técnicas de inmunohistoquímica (31), estos hallazgos han sido corroborados mediante estudios funcionales *in vitro* y a partir de placenta humana en donde se determinó que la mayor expresión de Chemerin proviene de las células estromales y los trofoblastos extravelosos (133). Sin embargo, mediante análisis de los niveles de Chemerin en placenta, tejido adiposo visceral e hígado, tanto en la madre como en el feto, en el tercer trimestre de gestación, se determinó que el mayor aporte hacia los niveles circulantes de Chemerin durante la gestación, lo realiza el tejido adiposo visceral (127). Por lo anterior, a pesar del avance en la comprensión de los mecanismos relacionados a la acción de Chemerin durante la gestación, aun son necesarios estudios funcionales en tejido adiposo, que permitan dilucidar a profundidad el papel de Chemerin en este estado fisiológico de resistencia a la insulina e inflamación crónica.

Por otra parte, BDNF es un factor neurotrófico miembro de la familia de neurotrofinas, clásicamente relacionado con procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal. En años recientes, BDNF ha sido asociado con la regulación de la ingesta y el gasto energético, a partir de estudios genéticos realizados en modelo animal de ratón y de rata y la identificación de síndromes de importancia médica como el Síndrome WAGR (tumor de Wilms, Aniridia, anomalías Genitourinarias y Retardo mental) que además se caracteriza por hiperfagia y obesidad. Este síndrome se origina a partir de una delección de tamaño variable, en el cromosoma 11, la cual, en algunos casos, se extiende hacia el gen de *Bdnf*. Además, se han reportado mutaciones en dicho gen, como

Val66Met, la cual fue identificada a partir de estudios poblacionales y está asociada con ganancia de peso y obesidad debido a la alteración en la secreción de BDNF, tanto en modelo animal, como en humanos (58).

BDNF ejerce su efecto biológico mediante la unión a dos receptores $p75^{\text{NTR}}$ y TrkB. Mutaciones en el gen que codifica a TrkB, pero no en el gen que codifica a $p75^{\text{NTR}}$, están asociadas a obesidad en humano y ratón. Sugiriendo que los efectos de BDNF en el balance energético son mediados a través de la vía del receptor TrkB. Se han descrito cuatro mecanismos por medio de los cuales BDNF es secretado en una neurona y puede acoplarse a TrkB, encontrándose en una población neuronal diferente: de forma autocrina, paracrina, anterógrada y retrógrada (134). Por lo tanto, BDNF puede actuar sobre neuronas cercanas o lejanas del cuerpo celular que expresen TrkB para regular el balance energético (134).

Por otra parte, se ha detectado la expresión de BDNF y TrkB en embriones en la pre-implantación y en células del trofoectodermo, en donde parecen tener una función en el desarrollo fetal-placentario. Mediante la unión a TrkB, BDNF promueve la proliferación de las células del trofoectodermo para convertirse en trofoblastos invasivos, suprimiendo la apoptosis e induciendo la extensión del blastocisto, preparando al embrión para la implantación (67). La expresión de BDNF y TrkB persiste en el trofoblasto placentario posterior a la implantación y parece ser necesaria para el desarrollo placentario (135). Además, la expresión de BDNF se ha asociado con la promoción en la angiogénesis durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, alteraciones en los niveles séricos de BDNF durante la gestación y en la expresión en placenta humana, se han asociado a condiciones patológicas como preeclampsia, parto pretermino, gestación ectópica y aborto espontáneo (135,136).

Por lo antes mencionado, en el presente estudio se analizó el perfil sérico de BDNF en mujeres gestantes normales y no gestantes sanas, además se describió el perfil de expresión de la proteína en placenta en primero, segundo y tercer trimestres de la gestación. El perfil sérico de BDNF durante la gestación, mostró un descenso al inicio del seguimiento, en comparación con el grupo de mujeres no gestantes, seguido de un incremento hacia segundo trimestre, manteniéndose sin variación significativa hacia el final de la gestación. Se ha reportado que la administración sistémica de leptina

incrementa los niveles de mRNA de *Bdnf* en el Hipotálamo Ventromedial (VMH) y los niveles de proteína de BDNF en el Complejo Vagal Dorsal (DVC), en modelo animal de ratón. Estos efectos sobre los niveles de proteína de BDNF probablemente resulten a partir de un incremento en la traducción del mRNA de *Bdnf* en las dendritas, de la misma manera como leptina incrementa la traducción de *Bdnf* en dendritas de neuronas hipotalámicas cultivadas (58). El efecto regulador que ejerce leptina sobre BDNF es importante ya que recientemente se describió el perfil sérico de leptina en un grupo de mujeres no gestantes, durante la gestación y tres meses posparto (137), mostrando un perfil concordante con los resultados obtenidos en el presente estudio, en donde ocurre una disminución al inicio de la gestación, seguido de un incremento gradual a medida que avanza, siendo tercer trimestre el punto más alto en los niveles circulantes de leptina durante la gestación.

Leptina ejerce su acción a través de la forma larga del receptor de leptina LepRb, sin embargo, las neuronas que expresan BDNF en el Hipotálamo Dorsomedial (DMH) y el VMH no expresan LepRb, pero se ha encontrado que la administración de leptina induce la expresión de c-Fos en estas neuronas. Esta observación indica que leptina estimula indirectamente la síntesis del mRNA de *Bdnf* y la proteína, probablemente activando neuronas a través de circuitos neurales polisinápticos (58). También se han detectado niveles inferiores de BDNF y leptina en sangre de cordón umbilical en comparación con los niveles circulantes maternos (138,139).

Adicionalmente, a partir de estudios genéticos realizados en ratones *bdnf* (-/-), (+/-), (+/+), se describió la permeabilidad de la membrana placentaria para BDNF, de una manera dosis dependiente (140), todo lo anterior, podría indicar una contribución menor del feto hacia los niveles maternos, tanto de BDNF como de leptina y un transporte transplacentario que permite el aporte necesario de BDNF y leptina hacia el feto, favoreciendo la proliferación y supervivencia celular en los procesos de invasión, implantación y posterior desarrollo fetal, asegurando el balance energético y de la ingesta apropiado en etapas gestacionales tempranas, en las cuales predomina la hiperfagia y la acreción adiposa en la gestante.

Por otra parte, es bien caracterizada la síntesis, secreción y expresión de los receptores largos y cortos de leptina en citotrofoblastos. Así mismo, leptina y LepRB han sido colocalizados en sincitiotrofoblastos (los cuales están directamente en contacto con la circulación materna), citotrofoblastos extravellosos y células endoteliales vasculares fetales (las cuales están en contacto directo con la circulación fetal) (141). En el presente estudio se describió la inmunoreactividad de BDNF y TrkB en placenta humana en las tres edades gestacionales analizadas, observando un perfil que desciende conforme avanza la gestación. Es importante destacar que en el presente estudio se detectó inmunoreactividad para BDNF y TrkB en sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y células deciduales, las dos primeras corresponden a poblaciones celulares en donde se ha descrito la expresión de leptina, indicando una posible regulación autocrina y paracrina en la expresión de BDNF placentaria.

De otro lado, el músculo esquelético es el órgano más grande en el cuerpo y tiene un papel preponderante en la sensibilidad a la insulina y la homeostasis metabólica. A partir de la identificación de miostatina en el año 1997 e IL-6 en el año 2000, como factores secretados por el músculo, el músculo esquelético ha emergido como un órgano endocrino extremadamente activo que secreta una amplia variedad de citoquinas, quemoquinas, factores de crecimiento, hormonas y factores vasoactivos, denominados colectivamente mioquinas o miocinas. Las mioquinas han sido propuestas como intermediarios de los efectos benéficos de la actividad física en la salud y el bienestar humano (142). Se ha demostrado que las proteínas secretadas por el músculo esquelético, tienen la capacidad de comunicarse con células localmente (acción autocrina/paracrina) o en tejidos distantes (acción endocrina) (68).

De otra parte, se sabe que los adipocitos provenientes del tejido adiposo blanco (WAT por sus siglas en inglés), se caracterizan por la presencia de lípidos uniloculares, pocas mitocondrias y relativamente bajo gasto metabólico. Mientras que los adipocitos provenientes del tejido adiposo pardo (BAT por sus siglas en inglés), se caracterizan por gotas lipídicas multiloculares, gran cantidad de mitocondrias, alto gasto metabólico y la expresión de proteínas desacopladoras 1 (UCP1). Recientemente, se ha detectado la presencia de adipocitos pardos en WAT de ratón BALB/c como respuesta a procesos de aclimatación al frío. Estudios han demostrado que los adipocitos pardos en WAT presentan una alta expresión de UCP1; por lo tanto, esta subpoblación de adipocitos

blancos pueden ser definidos como *the brown in white (brite)* o adipocitos beige (71). Además, se ha descrito este efecto también como resultado del ejercicio, en el cual se ha observado una elevada termogénesis y un subsecuente incremento en el gasto energético (143). El pardeamiento de los adipocitos WAT ha ganado mucho interés debido a su potencial como fuente terapéutica para la obesidad y enfermedades metabólicas (71).

Por otra parte, *Fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5), el cual es un gen conservado en mono Rhesus, perro, ratón, rata, pollo y pez cebra (144), es sintetizado como una proteína de membrana tipo 1, la cual es clivada en la porción N-terminal y enviada a circulación como un polipéptido altamente glicosilado de aproximadamente 12 kDa, que se denominó Irisin. Este proceso parece estar regulado por *PPAR γ -coactivator-1 α* (PGC α). Irisin parece actuar preferencialmente en el pardeamiento “*browning*” de los depósitos de tejido adiposo blanco, lo cual se observó al incrementar sus niveles circulantes en ratón obeso, mediante vector viral y esta elevación se correlacionó con un incremento en la tolerancia a la glucosa (145).

Estudios recientes han detectado la expresión del sistema FNDC5/Irisin en WAT visceral y más predominantemente, en tejido adiposo subcutáneo en modelo animal de rata obesa y en humano obeso (146), demostrando un aporte significativo proveniente de tejido adiposo blanco a los niveles circulantes de Irisin en ambos modelos.

Diferentes estudios han reportado una asociación positiva entre los niveles circulantes de Irisin y el índice de masa corporal. En este mismo sentido, Stengel *et al.*, realizó un estudio incluyendo pacientes con anorexia nerviosa, pacientes con obesidad mórbida y controles sanos, encontrando que los niveles circulantes de Irisin en pacientes con obesidad fueron más altos en comparación con el grupo control y el grupo de pacientes con anorexia, además en este estudio se encontró una asociación positiva con el índice de masa corporal. Estos resultados son similares a los de Pardo *et al.*, y Liu *et al.*, en este último se demostró que en pacientes con diabetes tipo 2 (DMT2) e insuficiencia renal, los niveles de Irisin se correlacionaron con el índice de masa corporal y el porcentaje de masa grasa (147).

Teniendo en cuenta que la gestación se ha descrito como un estado diabetogénico fisiológico, en el presente estudio se analizó el perfil sérico de Irisin en mujeres gestantes sanas y en un grupo de mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia ya que en estas mujeres se ha descrito mayor resistencia a la insulina en comparación con las gestantes normales. Adicionalmente, se analizaron los niveles de Irisin en un grupo de mujeres jóvenes no gestantes y se describió por primera vez la expresión de la proteína Irisin en placenta humana de primero, segundo y tercer trimestres de la gestación.

En el presente trabajo, también por primera vez se describió un incremento en los niveles circulantes de Irisin durante la fase lútea del ciclo menstrual. En este sentido, un estudio realizado en hombres y mujeres jóvenes, mostró niveles séricos de Irisin más altos en el grupo de mujeres luego de ajustar por la masa corporal magra (148). Sin embargo, en este estudio no se realizó un análisis diferencial correspondiente a las fase del ciclo menstrual como se hizo en el presente trabajo, siendo esto de gran importancia ya que se conoce que la regulación hormonal y de muchas adipocitoquinas varía de acuerdo a la fase del ciclo menstrual, como es el caso de leptina y resistina. Tanto en leptina como en resistina se ha documentado un patrón similar al observado en Irisin, con un incremento en la fase lútea del ciclo menstrual, no así en adiponectina (149), los autores argumentaron una posible regulación mediada por el estado proinflamatorio característico de esta fase del ciclo menstrual.

En el caso de leptina, Ahrens *et al.*, en un seguimiento de 259 mujeres por más de dos ciclos menstruales, encontró un sutil efecto del estradiol, la hormona luteinizante (LH), la progesterona y la hormona folículo estimulante (FSH), sobre los niveles de leptina, después de hacer un ajuste riguroso por el porcentaje de masa grasa, ingesta calórica, actividad física y otros factores que influyen sobre la fisiología hormonal del ciclo menstrual. Lo que demuestra la compleja regulación por parte de diferentes ejes endocrinos que tiene lugar durante el ciclo menstrual, como preparación para la gestación (150). Por otro lado, otros grupos han reportado una fuerte regulación mediada por LH (151) y expandida por FSH (152) sobre los niveles de leptina durante el ciclo menstrual. Por lo anterior, son necesarios estudios que profundicen en la regulación de Irisin en este complejo panorama durante el ciclo menstrual.

En el presente estudio se observó un incremento en los niveles séricos de Irisin durante la gestación, al comparar los niveles observados en el grupo de mujeres no gestantes, con el grupo de mujeres gestantes de primer trimestre. Este hallazgo se podría asociar a la regulación que podría efectuar la placenta y la regulación hormonal derivada de su desarrollo y mantenimiento. Con respecto a esto, Bilbao *et al.*, reportó un incremento en los niveles de expresión ovárica de la enzima microsomal 3β HSD, la cual convierte la pregnenolona a progesterona, en ratas inmaduras luego de un tratamiento diario con dosis bajas de leptina (153). En el presente estudio se observó un efecto sobre la regulación de los niveles de Irisin posiblemente debido a la acción de la progesterona en la fase lútea del ciclo menstrual y durante la gestación, debido a que el cuerpo lúteo es la fuente de progesterona en etapas tempranas de la gestación y posteriormente la placenta asume la producción de progesterona. Esta regulación, es un determinante fundamental desde la implantación hasta el desenlace de la unidad materno-fetal (154).

Aunque los hallazgos iniciales con respecto a la relación entre Irisin y la sensibilidad a la insulina mostraban esta hormona con un potencial benéfico en la regulación del peso corporal, la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa, diversos estudios clínicos han conducido a resultados divergentes. En este sentido, Sesti *et al.*, reportó a partir de un estudio transversal realizado en 192 sujetos no diabéticos, una relación inversa entre los niveles séricos de Irisin y la sensibilidad a la insulina, además de una relación directa con aterosclerosis y por lo tanto un incremento de riesgo de enfermedad cardiovascular en los próximos diez años (155).

Adicionalmente, se han observado niveles séricos mayores de Irisin en sujetos obesos en comparación con hombres sanos en reposo (156). Otros estudios contradicen estos resultados, como los reportados por Iglesias *et al.*, quienes encontraron que los niveles séricos de Irisin aumentaron conforme a la pérdida de peso en 93 adultos caucásicos con síndrome metabólico, quienes fueron sometidos a una dieta hipocalórica por ocho semanas. Resultados similares fueron reportados por Crujeiras *et al.*, (147). Mientras, Sanchis-Gomar *et al.*, no encontraron asociación entre los niveles de Irisin y el IMC u otros marcadores antropométricos y metabólicos en pacientes obesos y diabéticos (157).

En el presente estudio se observó un incremento en los niveles de Irisin desde el inicio de la gestación, un pico hacia el segundo trimestre, el cual se mantuvo hasta el final de la gestación. Previamente se habían reportado niveles de Irisin más altos en la circulación materna en comparación con los niveles en cordón umbilical, así mismo, se han encontrado niveles más bajos en cordón umbilical en fetos con retardo en crecimiento intrauterino en comparación con fetos normales (158), lo que sugiere un mayor aporte materno en los niveles de Irisin materno, posiblemente proveniente del tejido adiposo, el músculo y la placenta. En el presente estudio por primera vez se describió la expresión de Irisin en placenta durante la gestación, observando una fuerte inmunoreactividad en células deciduales, sincitio y citotrofoblastos, sugiriendo un posible aporte placentario a los niveles maternos de Irisin.

A partir de los resultados, se podría hipotetizar un mayor aporte del que se ha reportado previamente (71), por parte del tejido adiposo y eventualmente la placenta, hacia los niveles maternos de Irisin durante la gestación. Una hipótesis alternativa podría ser una resistencia a la acción de Irisin durante la gestación, como se ha documentado para otra adipocitoquina como leptina (159) y más aun partiendo de la asociación observada entre los niveles séricos de leptina y los de Irisin (160). La resistencia a Irisin permitiría a la madre ganar peso, frenar el proceso de pardeamiento en tejido adiposo blanco y de esta manera alcanzar los requerimientos metabólicos que le exige la gestación y la lactancia futura.

Finalmente, al comparar el grupo de mujeres gestantes sanas con el grupos de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, en el presente estudio se encontró una reducción en los niveles séricos de Irisin cercana al 21% al inicio de la gestación y al 49% en tercer trimestre; este hallazgo concuerda con estudios previos en los cuales se ha reportado una disminución en los niveles séricos de Irisin en diabetes mellitus gestacional (GDM) y retardo en crecimiento fetal (158). Por esta razón recientemente, Erol *et al.*, han propuesto el estudio de los niveles de Irisin en la gestación temprana como un posible marcador de GDM (161). Es posible que la reducción en los niveles de Irisin se pueda explicar a partir de una reducción en el aporte a nivel placentario en el grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia. Sin embargo, se requieren estudios enfocados hacia la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados a esta posible contribución hacia los niveles maternos de Irisin.

Por otra parte, hace aproximadamente tres décadas, durante el procesamiento y purificación de inhibina a partir de fluido folicular ovárico de cerdo, fue identificada una fracción que tenía la capacidad de estimular la secreción de la FSH a partir de células de la pituitaria de rata en cultivo. Este descubrimiento llevó al aislamiento y caracterización de las activinas. Debido a la considerable homología estructural de inhibinas y activinas con el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), fueron clasificadas como miembros de esta superfamilia de proteínas (162). Su estructura está compuesta de dímeros de subunidades β asociados a disulfuro (β A y β B), los cuales pueden dimerizarse con una subunidad α de inhibina A ($\alpha\beta$ A) e inhibina B ($\alpha\beta$ B). De esta manera, se han descrito tres formas de activina, activina A (β A β A), activina B (β B β B) y activina AB (β A β B) (163).

Activina A y activina B actúan a través de la vía quinasa serina/treonina, la cual es común para otros miembros de la superfamilia TGF- β . Las activinas se unen a uno de dos tipos de receptores de activina II (ACVR2A o ACVR2B), presentes en la superficie de las células blanco. El receptor tipo II se une al receptor tipo I, el receptor I de activina también se conoce como *receptor-like kinase* (Alk). Mientras activina A actúa mediante Alk 4 (receptor de activina IB) activina B y AB, actúan mediante los receptores Alk4 y 7. El receptor de activina tipo I contiene residuos serina/treonina quinasa en sus dominios intracelulares y la unión de los receptores I y II, conduce a la fosforilación de estos residuos. Los receptores tipo I inducen la fosforilación de SMAD2 y 3, estas proteínas forman un complejo factor de transcripción heteromérico, cuyo mediador común es SMAD4 (162,164).

Estos complejos son traslocados al núcleo, donde modulan la transcripción de genes blanco, para producir efectos sobre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (162). Activina A también puede actuar mediante la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP), las cuales son inducidas en estados de inflamación. Así, MAP quinasas como ERK 1/2, JNK y p38, son moduladores importantes de genes involucrados con inflamación e inmunidad. La producción de activina A es estimulada por mediadores de inflamación como IL-1 y ligandos *Toll-like receptor* los cuales activan la señalización MAP quinasa mediante la vía MyD88/TRAP

(162). La regulación negativa puede ser mediada por inhibinas, ya que al compartir la subunidad β , pueden unirse al receptor tipo II de activina; sin embargo, la afinidad de esta interacción es más baja (164). Además, inhibina es capaz de inhibir la capacidad de activina en la estimulación de FSH, regulando la cantidad de activina que se produce, limitando la disponibilidad de subunidades β para la síntesis de activina (162).

Otro importante modulador de la bioactividad de activina es Folistatin. Folistatin se une con alta afinidad a activina y es el mayor factor que controla la acción biológica de las activinas, pero su nombre se deriva a partir de la capacidad de suprimir la secreción de FSH. Se generan tres formas de Folistatin a partir del procesamiento por *splicing*, la forma más corta FST288, se une a proteoglicanos que contengan heparán sulfato y es normalmente asociada con superficies celulares, la forma intermedia FST303 que se encuentra en las gónadas y FST315 la forma completa, que es la forma predominante a nivel sérico y que puede unirse a heparán sulfato solamente después de la unión con activina ya que una vez tiene lugar la unión, ocurre un cambio conformacional en Folistatin que expone los sitios de unión a heparán sulfato. Folistatin también se une a otros factores de crecimiento relacionados con una afinidad diez veces más baja, entre estos se encuentran miostatina, *Growth/differentiation factor 9* (GDF9), proteínas morfogénicas óseas (BMPs) 2, 5, 7 y 8 y TGF β 3 (163).

Cada subunidad de activina se une a una molécula de Folistatin, de esta manera, el complejo activina-Folistatin, está compuesto de un dímero de activina y dos moléculas de Folistatin. Una vez FST288 se une a activina, este complejo experimenta una rápida endocitosis y degradación lisosomal, mientras la unión de FST315 y activina produce un cambio conformacional de la proteína, exponiendo las uniones heparán sulfato, siendo blanco de degradación lisosomal, así Folistatin causa una inhibición irreversible de activina (162).

La función de activina A durante la foliculogénesis y la implantación es bien conocida. Es así como la expresión de activina A está asociada con adhesión y desarrollo del cigoto y el fino control realizado por Folistatin en este periodo garantiza la correcta implantación (154). Durante la gestación la placenta y las membranas fetales son la principal fuente de activina A circulante. Durante la gestación temprana y media, los niveles séricos maternos de activina A son estables y bajos, aumentando dramáticamente a partir de la

semana 24, alcanzando su pico aproximadamente hacia el término de la gestación (165) y declinan abruptamente posteriormente al parto (162). De hecho, se ha establecido que la placenta es la mayor fuente de activina A durante la gestación y se ha demostrado la expresión de los receptores tipo I y tipo II en placenta y membranas fetales (165). Por otra parte, Folistatin ha sido asociado al eje reproductivo en hembras, la gestación y el desarrollo embrionario. Se ha reportado una interacción entre el sistema Folistatin – activina y prolactina durante la decidualización (166).

Por otra parte, Folistatin fue recientemente identificado como una adipoquina y se encontró una reducción en el mRNA y en la proteína secretada a partir de biopsias de tejido adiposo blanco cultivadas, provenientes de sujetos obesos en comparación con individuos con peso normal. Además, Folistatin neutraliza la acción inhibitoria de miostatin sobre la diferenciación de adipocitos, sugiriendo un posible papel regulador de Folistatin sobre la masa grasa *in vivo* (167). De esta manera, Folistatin juega un papel importante en el desarrollo embrionario, en la reproducción y tiene acción endocrina y de mantenimiento del sistema músculo esquelético. En este sentido, recientemente Zhao *et al.*, demostraron que la sobre-expresión de Folistatin incrementa el tamaño de los islotes pancreáticos estimulando la proliferación de células β pancreáticas en ratones db/db (168).

Teniendo en cuenta las implicaciones que la regulación del sistema Activina-Folistatin pueden tener durante la gestación normal y en patologías como la preeclampsia, en el presente estudio se analizaron los niveles circulantes de Folistatin durante la gestación en un grupo de mujeres sanas y tres meses posparto, además en un grupo de mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia en el primero, segundo y tercer trimestres de la gestación; también se determinó el perfil sérico de Folistatin en las fases folicular y lútea del ciclo menstrual en un grupo de mujeres jóvenes sanas.

En el presente estudio se encontró un aumento estadísticamente significativo de los niveles de Folistatin en la fase lútea del ciclo menstrual ($p < 0.05$), sugiriendo un posible papel regulador de las hormonas esteroideas sobre los niveles de Folistatin; sin embargo, no se detectó una asociación entre los niveles de Folistatin y los niveles de progesterona. Los resultados obtenidos en el presente estudio son contrarios a lo reportado por Mosler

et al., quienes no observaron diferencias significativas en los niveles de Folistatin durante el ciclo menstrual; sin embargo, dicho estudio se realizó en un grupo de solo cuatro mujeres sanas, no fumadoras y en dos puntos del ciclo menstrual, en la fase folicular (menstruación) y en la ovulación (169).

Se conoce que durante la fase folicular temprana se observa un patrón hormonal en el cual los niveles de estradiol, progesterona y LH se encuentran bajos y la FSH muestra un pico discreto, mientras que durante la ovulación, se observa un pico de la LH, un pico discreto de la FSH y un descenso en los niveles de estradiol, así como un incremento en los niveles de progesterona; finalmente, durante la fase lútea se observan altas concentraciones de progesterona, niveles basales de LH, FSH y un incremento leve en los niveles de estradiol (150,170). Por lo anterior, se podría pensar que el incremento en los niveles de Folistatin en la fase lútea observado en el presente estudio se debe a la modulación por parte de la progesterona; son necesarios estudios más amplios para confirmar esta relación.

Por otra parte, en el presente estudio se observó un patrón ascendente en los niveles de Folistatin conforme avanza la gestación, observando los niveles más altos de Folistatin en el tercer trimestre de gestación y un abrupto descenso posterior en el grupo de tres meses posparto. Además se observó un descenso en los niveles de Folistatin en el grupo de gestantes con diagnóstico de preeclampsia. Cabe destacar que se observó una marcada diferencia entre los niveles séricos de Folistatin en el grupo de mujeres no gestantes durante la fase lútea con respecto al primer trimestre de gestación, lo cual apunta hacia la hipótesis del posible papel de la progesterona sobre la regulación de los niveles de Folistatin ya que los niveles de progesterona desde el primer trimestre de la gestación son mas altos que los correspondientes a la fase lútea del ciclo menstrual. Esta observación coincide con estudios previos en ratón, en los cuales se han analizado los niveles de Fst288 y Fst315, en los primeros días de la gestación (etapa de preimplantación, días 1-4) y en respuesta a la administración de 17β -estradiol y progesterona en ratones hembra ovariectomizadas, encontrando un incremento en los niveles de ambas variantes durante fases tempranas de la gestación y un incrementos en respuesta al tratamiento con progesterona, demostrando que la progesterona regula la expresión uterina de ambas variables de Folistatin, durante la gestación en útero de ratón (171).

El incremento observado en los niveles séricos de Folistatin durante la gestación, fue observado previamente por O'Connor *et al.*, quienes, a partir de un estudio transversal, describieron un patrón similar tanto para activina A como para Folistatin (172). De igual manera, Wakatsuki *et al.*, reportaron este mismo patrón y un marcado descenso en los niveles de Folistatin durante el parto y hasta 30 días posterior a este (173). En el presente estudio se confirmó este perfil a partir de una cohorte longitudinal durante la gestación y tres meses posparto, observando un descenso marcado que lleva a la mujer en la etapa posparto a tener niveles similares a los observados en el grupo de mujeres no gestantes, lo que sugiere una posible función reguladora de Folistatin sobre la acción de activina A durante la gestación. Es conocido que la acción de activina A es necesaria para la foliculogénesis y la implantación del cigoto, así mismo, es necesaria una fina regulación de esta acción para garantizar el apropiado desarrollo del cigoto (154). Esta regulación de la reproducción posiblemente se deba a la acción hormonal, ya que la gestación se caracteriza por marcados cambios de los niveles de hormonas y de adipocitoquinas como leptina, entre las más estudiadas. En el caso concreto del sistema Activina A- Folistatin, existe evidencia que sugiere una acción independiente de leptina por lo menos en lo que se refiere a la regulación de la ingesta (174,175). Son necesarios estudios conducentes a aclarar esta posible regulación durante la gestación.

Por otro lado, la progesterona es conocida como la hormona de la gestación, ya que es fundamental desde la implantación hasta el desenlace materno-perinatal. Se ha reportado un descenso en los niveles de progesterona como respuesta al tratamiento con activina A, B y AB, en células luteínicas de la granulosa humanas (176). Además, se ha demostrado mediante un modelo *knockdown* para Folistatin, en células de la granulosa en modelo animal bovino, un descenso en los niveles de estradiol, sin afectar los niveles de progesterona. Así mismo, se observó una detención de estas células en fase S y un incremento significativo en la apoptosis (177). Finalmente, Petraglia *et al.*, describieron en células provenientes de placenta humana el efecto estimulante de activina A sobre los niveles de progesterona (178). Esta discordancia en los hallazgos antes mencionados, posiblemente se deba al modelo implementado, ya que los dos primeros estudios se realizaron en células de la granulosa (ovario) y el último en células provenientes de la placenta.

En este sentido, se conoce el efecto estimulante que la activina A ejerce sobre el potencial invasivo de citotrofblastos aislados de placenta hasta la décima semana de gestación, mientras que Folistatin es inhibidor en la etapa tardía del primer trimestre. Sugiriendo que la activina materna promovería la invasión mediada por células citotrofoblasticas (179). Recientemente, Coutinho *et al.*, demostraron en cultivo de Celulas Stem Cell Embrionarias Humanas (HESC) obtenidas apartir de aspirado de endometrio, una fina regulación de la apoptosis entre activina A y Folistatin observando que, al tratar estas células con activina A sin Folistatin, se incrementa el nivel de supervivencia celular y al incluir en el tratamiento Folistatin, las células regresan al rango de apoptosis encontrado en las células control. Este fino control puede ser de gran importancia ya que la reducción de la apoptosis podría condicionar una excesiva invasividad y una implantación defectuosa (180). Los resultados obtenidos en el presente estudio posiblemente se deben a la regulación de Folistatin sobre la acción de activina A, principalmente en lo relacionado con la invasión, diferenciación celular y apoptosis, a su vez mediado por la acción de hormonas esteroideas como estradiol y progesterona.

Finalmente, en el presente estudio se observó un descenso en los niveles de Folistatin en el grupo de mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia en comparación con las gestantes sanas. Estos resultados son concordantes con hallazgos en gestación ectópica y aborto, en los cuales se observó un descenso en los niveles séricos de activina A y Folistatin en comparación con el grupo control (181). Así mismo, en un estudio en mujeres con Diabetes Mellitus Gestacional se observó un descenso en los niveles séricos de Folistatin en comparación con el grupo control (182). Los resultados del presente estudio también se ajustan a lo observado por Casagrandi *et al.*, quienes demostraron un descenso en los niveles de expresión de Folistatin y de los receptores de activina A en placentas a término provenientes de mujeres gestantes sanas y de mujeres con diagnóstico de preeclampsia (183). Sin embargo, otros estudios han mostrado un aumento en los niveles de activina A en mujeres con preeclampsia, incluso desde el primer trimestre de gestación (165,184). Estos resultados sugieren un desbalance entre los procesos pro y anti apoptóticos que tienen lugar en la placenta desde la implantación hasta el parto y que permiten el desarrollo y mantenimiento fetales. Por lo tanto, el sistema activina A-Folistatin constituye un complejo mecanismo de regulación de la diferenciación, supervivencia e invasión celular de gran importancia durante la gestación.

Por otra parte, Nishino *et al.*, reportaron por primera vez la acción de una proteína secretada denominada Meteorin, debido a su capacidad de elongar la cola de las células gliales. Se determinó que esta proteína se expresaba en progenitores neurales indiferenciados y en linaje de astrocito, incluyendo células gliales radiales, ejerciendo un efecto sobre su diferenciación y en la formación de redes axonales (185). El gen de Meteorin se localiza en el cromosoma 16 humano (p13.3), su mRNA contiene un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 293 aminoácidos en humano y 291 en el ratón (185). Meteorin muestra una identidad cercana al 40% en la secuencia de aminoácidos con *Meteorin like*, con la cual conforman una nueva familia altamente conservada. Este último sin embargo, ha sido catalogado como una nueva adipocitoquina que se secreta preferentemente en tejido adiposo subcutáneo y no se detectó su expresión en cerebro, a diferencia de Meteorin (186).

Por otro lado, Park *et al.*, mediante análisis de secuencias (EST), identificaron un incremento en los niveles de Meteorin en ciclos de re-oxigenación posterior a hipoxia, en cultivos primarios de astrocitos. Además, se identificó que la acción de Meteorin ejercía un efecto atenuante sobre la actividad anti-angiogénica en células endoteliales y astrocitos, mediada por (trombospondina) TSP 1/2 (187). Profundizando en el papel de Meteorin en la diferenciación de poblaciones neurales, Wang *et al.*, describieron una nueva función de Meteorin en la recuperación de la enfermedad cerebro-vascular inducida, promoviendo la neurogénesis estriatal y la migración de neuroblastos en modelo animal de rata (188). También se ha descrito la expresión de Meteorin en otros tejidos diferentes al cerebro, tales como riñón, corazón y ovario, así como en estados embrionarios y en estados de desarrollo pos-natal, en modelo animal de ratón (189).

Finalmente, Kim *et al.*, mediante un modelo de *knockout* de Meteorin *-/-* encontraron que esta proteína se expresa en la Masa Interna de los blastocistos incluso antes de la implantación. Además, la delección de Meteorin genera letalidad en el embrión alrededor de E7.5, en una etapa de desarrollo posterior a la implantación, posiblemente durante la gastrulación, debido a la regulación negativa que ejerce la deficiencia de Meteorin sobre la señalización de Nodal, el cual es un miembro de la superfamilia TGF- β cuya expresión es necesaria para el desarrollo definitivo del endodermo durante la gastrulación (190).

Partiendo de la importancia de la expresión de Meteorin durante el desarrollo embrionario, su función reguladora de la angiogénesis y teniendo en cuenta que la preeclampsia se caracteriza por una alteración en el balance de factores pro y anti-angiogénicos desde etapas tempranas de la gestación, en el presente estudio se analizaron los niveles séricos de Meteorin durante la gestación en un grupo de mujeres sanas y en un grupo de mujeres que desarrollaron preeclampsia. Se determinó la inmunoreactividad de Meteorin en placenta humana, se determinó el perfil sérico de Meteorin en un grupo de mujeres no gestantes sanas en la etapa folicular y lútea del ciclo menstrual y, finalmente, se propuso un algoritmo para la detección temprana de preeclampsia a partir de la variación en los niveles de Meteorin y la variación en peso y presión arterial en la población de estudio.

En el presente estudio por primera vez se describió la inmunoreactividad de Meteorin en placenta humana, contrario a lo reportado por Jørgensen *et al.*, en modelo animal de ratón. Se observó inmunoreactividad en sincitiotrofoblastos, citotroblastos y células deciduales. Por otro lado, se observó un incremento en los niveles séricos de Meteorin hacia el primer trimestre, siendo este momento de la gestación en el que se presentaron los niveles más altos de Meteorin durante la gestación, obteniendo diferencias significativas al comparar con el grupo de mujeres no gestantes ($p < 0.001$) y gestantes en el segundo y tercer trimestres ($p < 0.01$ en ambos casos). Estos resultados sugieren una posible regulación positiva de Meteorin en etapas tempranas de la gestación normal.

Es llamativo el incremento en los niveles circulantes de Meteorin al inicio de la gestación, ya que en este periodo tienen lugar eventos importantes como el remodelamiento de las arterias espirales uterinas, las cuales cumplen con propiedades mecánicas y fisiológicas que son necesarias para la perfusión adecuada de la placenta (107). En este sentido, es importante retomar los resultados del estudio de Park *et al.*, quienes describieron el papel de Meteorin como modulador de la angiogénesis a partir de la regulación negativa de TSP1/2. Infortunadamente, en el presente estudio no se determinó el perfil sérico de TSP1/2 en la cohorte de estudio. Sin embargo, Stenczer *et al.*, a partir de un estudio de casos y controles, reportaron un incremento en los niveles de TSP-2 en el grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia en comparación con el grupo de gestantes sanas. Además, dicho perfil se acompañó de un incremento en los niveles de Flt-1,

siendo este último parte del patrón de desbalance pro y anti-angiogenico característico de la enfermedad (191).

En este sentido, en el presente estudio se realizó una caracterización complementaria de la cohorte mediante la mediación de PIGF, Flt-1 y sEng, observando el perfil descrito por Romero *et al.* (115); estos resultados sugerirían un posible papel regulador de Meteorin en etapas tempranas del desarrollo placentario, sobre el sistema pro y anti-angiogénico placentario. Apoyando esta hipótesis, en el presente estudio se encontró una diferencia significativa entre los niveles de Meteorin en el primer trimestre en mujeres gestantes sanas en comparación con el grupo de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, ($p < 0.001$).

Es posible entonces que los niveles bajos de Meteorin se relacionen con la etiopatogenia de la preeclampsia dado que, durante el proceso patológico que tiene lugar en el inicio de la enfermedad, se han descrito anormalidades en la invasión citotrofoblástica a los vasos maternos que conducen a hipoperfusión de la placenta debido a la falla en la remodelamiento de las arterias espiral uterinas y reducción en el área de la superficie. Se presume que los eventos mencionados ocurren en ese orden y que generan un círculo vicioso que culmina en el desarrollo de preeclampsia (2,107). Tomando en consideración lo descrito por Kim *et al.*, Meteorin podría participar en eventos de proliferación y diferenciación celular que dan lugar al establecimiento de la fina red de vasos maternos y al remodelamiento de las arterias uterinas, lo cual contribuiría al establecimiento y sano mantenimiento del proceso gestacional. Sin embargo, son necesarios estudios funcionales conducentes a aclarar el rol de Meteorin durante la gestación humana.

En el presente estudio también se formuló un algoritmo para predicción temprana de preeclampsia, tomando en consideración el patrón diferencial de Meteorin en este periodo de la gestación en gestantes sanas y en gestantes con la enfermedad. Además, teniendo en cuenta el perfil complementario observado con otros factores pro y anti-angiogénicos, cuyos patrones han contribuido como herramienta de diagnóstico y seguimiento clínico. Usando la herramienta de minería de datos de árbol de decisión, se formuló un algoritmo que reunió los datos que mejor explicaron la variación observada en

ambas condiciones. De esta manera, se encontró que el *odds* de desarrollar preeclampsia decrece entre el 1 y el 35% cuando los niveles séricos de Meteorin incrementan 1ng/mL. Así también, el árbol de clasificación mostró que los niveles séricos de Meteorin por encima o por debajo de 23.8ng/mL, son cruciales en la detección temprana de preeclampsia. En este algoritmo se tomó como punto de corte para la presión arterial sistólica (> 98mmHg) y para el peso 63Kg durante la gestación media.

El árbol de decisión mostró que las variables de presión arterial sistólica y peso, analizadas individualmente, no fueron suficientes para clasificar a una mujer en la cohorte como preecláptica o normal. La inclusión de los niveles séricos de Meteorin en primer trimestre aumentó significativamente la sensibilidad en la clasificación, ya que el árbol de decisión sin los niveles séricos de Meteorin presentó una sensibilidad de 56%, comparado con 69% de sensibilidad al incluirlos. Estos resultados, sugieren un posible papel de Meteorin como biomarcador temprano para el desarrollo de preeclampsia y, por lo tanto, como predictor del desarrollo de la enfermedad. Predecir este desenlace adverso puede permitirle al personal de salud seleccionar un grupo de gestantes con alto riesgo que requieren vigilancia y manejo especial para tratar de disminuir el riesgo. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios que permitan dilucidar los mecanismos moleculares asociados a dicha función.

Por otro lado, el tejido adiposo como un órgano endocrino secreta diferentes adipoquinas las cuales tienen una amplia actividad sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos y están implicadas en la patogénesis de la resistencia a la insulina, la diabetes, el síndrome metabólico y la aterosclerosis. Las sustancias como leptina y adiponectina secretadas por el adipocito son verdaderas adipoquinas comparadas con aquellas secretadas por fracciones no-adipocito del tejido adiposo, como es el caso de TNF- α (192). Muchos estudios han descrito la presencia y la función de diferentes adipoquinas y sus receptores en los tractos reproductivos masculino y femenino de diferentes especies incluyendo la humana. Estas adipoquinas regulan la esteoridogénesis ovárica, la maduración del oocito y el desarrollo embrionario y también están presentes en el útero y en la placenta (193).

En este contexto, adiponectina es una adipoquina conocida por su función en la regulación de la homeostasis energética. Más precisamente, adiponectina es descrita como una molécula que tiene propiedades antidiabéticas, antiaterogénicas,

antiinflamatorias y angiogénicas. Se ha propuesto recientemente su función en el control de la función reproductiva. Además, adiponectina podría ser una señal que indique un estado nutricional adecuado para la función reproductiva (194). En la placenta, adiponectina ha sido identificada en la unidad materno-fetal durante el proceso de remodelamiento de las arterias espirales uterinas. Así mismo, se ha demostrado que los trofoblastos de primer trimestre expresan AdipoR1 y AdipoR2, receptores a través de los cuales adiponectina actuaría sobre la función placentaria (195).

Por otra parte, Omentin es una proteína de 34kDa también denominada Intelectin, la cual fue descrita inicialmente en células de Paneth y posteriormente en tejido adiposo visceral, pero no en tejido adiposo subcutáneo. Existen dos isoformas de Omentin, Omentin-1 y Omentin-2 y estas comparten una identidad de 82% en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, Omentin-1 constituye la mayor isoforma circulante en el plasma. La expresión de Omentin-1 ha sido descrita en corazón, pulmón, ovario y placenta. Como ocurre con adiponectina, los niveles de Omentin-1, se asocian negativamente con área grasa visceral y niveles bajos son relacionados con obesidad, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular (192).

En el periodo gestacional temprano, la acreción de tejido adiposo en la madre se debe a un incremento en la síntesis de lípidos y a la hiperfagia. En contraste, hacia el último trimestre la acumulación de grasa se detiene debido al descenso en la actividad de la proteína lipasa en el tejido adiposo (196). Estos cambios metabólicos obedecen a la necesidad de suplir los requerimientos energéticos y nutricionales que demanda el desarrollo y mantenimiento fetales, así como la lactancia. En este contexto, la placenta y el tejido adiposo, juegan un papel fundamental en el establecimiento de las condiciones metabólicas necesarias que den lugar a un buen desenlace materno-fetal (195). Recientemente se ha reportado la inmunoreactividad de Omentin-1 en sincitiotrofoblastos y células endoteliales de placenta humana (197). Además, se ha establecido una diferencia significativa en los niveles plasmáticos de Omentin-1 durante el ciclo menstrual regular y en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico, lo que sugiere una posible función reguladora de esta adipocitoquina sobre las hormonas que regulan la función ovárica y la menstruación (193).

Teniendo en la cuenta el perfil de Omentin-1 como una adipocitoquina sensibilizadora a la acción de la insulina y de las posibles implicaciones que su regulación puede ejercer durante la gestación, en el presente estudio se analizó el perfil sérico de Omentin-1, en la cohorte de gestantes sanas durante primero, segundo y tercer trimestres de gestación. Así mismo, se estudió el perfil de Omentin-1 en mujeres no gestantes jóvenes en las fases folicular y lútea del ciclo menstrual. Adicionalmente, se identificó el patrón de inmunoreactividad en placenta humana de tercer trimestre observando inmunoreactividad en sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y células endoteliales del tallo vellosos.

En el presente estudio se identificó un patrón sérico descendente, siendo el primer trimestre la etapa gestacional que muestra los mayores niveles de Omentin-1, en comparación con el segundo y el tercer trimestres; sin embargo, esta variación no fue estadísticamente significativa. Así mismo, se observó una leve disminución al inicio de la gestación, al comparar los niveles circulantes de Omentin-1 en el grupo de mujeres no gestantes con el grupo de primero, segundo y tercer trimestres, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en los dos últimos ($p = 0.022$ y $p = 0.040$, respectivamente). Este patrón es similar al observado en adipocitoquinas sensibilizantes de la acción de la insulina como la adiponectina (43).

Los resultados coinciden con lo reportado previamente por Barker *et al.*, en una cohorte transversal de mujeres gestantes sanas y con diabetes gestacional durante el primero segundo trimestres y a las siete semanas posparto (197). Estos autores observaron mayores niveles de Omentin-1 hacia el primer trimestre en comparación con el segundo trimestre y el posparto. Los resultados del presente estudio sugieren un aporte significativo a los niveles maternos de Omentin-1 posiblemente por parte de la placenta y el tejido adiposo visceral, dado el grado de acumulación adiposa que se alcanza durante la gestación temprana. Así mismo, una disminución en la expresión de Omentin-1 en placenta humana, está asociada con obesidad materna preexistente; esta alteración puede influir en el desarrollo de desórdenes metabólicos en la descendencia en la vida adulta (193).

Con respecto al patrón sérico, en el caso de la acción de adiponectina se plantea que a partir de la segunda mitad de la gestación, el cual es un periodo gestacional caracterizado por un crecimiento fetal acelerado y tomando en consideración que

adiponectina ha mostrado impedir el transporte transplacentario de aminoácidos mediado por la insulina, un patrón sérico materno con niveles constantes de adiponectina, podrían poner en riesgo el desarrollo fetal. Por esta razón es posible hipotetizar que durante la gestación, el descenso en los niveles adiponectina contribuye a la pérdida de la sensibilidad a la insulina y por otra parte, esto podría prevenir una excesiva transferencia transplacentaria de nutrientes en aquellas gestaciones caracterizadas por una excesiva resistencia a la insulina (195).

Sin embargo, tanto para adiponectina como para Omentin-1, se ha observado un incremento en los niveles circulantes en sangre de cordón umbilical, con respecto a la concentración materna (118,198), así como mayores niveles en sangre de cordón de neonatos grandes para la edad gestacional en comparación del grupo control (199,200), lo cual sugeriría una mayor participación del feto en la regulación del metabolismo durante la etapa final de la gestación, dado que los niveles de adiponectina solo fueron detectados posterior a la semana 31 de gestación. Se requieren estudios funcionales que contribuyan a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a los hallazgos antes expuestos.

13. Conclusiones

13.1. Conclusiones primer capítulo estudio mRNA

1. El presente estudio constituye el primer análisis del transcriptoma a nivel de mRNA y miRNA en placenta de rata, en diferentes edades gestacionales y en condición nutricional *ad libitum* y con restricción del 35% en la ingesta descrito a la fecha.
2. La placenta muestra un patrón transcripcional dinámico y propio de cada edad gestacional analizada.
3. En el presente estudio se describió por primera vez el perfil sérico de Omentin-1 a través de la gestación, en modelo de rata.

4. Omentin-1 y Nesfatin-1 mostraron perfiles de expresión y sérico similares al observado en adipocitoquinas sensibilizantes a la insulina como adiponectina.
5. En el presente estudio se describió por primera vez el perfil sérico de Chemerin a través de la gestación, en modelo de rata
6. Chemerin muestra un patrón que podría asociarse a una condición tolerogénica en el microambiente placentario hacia los 16 días de gestación.
7. Este es el primer reporte del perfil de expresión del sistema Bdnf/TrkB en placenta de rata en diferentes edades gestacionales.
8. Bdnf mostró los niveles séricos más bajos hacia el inicio de la gestación, posiblemente debido al estado anabólico.
9. Bdnf mostró un patrón no concordante en cuanto al perfil de expresión a nivel de mRNA y la proteína, similares hallazgos habían sido descritos en otros contextos celulares.
10. La placenta posiblemente no sea la principal fuente de expresión y secreción de Irisin circulante, estando probablemente a cargo de tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo durante la gestación.

13.2. Conclusiones primer capítulo estudio miRNAs

1. El presente estudio constituye el primer análisis del transcriptoma a nivel de miRNA en placenta de rata, documentado a la fecha.
2. Se identificaron perfiles de expresión únicos que integran grupos de miRNAs, con posibles características funcionales similares o compartidas.
3. Se describió por primera la presencia de redes de co- expresión génica en placenta de rata.
4. Se describió por primera vez una posible interacción entre miRNAs y genes blanco predichos, de acuerdo con los coeficientes de correlación de Pearson.

5. Es necesaria la confirmación experimental de los resultados obtenidos en el presente estudio, con el fin de validar la utilidad biológica en el modelo de estudio y su posible extrapolación hacia la fisiología de la gestación humana.

13.3. Conclusiones segundo capítulo

1. Se describió por primera vez el perfil sérico de Chemerin a través de la gestación humana.
2. Los niveles séricos de Chemerin disminuyen al inicio de la gestación e incrementan conforme avanza, posiblemente en relación con el estado proinflamatorio característico del final de la gestación.
3. Los niveles séricos de BDNF mostraron una variación que coincide con el perfil de leptina durante la gestación.
4. Se observó una disminución en los niveles séricos de Irisin en segundo y en tercer trimestre en el grupo de mujeres preeclámpicas, en comparación con el grupo de mujeres gestantes sanas. El seguimiento de los niveles séricos de Irisin podrían constituir una herramienta diagnóstica de utilidad clínica.
5. Se describió por primera vez la expresión de la proteína Irisin en placenta humana en los periodos gestacionales analizados.
6. También por primera vez se describió un incremento en los niveles circulantes de Irisin durante la fase lútea del ciclo menstrual y a través de la gestación.
7. Se observó una disminución en los niveles séricos de Folistatin en el grupo de mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia, sugiriendo su importancia como un posible biomarcador de la patología.
8. En el presente estudio por primera vez se reportó la inmunoreactividad de Meteorin en placenta humana.
9. Se observaron niveles más altos de Meteorin en el primer periodo de la gestación, obteniendo diferencias significativas al comparar el grupo de mujeres no gestantes, con gestantes en el segundo y tercer periodos de la gestación y con el grupo de gestantes con preeclampsia.

10. Se formulo un árbol de decisión en el cual incluyendo variables de estudio como peso en la gestación media, presión arterial sistólica en la gestación media y los niveles de Meteorin, se obtuvo una sensibilidad del 69%, en la clasificación de mujeres con PE.
11. En el perfil sérico de Omentin-1 durante la gestación, en el presente estudio se identificó un patrón sérico descendente similar al observado en adipocitoquinas sensibilizadores de la acción de la insulina como es el caso de la adiponectina.
12. BDNF y Omentin-1 mostraron perfiles séricos concordantes entre el modelo animal de rata en las edades gestacionales estudiadas y la cohorte longitudinal de mujeres gestantes, analizada.

14. Lista de Anexos

14.1. Publicaciones generadas a partir del desarrollo del presente trabajo

Anexo 1. Garces MF, Sanchez E, Acosta BJ, Angel E, Ruíz AI, Rubio-Romero JA, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. ***Expression and regulation of chemerin during rat pregnancy.*** Placenta. 2012 May;33(5):373-8. doi: 10.1016/j.placenta.2012.02.007.

Anexo 2. Garces MF, Sanchez E, Ruíz-Parra AI, Rubio-Romero JA, Angel-Müller E, Suarez MA, Bohórquez LF, Bravo SB, Nogueiras R, Diéguez C, Caminos JE. ***Serum chemerin levels during normal human pregnancy.*** Peptides. 2013 Apr;42:138-43. doi: 10.1016/j.peptides.2013.01.003.

Anexo 3. Garcés MF, Sanchez E, Torres-Sierra AL, Ruíz-Parra AI, Angel-Müller E, Alzate JP, Sánchez ÁY, Gomez MA, Romero XC, Castañeda ZE, Sanchez-Rebordelo E, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. ***Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species.*** Clin Endocrinol (Oxf). 2014 Jul;81(1):141-51. doi: 10.1111/cen.12391.

Anexo 4. Garcés MF, Peralta JJ, Ruiz-Linares CE, Lozano AR, Poveda NE, Torres-Sierra AL, Eslava-Schmalbach JH, Alzate JP, Sánchez AY, Sanchez E, Angel-Müller E, Ruíz-Parra AI, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. ***Irisin levels during pregnancy and changes associated with the development of preeclampsia.*** J Clin Endocrinol Metab. 2014 Jun;99(6):2113-9. doi: 10.1210/jc.2013-4127.

Anexo 5. Garcés MF, Poveda NE, Sanchez E, Sánchez ÁY, Bravo SB, Vázquez MJ, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. ***Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy.*** Physiol Behav. 2014 Jun 22;133:216-22. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.042.

Anexo 6. Garcés MF, Vallejo SA, Sanchez E, Palomino-Palomino MA, Leal LG, Ángel-Muller E, Díaz-Cruz LA, Ruíz-Parra AI, González-Clavijo AM, Castaño JP, Abba M, Lacunza E, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. *Longitudinal analysis of maternal serum Follistatin concentration in normal pregnancy and preeclampsia*. Clin Endocrinol (Oxf). 2015 Aug;83(2):229-35. doi: 10.1111/cen.12715.

Anexo 7. Garcés MF, Sanchez E, Cardona LF, Simanca EL, González I, Leal LG, Mora JA, Bedoya A, Alzate JP, Sánchez ÁY, Eslava-Schmalbach JH, Franco-Vega R, Parra MO, Ruíz-Parra AI, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. *Maternal Serum Meteorin Levels and the Risk of Preeclampsia*. PLoS One. 2015 Jun 29;10(6):e0131013. doi: 10.1371/journal.pone.0131013.

Anexo 8. Garcés MF, Ruíz-Linares CE, Vallejo SA, Peralta JJ, Sanchez E, Ortiz-Rovira A, Curtidor Y, Parra MO, Leal LG, Alzate JP, Acosta BJ, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. *Maternal serum omentin-1 profile is similar in humans and in the rat animal model*. Cytokine. 2015 Sep;75(1):136-41. doi: 10.1016/j.cyto.2015.06.014.

14.2. Ponencia en Congresos- Modalidad poster

Anexo 9. Garcés MF, Sanchez E, Acosta BJ, Angel E, Ruíz AI, Rubio-Romero JA, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. Expresión y Regulación de Chemerin Durante el Embarazo de Rata y en Placenta Humana. XXVIII Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia – FECOLSOG 16 - 19 Mayo 2012 - Cartagena, Colombia.

Anexo 10. M Garces, E Sanchez, B Acosta, E Angel, A Ruíz, J Rubio-Romero, C Diéguez, R Nogueiras, JE Caminos. Expression and regulation of chemerin during rat pregnancy. Topic: Placental and perinatal physiology. FEPS Congress. Santiago de Compostela, España. September 8-11, 2012.

Anexo 11. Jorge Eduardo Caminos Pinzón, Maria Fernanda Garcés Gutierrez, Jhon Peralta, Carlos Eduardo Ruiz-Linares, Natalia Elvira Poveda Reyes, Javier Eslava-

Schmalbach, Angel Yobany Sánchez, Edith Angel-Müller, Carlos Dieguez, Rubén Nogueiras. Niveles Séricos de Irisina Durante la Gestación y Cambios Asociados con el Desarrollo de Preeclampsia. 56 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN). 21 al 23 de mayo de 2014 en Valencia- España.

Anexo 12. Maria Fernanda Garces, Carlos E. Ruíz-Linares, Alexsandra Ortiz-Rivera, Mario O. Parra, Juan P. Alzate, Elizabeth Sanchez, Carlos Dieguez, Rubén Nogueiras and Jorge Eduardo Caminos. Serum Omentin-1 Levels Decreases during Pregnancy in Humans and Rat. ICE/ENDO 2014. 21-24 de junio de 2014. Chicago, Illinois.US.

Anexo 13. Maria Fernanda Garces, Natalia E. Poveda, Elizabeth Sanchez, Ángel Y. Sánchez, Susana B. Bravo, María J. Vázquez, Carlos Dieguez, Rubén Nogueiras, and Jorge Eduardo Caminos. Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout Rat Pregnancy. ICE/ENDO 2014. 21-24 de junio de 2014. Chicago, Illinois. US.

Anexo 14. Maria Fernanda Garces, Elizabeth Sanchez, Luisa F Cardona, Elkin L Simanca, Iván González, Luis G Leal, José A Mora, Andrés Bedoya, Juan P. Alzate, Ángel Y. Sánchez, Javier H Eslava-Schmalbach, Roberto Franco-Vega, Mario O. Parra, Ariel I. Ruíz-Parra, Carlos Diéguez, Rubén Nogueiras and Jorge Eduardo Caminos. Maternal Serum Meteorin Levels during Normal Pregnancy and Preeclampsia. The Endocrine Society (ENDO) – 2015. Marzo 5-8 de 2015. San Diego – California. US.

14.3.Ponencia oral en Congresos

Anexo 15. Maria Fernanda Garcés Gutierrez, Elizabeth Sanchez Serna, Ariel Iván Ruiz, Edith Angel-Müller, Juan Pablo Alzate, Angel Yobany Sánchez, Estrella Sanchez-Rebordelo, Carlos Dieguez, Rubén Nogueiras, Jorge Eduardo Caminos Pinzón. La Expresión de Bdnf en Placenta de Rata y Humana y sus Niveles Séricos son Similarmente Regulados a Través de la Gestación en Ambas Especies. *Presentación Oral*. 56 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN). 21 al 23 de mayo de 2014 en Valencia- España.

15. Referencias

1. Shankar K, Zhong Y, Kang P, Blackburn ML, Soares MJ, Badger TM, et al. RNA-seq analysis of the functional compartments within the rat placentation site. *Endocrinology*. 2012;153:1999–2011.
2. Myatt L, Roberts JM. Preeclampsia: Syndrome or Disease? *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(11):83.
3. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol*. Annual Reviews; 2015 Jan; 13;31:523–52.
4. Mess A, Carter AM. Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Dec;148(4):769–79.
5. Wagner GP, Kin K, Muglia L, Pavlicev M. Evolution of mammalian pregnancy and the origin of the decidual stromal cell. *Int J Dev Biol*. 2014 Jan;58(2-4):117–26.
6. Carter AM, Pijnenborg R. Evolution of invasive placentation with special reference to non-human primates. *Best Pr Res Clin Obs Gynaecol*; 2011;25:249–57.
7. Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol*. 2014 Apr;27(1):11–8.
8. Capellini I, Venditti C, Barton RA. Placentation and maternal investment in mammals. *Am Nat*. 2011 Jan;177(1):86–98.
9. Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T, Renaud SJ. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*. 2012;33:233–43.
10. Swanson AM, David AL. Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta*. 2015 Jun 36(6):623–30.
11. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. *Reprod Biol*. 2012;12:97–118.
12. Knott JG, Paul S. Transcriptional regulators of the trophoblast lineage in mammals with hemochorial placentation. *Reproduction*. 2014 Dec;148(6):R121–36.
13. Gray LE, Wilson V, Noriega N, Lambright C, Furr J, Stoker TE, et al. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *ILAR J*. 2004 Jan;45(4):425–37.

-
14. Reviews CT. e-Study Guide for: An Introduction to Behavioral Endocrinology by Randy J. Nelson, ISBN 9780878936205: Biology, Zoology. Cram101; 2014. 58 p.
 15. Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR, Milne CM. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J Endocrinol.* 1987 Jun;113(3):435–44.
 16. Buck Louis GM, Grewal J, Albert PS, Sciscione A, Wing DA, Grobman WA, et al. Racial/ethnic standards for fetal growth: the NICHD Fetal Growth Studies. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Oct;213(4):449.e1–449.e41.
 17. Huizinga CT, Engelbregt MJT, Rekers-Mombarg LTM, Vaessen SFC, Delemarre-van de Waal HA, Fodor M. Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction - animal models for growth retardation. *Horm Res.* 2004 Jan;62(5):233–40.
 18. COUNCIL EPANDOF THE. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposesText with EEA relevance - LexUriServ.do.
 19. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytán F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology.* 2003 Apr;144(4):1594–602.
 20. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology.* 2001;142:788–94.
 21. Hida K, Wada J, Zhang H, Hiragushi K, Tsuchiyama Y, Shikata K, et al. Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. *J Lipid Res.* 2000 Oct;41(10):1615–22.
 22. Ren S, Peng Z, Mao JH, Yu Y, Yin C, Gao X, et al. RNA-seq analysis of prostate cancer in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings. *Cell Res.* 2013;23:732.
 23. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Team G. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010;11:R86.

24. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Team RDC, editor; 2011.
25. Optimal Calculation of RNA-Seq Fold-Change Values. <http://bioinfo.aizeonpublishers.net/content/2013/6/bioinfo285-292.pdf>
26. Gibbons FD, Roth FP. Judging the quality of gene expression-based clustering methods using gene annotation. *Genome Res.* 2002 Oct;12(10):1574–81.
27. Datta S, Datta S. Methods for evaluating clustering algorithms for gene expression data using a reference set of functional classes. *BMC Bioinformatics.* 2006 Jan;7:397.
28. clValid, an R package for cluster validation. <https://cran.r-project.org/web/packages/clValid/vignettes/clValid.pdf>
29. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Rodriguez A, Trelles O, Carazo JM, Pascual-Montano A. Integrated analysis of gene expression by Association Rules Discovery. *BMC Bioinformatics.* 2006 Jan;7(1):54.
30. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008 Jan;3(6):1101–8.
31. Garces MF, Sanchez E, Acosta BJ, Angel E, Ruíz AI, Rubio-Romero JA, et al. Expression and regulation of chemerin during rat pregnancy. *Placenta.* 2012;33:373–8.
32. Garcés MF, Poveda NE, Sanchez E, Sánchez ÁY, Bravo SB, Vázquez MJ, et al. Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy. *Physiol Behav.* 2014 Jun 22;133:216–22.
33. Garcés MF, Sanchez E, Torres-Sierra AL, Ruíz-Parra AI, Angel-Müller E, Alzate JP, et al. Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 Jul;81(1):141-51
34. Garcés MF, Ruíz-Linares CE, Vallejo SA, Peralta JJ, Sanchez E, Ortiz-Rovira A, et al. Maternal serum omentin-1 profile is similar in humans and in the rat animal model. *Cytokine.* 2015 Sep;75(1):136–41.
35. Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jul;83(7):2545–53.

36. Fuglsang J. Ghrelin in pregnancy and lactation. *Vitam Horm.* 2008 Jan;77:259–84.
37. Mayeur S, Silhol M, Moitrot E, Barbaux S, Breton C, Gabory A, et al. Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human. *Placenta.* 2010 Sep;31(9):785–91.
38. Campos DB, Palin M-F, Bordignon V, Murphy BD. The “beneficial” adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes (Lond).* 2008 Feb;32(2):223–31.
39. Reverchon M, Ramé C, Bertoldo M, Dupont J. Adipokines and the female reproductive tract. *Int J Endocrinol.* 2014 Jan;2014:232454.
40. Katsi V, Vamvakou G, Lekakis J, Tousoulis D, Stefanadis C, Makris T, et al. Omentin, fat and heart: classical music with new instruments. *Heart Lung Circ.* 2014 Sep;23(9):802–6.
41. Smitka K, Marešová D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague Med Rep.* 2015 Jan;116(2):87–111.
42. Ozias MK, Li S, Hull HR, Brooks WM, Carlson SE. Relationship of circulating adipokines to body composition in pregnant women. *Adipocyte.* 4(1):44–9.
43. Svensson H, Wetterling L, Bosaeus M, Odén B, Odén A, Jennische E, et al. Body fat mass and the proportion of very large adipocytes in pregnant women are associated with gestational insulin resistance. *Int J Obes (Lond).* 2016 Apr;40(4):646-53.
44. Gonzalez R, Mohan H, Unniappan S. Nucleobindins: bioactive precursor proteins encoding putative endocrine factors? *Gen Comp Endocrinol.* 2012 May 1;176(3):341–6.
45. Stengel A. Nesfatin-1 - More than a food intake regulatory peptide. *Peptides.* 2015 Oct;72:175–83.
46. Ayada C, Toru Ü, Korkut Y. Nesfatin-1 and its effects on different systems. *Hippokratia.* 2015 Jan-Mar;19(1):4-10
47. Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A. et al. Paraventricular NUCB2/nesfatin1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 24;456(4):913-8.
48. Szczepankiewicz D, Pruszyńska-Oszmałek E, Kaczmarek P, Skrzypski M,

- Andrałojć K, Wojciechowicz T, et al. Changes of agouti-related protein in hypothalamus, placenta, and serum during pregnancy in the rat. *J Endocrinol*. 2009 Jul;202(1):35–41.
49. Caminos JE, Bravo SB, González CR, Garcés MF, Cepeda LA, González AC, et al. Food-intake-regulating-neuropeptides are expressed and regulated through pregnancy and following food restriction in rat placenta. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008 Jan;6:14.
50. Neves KB, Nguyen Dinh Cat A, Lopes RAM, Rios FJ, Anagnostopoulou A, Lobato NS, et al. Chemerin Regulates Crosstalk Between Adipocytes and Vascular Cells Through Nox. *Hypertension*. 2015 Sep;66(3):657–66.
51. Fatima SS, Rehman R, Baig M, Khan TA. New roles of the multidimensional adipokine: chemerin. *Peptides*. 2014 Dec;62:15–20.
52. Mariani F, Roncucci L. Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. *Inflamm Res*. 2015 Feb;64(2):85–95.
53. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Racicot K, Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Aug;72(2):141–7.
54. Racicot K, Kwon J-Y, Aldo P, Silasi M, Mor G. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Aug;72(2):107–16.
55. La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol Lett*. 2014 Nov;162(1 Pt A):41–8.
56. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. 2012 Jan;846:1–12.
57. Rios M. Neurotrophins and the regulation of energy balance and body weight. *Handb Exp Pharmacol*. 2014 Jan;220:283–307.
58. Vanevski F, Xu B. Molecular and neural bases underlying roles of BDNF in the control of body weight. *Front Neurosci*. 2013 Jan;7:37.
59. Takei N, Furukawa K, Hanyu O, Sone H, Nawa H. A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake. *Front Psychol*. 2014 Jan;5:1093.
60. Weissgerber TL, Wolfe LA. Physiological adaptation in early human pregnancy: adaptation to balance maternal-fetal demands. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr métabolisme*. 2006 Feb;31(1):1–11.
61. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship

- between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep.* 2015 Jan;5:10775.
62. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009 Dec 17;583(24):3966–73.
 63. Musazzi L, Cattaneo A, Tardito D, Barbon A, Gennarelli M, Barlati S, et al. Early raise of BDNF in hippocampus suggests induction of posttranscriptional mechanisms by antidepressants. *BMC Neurosci.* 2009 Jan;10:48.
 64. Su M, Hong J, Zhao Y, Liu S, Xue X. MeCP2 controls hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression via homeostatic interactions with microRNA-132 in rats with depression. *Mol Med Rep.* 2015 Oct;12(4):5399–406.
 65. Yang X, Yang Q, Wang X, Luo C, Wan Y, Li J, et al. MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-206 is a critical novel gene for the expression of BDNF induced by ketamine. *Neuromolecular Med.* 2014 Sep;16(3):594–605.
 66. Rieger DK, Cunha RMS, Lopes MW, Costa AP, Budni J, Rodrigues ALS, et al. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. *J Mol Recognit.* 2014 Dec;27(12):746–54.
 67. Kawamura K, Kawamura N, Sato W, Fukuda J, Kumagai J, Tanaka T. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology.* 2009 Aug;150(8):3774–82.
 68. Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol.* 2013 Jul;3(3):1337–62.
 69. Eckardt K, Görgens SW, Raschke S, Eckel J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2014 Jun;57(6):1087–99.
 70. Gamas L, Matafome P, Seiça R. Irisin and Myonectin Regulation in the Insulin Resistant Muscle: Implications to Adipose Tissue: Muscle Crosstalk. *J Diabetes Res.* 2015 Jan;2015:359159.
 71. Chen N, Li Q, Liu J, Jia S. Irisin, an exercise-induced myokine as a metabolic regulator: an updated narrative review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016

- Jan;32(1):51–9.
72. Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, Donelan W, Zhao Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes*. 2014 Feb;63(2):514–25.
 73. Quinn LS, Anderson BG, Conner JD, Wolden-Hanson T. Circulating irisin levels and muscle FNDC5 mRNA expression are independent of IL-15 levels in mice. *Endocrine*. 2015 Nov;50(2):368–77.
 74. Cox B, Leavey K, Nosi U, Wong F, Kingdom J. Placental transcriptome in development and pathology: expression, function, and methods of analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S138–51.
 75. Iwakawa H, Tomari Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*. 2015 Nov;25(11):651–65.
 76. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Jan;4:e252.
 77. Mouillet J-F, Ouyang Y, Coyne CB, Sadovsky Y. MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S163–72.
 78. Lycoudi A, Mavreli D, Mavrou A, Papantoniou N, Kolialexi A. miRNAs in pregnancy-related complications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015 Jan;15(8):999–1010.
 79. Sadovsky Y, Mouillet J-F, Ouyang Y, Bayer A, Coyne CB. The Function of TrophomiRs and Other MicroRNAs in the Human Placenta. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Aug;5(8):a023036.
 80. Vaswani K, Hum MW-C, Chan H-W, Ryan J, Wood-Bradley RJ, Nitert MD, et al. The effect of gestational age on angiogenic gene expression in the rat placenta. *PLoS One*. 2013 Jan;8(12):e83762.
 81. Saben J, Kang P, Zhong Y, Thakali KM, Gomez-Acevedo H, Borengasser SJ, et al. RNA-seq analysis of the rat placentation site reveals maternal obesity-associated changes in placental and offspring thyroid hormone signaling. *Placenta*. 2014 Dec;35(12):1013–20.
 82. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://softlibre.unizar.es/manuales/aplicaciones/r/fullrefman.pdf>
 83. Gentleman R, Carey V, Bates D. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80

-
84. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* BioMed Central Ltd; 2010 Jan;11(10):R106.
 85. Anders S, Huber W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level – the DESeq package. Heidelberg, Germany; 2013.
 86. Daxin Jiang CT and AZ. Cluster Analysis for Gene Expression Data: A Survey. *Knowl Data Eng IEEE Trans.* 2004;16(11):1370–86.
 87. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar;96(6):2907–12.
 88. Datta S, Datta S. Methods for evaluating clustering algorithms for gene expression data using a reference set of functional classes. *BMC Bioinformatics.* 2006 Jan;7:397.
 89. Brock GN, Mukhopadhyay P, Pihur V, Webb C, Greene RM, Pisano MM. MmPalateMiRNA, an R package compendium illustrating analysis of miRNA microarray data. *Source Code Biol Med.* 2013 Jan;8(1):1.
 90. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* 2006 Jan;411:134–93.
 91. Howe EA, Sinha R, Schlauch D, Quackenbush J. RNA-Seq analysis in MeV. *Bioinformatics.* 2011 Nov 15;27(22):3209–10.
 92. Herrero J, Valencia A, Dopazo J. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics.* 2001 Feb;17(2):126–36.
 93. Butte AJ, Tamayo P, Slonim D, Golub TR, Kohane IS. Discovering functional relationships between RNA expression and chemotherapeutic susceptibility using relevance networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 24;97(22):12182–6.
 94. Wang X, El Naqa IM. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics.* 2008 Feb;24(3):325–32.
 95. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *Rna.* 2008;14(6):1012–7.
 96. Giles CB, Giriya-Devi R, Dozmorov MG, Wren JD. mirCoX: a database of miRNA-

- mRNA expression correlations derived from RNA-seq meta-analysis. *BMC Bioinformatics*. BioMed Central Ltd; 2013 Jan;14 Suppl 1(Suppl 14):S17.
97. Ringnér M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol*. 2008 Mar;26(3):303–4.
 98. Raychaudhuri S, Stuart JM, Altman RB. Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput*. 2000 Jan;455–66.
 99. D'haeseleer P. How does gene expression clustering work? *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group; 2005 Dec;23(12):1499–501.
 100. Yu H, Luscombe NM, Qian J, Gerstein M. Genomic analysis of gene expression relationships in transcriptional regulatory networks. *Trends Genet*. 2003 Aug;19(8):422–7.
 101. Zeger GPESGRAISL. *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software*. Springer Science & Business Media; 2006. 456 p. <https://books.google.com/books?id=ROPIBwAAQBAJ&pgis=1>
 102. Heindel JJ, Vandenberg LN. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. *Curr Opin Pediatr*. 2015 Apr;27(2):248–53.
 103. Gowland RL. Entangled lives: Implications of the developmental origins of health and disease hypothesis for bioarchaeology and the life course. *Am J Phys Anthropol*. 2015 Dec;158(4):530–40.
 104. Marsit CJ. Placental Epigenetics in Children's Environmental Health. *Semin Reprod Med*. 2016 Jan;34(1):36–41.
 105. Dimasuay KG, Boeuf P, Powell TL, Jansson T. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Front Physiol*. 2016 Jan;7:12.
 106. Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Aug 20;5(10).
 107. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S115–22.
 108. Zhong Y, Zhu F, Ding Y. Serum screening in first trimester to predict preeclampsia, small for gestational age and preterm delivery: systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. BioMed Central; 2015 Jan 25;15(1):191.
 109. Boletín Epidemiológico Semanal (BES). Semana epidemiológica 09 de 2016.

- Dirección de vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud de Colombia. <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/BoletnEpidemiolgico/2016Bolet%C3%ADnEpidemiol%C3%B3gicoSemana9.pdf>
110. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013 Nov;122(5):1122–31.
 111. F. Gary Cunningham, James M. Roberts RNT. Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy.* Elsevier; 2015. 25-36 p.
 112. Manual para obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en salud pública. Subdirección Red Nacional de Laboratorios. Instituto Nacional de Salud. República de Colombia. 2011. <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/exámenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/SiteAssets/Manualobtencionyenvio demuuestras de EISP.pdf>
 113. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004 Jun;27(6):1487–95.
 114. Rouen PA, Lukacs JL, Reame NE. Adipokine concentrations in nonobese women: a study of reproductive aging, body mass index, and menstrual cycle effects. *Biol Res Nurs.* 2010 Jul;12(1):54–61.
 115. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008 Jan;21(1):9–23.
 116. Ahl S, Guenther M, Zhao S, James R, Marks J, Szabo A, et al. Adiponectin Levels Differentiate Metabolically Healthy vs Unhealthy Among Obese and Nonobese White Individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Nov;100(11):4172–80.
 117. Garces MF, Sanchez E, Ruíz-Parra AI, Rubio-Romero JA, Angel-Müller E, Suarez MA, et al. Serum chemerin levels during normal human pregnancy. *Peptides.* 2013;42C:138–43.
 118. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, et al. Maternal

- and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Mar;66(3):447–53.
119. Ian H. Witten, Eibe Frank, Len Trigg, Mark Hall, Geoffrey Holmes and SJC. *Weka: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Publ Waikato Univ. 1999.
 120. Quinlan JR. *C4.5: Programs for Machine Learning* [Internet]. Morgan Kaufmann; 1993. 302 p.
 121. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1993 Apr;39(4):561–77.
 122. Wild R, Weedin EA, Wilson D. Dyslipidemia in Pregnancy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016 Mar;45(1):55–63.
 123. Liu SF, Wang ZX, Yuan YE, Bing SM, Zhang BZ, Wu JZ, et al. Hormone changes during the menstrual cycle of Chinese women. *J Reprod Fertil*. 1986 Jan;76(1):43–52.
 124. Garcés MF, Peralta JJ, Ruiz-Linares CE, Lozano AR, Poveda NE, Torres-Sierra AL, et al. Irisin levels during pregnancy and changes associated with the development of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jun;99(6):2113–9.
 125. Garcés MF, Sanchez E, Cardona LF, Simanca EL, González I, Leal LG, et al. Maternal Serum Meteorin Levels and the Risk of Preeclampsia. *PLoS One*. 2015 Jan;10(6):e0131013.
 126. Garcés MF, Vallejo SA, Sanchez E, Palomino-Palomino MA, Leal LG, Ángel-Muller E, et al. Longitudinal analysis of maternal serum Follistatin concentration in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015 Aug;83(2):229–35.
 127. Kasher-Meron M, Mazaki-Tovi S, Barhod E, Hemi R, Haas J, Gat I, et al. Chemerin concentrations in maternal and fetal compartments: implications for metabolic adaptations to normal human pregnancy. *J Perinat Med*. 2014 May;42(3):371–8.
 128. Li X-M, Ji H, Li C-J, Wang P-H, Yu P, Yu D-M. Chemerin expression in Chinese pregnant women with and without gestational diabetes mellitus. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2015 Feb;76(1):19–24.
 129. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, et al. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Aug;94(8):3085–8.

-
130. Shin H-Y, Lee DC, Chu SH, Jeon JY, Lee MK, Im JA, et al. Chemerin levels are positively correlated with abdominal visceral fat accumulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Jul;77(1):47–50.
 131. Stepan H, Philipp A, Roth I, Kralisch S, Jank A, Schaarschmidt W, et al. Serum levels of the adipokine chemerin are increased in preeclampsia during and 6 months after pregnancy. *Regul Pept*. 2011 Jun 7;168(1-3):69–72.
 132. Yang S, Wang Q, Huang W, Song Y, Feng G, Zhou L, et al. Are serum chemerin levels different between obese and non-obese polycystic ovary syndrome women? *Gynecol Endocrinol*. 2016 Jan;32(1):38–41.
 133. Carlino C, Trotta E, Stabile H, Morrone S, Bulla R, Soriani A, et al. Chemerin regulates NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis in the decidua during early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Oct;97(10):3603–12.
 134. Xu B, Xie X. Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci*. 2016 May;17(5):282-92.
 135. Ramer I, Kruczek A, Doulaveris G, Orfanelli T, Shulman B, Witkin SS, et al. Reduced Circulating Concentration of Brain-derived Neurotrophic Factor is Associated with Peri- and Post-implantation Failure following In Vitro Fertilization-Embryo Transfer. *Am J Reprod Immunol*. 2016 Jan;75(1):36–41.
 136. Dhobale M V, Pisal HR, Mehendale SS, Joshi SR. Differential expression of human placental neurotrophic factors in preterm and term deliveries. *Int J Dev Neurosci*. 2013 Dec;31(8):719–23.
 137. Poveda NE, Garcés MF, Ruiz-Linares CE, Varón D, Valderrama S, Sanchez E, et al. Serum Adipsin Levels throughout Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Sci Rep*. 2016 Jan;6:20073.
 138. Bienertova-Vasku J, Bienert P, Zlamal F, Splichal Z, Tomandl J, Tomandlova M, et al. Brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in maternal plasma and umbilical cord blood from pre-eclamptic and physiological pregnancies. *J Obstet Gynaecol*. 2013 May;33(4):359–63.
 139. Oktem O, Dedeoğlu N, Oymak Y, Sezen D, Köksal L, Pekin T, et al. Maternal serum, amniotic fluid and cord leptin levels at term: their correlations with fetal weight. *J Perinat Med*. 2004 Jan;32(3):266–71.

140. Kodomari I, Wada E, Nakamura S, Wada K. Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. *Neurochem Int.* 2009 Feb;54(2):95–8.
141. Dos Santos E, Duval F, Vialard F, Dieudonné M-N. The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015 Oct;24(1):47–63.
142. Rodríguez A, Becerril S, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Frühbeck G. Cross-talk between adipokines and myokines in fat browning. *Acta Physiol (Oxf).* 2016 Apr 4.
143. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012 Jan 26;481(7382):463–8.
144. HomoloGene - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=fndc5>
145. Wu J, Spiegelman BM. Irisin ERKs the fat. *Diabetes.* 2014 Feb;63(2):381–3.
146. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, et al. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS One. Public Library of Science;* 2013 Jan;8(4):e60563.
147. Chen J, Huang Y, Gusdon AM, Qu S. Irisin: a new molecular marker and target in metabolic disorder. *Lipids Health Dis.* 2015 Jan;14:2.
148. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism.* 2012 Dec;61(12):1725–38.
149. Asimakopoulos B, Milousis A, Gioka T, Kabouromiti G, Gianisslis G, Troussa A, et al. Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle. *Endocr J.* 2009 Jan;56(3):425–33.
150. Ahrens K, Mumford SL, Schliep KC, Kissell KA, Perkins NJ, Wactawski-Wende J, et al. Serum leptin levels and reproductive function during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Mar;210(3):248.e1–9.
151. Fernández-Real JM, Gutierrez C, Vendrell J, Casamitjana R, Ricart W. Plasma soluble tumor necrosis factor- α receptors circulate in proportion to leptin levels during the menstrual cycle in lean but not in obese women. *Eur J Endocrinol.* 2000 Aug;143(2):235–41.
152. Geber S, Brandão AHF, Sampaio M. Effects of estradiol and FSH on leptin levels in women with suppressed pituitary. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012 Jan;10:45.

-
153. Bilbao MG, Di Yorio MP, Faletti AG. Different levels of leptin regulate different target enzymes involved in progesterone synthesis. *Fertil Steril*. 2013 Apr;99(5):1460–6.
 154. Atwood CS, Meethal SV. The Spatiotemporal Hormonal Orchestration of Human Folliculogenesis, Early Embryogenesis and Blastocyst Implantation. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jul 15;430:33-48.
 155. Sesti G, Andreozzi F, Fiorentino T V, Mannino GC, Sciacqua A, Marini MA, et al. High circulating irisin levels are associated with insulin resistance and vascular atherosclerosis in a cohort of nondiabetic adult subjects. *Acta Diabetol*. 2014 Oct;51(5):705–13.
 156. Zügel M, Qiu S, Laszlo R, Bosnyák E, Weigt C, Müller D, et al. The role of sex, adiposity, and gonadectomy in the regulation of irisin secretion. *Endocrine*. 2016 Apr 7.
 157. Sanchis-Gomar F, Alis R, Pareja-Galeano H, Sola E, Victor VM, Rocha M, et al. Circulating irisin levels are not correlated with BMI, age, and other biological parameters in obese and diabetic patients. *Endocrine*. 2014 Aug;46(3):674–7.
 158. Çağlar M, Göksu M, Isenlik BS, Yavuzcan A, Yılmaz M, Üstün Y, et al. Irisin in idiopathic foetal growth restriction. *J Endocrinol Invest*. 2014 Jul;37(7):619–24.
 159. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod*. 2006 Feb;74(2):218–29.
 160. Palacios-González B, Vadillo-Ortega F, Polo-Oteyza E, Sánchez T, Ancira-Moreno M, Romero-Hidalgo S, et al. Irisin levels before and after physical activity among school-age children with different BMI: a direct relation with leptin. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Apr;23(4):729–32.
 161. Erol O, Erkal N, Ellidağ HY, İsenlik BS, Aydın Ö, Derbent AU, et al. Irisin as an early marker for predicting gestational diabetes mellitus: a prospective study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016 Feb 26;1–6.
 162. Wijayarathna R, de Kretser DM. Activins in reproductive biology and beyond. *Hum Reprod Update*. 2016 Apr;22(3). pii: dmv058.
 163. de Kretser DM, O’Hehir RE, Hardy CL, Hedger MP. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Mol Cell Endocrinol*.

- 2012 Aug 15;359(1-2):101–6.
164. Walton KL, Makanji Y, Harrison CA. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012. p. 2–12.
 165. Manuelpillai U, Schneider-Kolsky M, Dole A, Wallace EM. Activin A and activin receptors in gestational tissue from preeclamptic pregnancies. *J Endocrinol*. 2001 Oct;171(1):57–64.
 166. Rae K, Hollebome K, Chetty V, Clausen D, McFarlane J. Follistatin serum concentrations during full-term labour in women--significant differences between spontaneous and induced labour. *Reproduction*. 2007 Nov;134(5):705–11.
 167. Brown ML, Bonomi L, Ungerleider N, Zina J, Kimura F, Mukherjee A, et al. Follistatin and follistatin like-3 differentially regulate adiposity and glucose homeostasis. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Oct;19(10):1940–9.
 168. Zhao C, Qiao C, Tang R-H, Jiang J, Li J, Martin CB, et al. Overcoming Insulin Insufficiency by Forced Follistatin Expression in β -cells of db/db Mice. *Mol Ther*. 2015 May;23(5):866–74.
 169. Mosler S, Geisler S, Hengevoss J, Schiffer T, Piechotta M, Adler M, et al. Modulation of follistatin and myostatin propeptide by anabolic steroids and gender. *Int J Sports Med*. 2013 Jul;34(7):567–72.
 170. Aitken RJ, Baker MA, Doncel GF, Matzuk MM, Mauck CK, Harper MJK. As the world grows: contraception in the 21st century. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1330–43.
 171. Craythorn RG, Winnall WR, Lederman F, Gold EJ, O'Connor AE, de Kretser DM, et al. Progesterone stimulates expression of follistatin splice variants Fst288 and Fst315 in the mouse uterus. *Reprod Biomed Online*. 2012 Mar;24(3):364–74.
 172. O'Connor AE, McFarlane JR, Hayward S, Yohkaichiya T, Groome NP, de Kretser DM. Serum activin A and follistatin concentrations during human pregnancy: a cross-sectional and longitudinal study. *Hum Reprod*. 1999 Mar;14(3):827–32.
 173. Wakatsuki M, Shintani Y, Abe M, Liu ZH, Shitsukawa K, Saito S. Immunoradiometric assay for follistatin: serum immunoreactive follistatin levels in normal adults and pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Feb;81(2):630–4.
 174. Brinkoetter M, Magkos F, Vamvini M, Mantzoros CS. Leptin treatment reduces body fat but does not affect lean body mass or the myostatin-follistatin-activin axis

- in lean hypoleptinemic women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Jul;301(1):E99–104.
175. Moragianni VA, Aronis KN, Chamberland JP, Mantzoros CS. Short-term energy deprivation alters activin a and follistatin but not inhibin B levels of lean healthy women in a leptin-independent manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Dec;96(12):3750–8.
176. Chang H-M, Cheng J-C, Klausen C, Taylor EL, Leung PCK. Effects of recombinant activins on steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Oct;99(10):E1922–32.
177. Chong Z, Dong P, Riaz H, Shi L, Yu X, Cheng Y, et al. Disruption of follistatin by RNAi increases apoptosis, arrests S-phase of cell cycle and decreases estradiol production in bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci.* 2015 Apr;155:80–8.
178. Petraglia F, Vaughan J, Vale W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5114–7.
179. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* 2006 Aug;132(2):217–32.
180. Coutinho LM, Vieira EL, Dela Cruz C, Casalechi M, Teixeira AL, Del Puerto HL, et al. Apoptosis modulation by activin A and follistatin in human endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol.* 2016 Feb;32(2):161–5.
181. Daponte A, Deligeoroglou E, Garas A, Pournaras S, Hadjichristodoulou C, Messinis IE. Activin A and follistatin as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *Dis Markers.* 2013 Jan;35(5):497–503.
182. Näf S, Escote X, Ballesteros M, Yañez RE, Simón-Muela I, Gil P, et al. Serum activin A and follistatin levels in gestational diabetes and the association of the Activin A-Follistatin system with anthropometric parameters in offspring. *PLoS One.* 2014 Jan;9(4):e92175.
183. Casagrandi D, Bearfield C, Geary J, Redman CW, Muttukrishna S. Inhibin, activin, follistatin, activin receptors and beta-glycan gene expression in the placental tissue

- of patients with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2003;9:199–203.
184. Muttukrishna S, Knight PG, Groome NP, Redman CW, Ledger WL. Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for pre-eclampsia. *Lancet (London, England).* 1997 May 3;349(9061):1285–8.
 185. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T, Hamada H. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J.* 2004 May 5;23(9):1998–2008.
 186. Li Z-Y, Zheng S-L, Wang P, Xu T-Y, Guan Y-F, Zhang Y-J, et al. Subfatin is a novel adipokine and unlike Meteorin in adipose and brain expression. *CNS Neurosci Ther.* 2014 Apr;20(4):344–54.
 187. Park JA, Lee HS, Ko KJ, Park SY, Kim JH, Choe G, et al. Meteorin regulates angiogenesis at the gliovascular interface. *Glia.* 2008 Feb;56(3):247–58.
 188. Wang Z, Andrade N, Torp M, Wattananit S, Arvidsson A, Kokaia Z, et al. Meteorin is a chemokine factor in neuroblast migration and promotes stroke-induced striatal neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Feb;32(2):387–98.
 189. Jørgensen JR, Thompson L, Fjord-Larsen L, Krabbe C, Torp M, Kalkkinen N, et al. Characterization of Meteorin--an evolutionary conserved neurotrophic factor. *J Mol Neurosci.* 2009 Sep;39(1-2):104–16.
 190. Kim Y-Y, Moon J-S, Kwon M, Shin J, Im S-K, Kim H-A, et al. Meteorin regulates mesendoderm development by enhancing nodal expression. *PLoS One.* 2014 Jan;9(2):e88811.
 191. Stenczer B, Molvarec A, Veresh Z, Gullai N, Nagy GR, Walentin S, et al. Circulating levels of the anti-angiogenic thrombospondin 2 are elevated in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011 Nov;90(11):1291–5.
 192. Zhou J-Y, Chan L, Zhou S-W. Omentin: linking metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014 Jan;12(1):136–43.
 193. Dupont J, Pollet-Villard X, Reverchon M, Mellouk N, Levy R. Adipokines in human reproduction. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015 Oct;24(1):11–24.
 194. Dos Santos E, Pecquery R, de Mazancourt P, Dieudonné M-N. Adiponectin and reproduction. *Vitam Horm.* 2012 Jan;90:187–209.
 195. D'Ippolito S, Tersigni C, Scambia G, Di Simone N. Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. *Biofactors.* 2012;38:14–23.

-
196. Ryckman KK, Spracklen CN, Smith CJ, Robinson JG, Saftlas AF. Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2015 Apr;122(5):643–51.
 197. Barker G, Lim R, Georgiou HM, Lappas M. Omentin-1 is decreased in maternal plasma, placenta and adipose tissue of women with pre-existing obesity. *PLoS One*. 2012;7:e42943.
 198. Briana DD, Boutsikou M, Baka S, Gourgiotis D, Marmarinos A, Liosi S, et al. Omentin-1 and vaspin are present in the fetus and neonate, and perinatal concentrations are similar in normal and growth-restricted pregnancies. *Metabolism*. 2011 Apr;60(4):486–90.
 199. Lausten-Thomsen U, Christiansen M, Hedley PL, Holm J-C, Schmiegelow K. Adipokines in umbilical cord blood from children born large for gestational age. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016 Jan 1;29(1):33–7.
 200. Kafalidis G, Boutsikou T, Briana DD, Boutsikou M, Marmarinos A, Baka S, et al. Adipokines vaspin and omentin-1 are up-regulated in large for gestational age infants at term. *Cytokine*. 2013 Apr;62(1):70–4.