



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE BIOMARCADORES Y VESÍCULAS
EXTRACELULARES EN PREECLAMPSIA Y
RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO FETAL**

Directoras

Dra. Ana María Cubo Nava

Dra. Sandra Muntión Olave

MIRIAM RODRIGO CARO

Salamanca, 27 de septiembre de 2024

Dra. Ana María Cubo Nava, con D.N.I. 11959973L, Doctora en Medicina y Cirugía, Profesora Contratada Doctora de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca (USAL) y Facultativo Especialista en Obstetricia y Ginecología con dedicación en el Área de Diagnóstico Prenatal del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA).

Dra. M^a Sandra Muntión Olave, con D.N.I.16567353Q, Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca e Investigador Postdoctoral en el laboratorio de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA).

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado ``Estudio de biomarcadores y vesículas extracelulares en preeclampsia y restricción del crecimiento fetal`` realizado por Doña Miriam Rodrigo Caro bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la siguiente certificación en Salamanca a 22 de Julio de 2024.

Dra. Ana María Cubo Nava

Dra. Sandra Muntión Olave

Este proyecto de tesis ha sido financiado por la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, a través del **Proyecto GRS 2045/A/19: “Estudio de biomarcadores en la preeclampsia y el retraso del crecimiento intrauterino (CIR)”** desarrollado durante los años 2019 y 2020 en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Los resultados de este proyecto de tesis han sido presentados en el **International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG) Congress 2021** y publicados en:

- Muntion, S., Boix, F., Caro, M.R., Moruno, M.H., de la Torre, A.G., Herrera, R.O., Antúnez, M.G., Sánchez, P.T., Alvarez, M.G., Fraile, F., Sánchez-Guijo, F. and Nava, A.M.C. (2021), VP33.15: MicroRNAs profile from plasma of pregnant women with intrauterine fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 58: 89-312. <https://doi.org/10.1002/uog.24515>
- Boix, F., Muntion, S., Moruno, M.H., Caro, M.R., Sánchez, P.T., Alvarez, M.G., de la Torre, A.G., Herrera, R.O., Antúnez, M.G., Fraile, F., Sánchez-Guijo, F. and Nava, A.M.C. (2021), VP37.14: Pregnant women with pre-eclampsia show increased serum levels of implantation and differentiation trophoblast factors. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 58: 257-257. <https://doi.org/10.1002/uog.24562>

También han sido presentados en:

36 Edición Nacional de Formación SEGO (Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia):

- Expresión de microRNAs en vesículas extracelulares de plasma procedentes de mujeres embarazadas con crecimiento intrauterino restringido. Cubo AM, Boix Giner F, Rodrigo Caro M, Huélamo Moruno M, Ochoa de Eribe Aguirre L, Nieto Alonso M, Fraile Alonso F, Muntión S.
- Diferencias en los niveles séricos de los factores de implantación y diferenciación del trofoblasto en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia. Cubo AM, Muntión S, Huélamo Moruno M, Rodrigo Caro M, Ochoa de Eribe Aguirre L, Nieto Alonso M, Fraile Alonso F, Boix Giner F.

6th European Congress of Immunology (ECI 2021):

- Muntión Olave S, Boix Giner F, Huélamo Moruno M, Rodrigo Caro M, Gómez De la Torre A, Ortega R, García Antúnez M, Fraile Alonso F, Sánchez Guijo F, Cubo Nava AM. Increased serum levels of implantation and differentiation trophoblast factors in pregnant women with pre-eclampsia.
- Boix Giner F, Muntión Olave S, Huélamo Moruno M, Rodrigo Caro M, García Álvarez M, García Sánchez S, Terradillos Sánchez P, Chillón C, Sánchez Guijo F, Cubo Nava AM. Increased serum levels of implantation and differentiation trophoblastfactors in pregnant women with pre-eclampsia.

Agradecimientos

La presente tesis doctoral es un reto académico y personal realizado durante mi periodo de formación como especialista en Obstetricia y Ginecología en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Son muchas las personas que, de un modo u otro, han contribuido a hacer posible este trabajo de investigación y a las que debo mi agradecimiento.

Primero de todo quiero agradecer especialmente a mis dos directoras de tesis, Dra. Ana Cubo y Dra. Sandra Muntión, por su ayuda y apoyo incondicional. Gracias por confiar en mi desde el inicio de este proyecto y por haber compartido vuestro tiempo libre para realizar las correcciones de esta tesis que sin vuestra ayuda no habría podido ser posible. Vuestra experiencia clínica y experimental han sido imprescindibles para la elaboración de este proyecto, habéis compartido vuestro conocimiento conmigo de manera que he aprendido muchísimo durante su creación. Ha sido un camino largo, y en muchas ocasiones amargo el que he recorrido para completar esta tesis, he disfrutado en su elaboración, pero he sufrido también durante la misma, y desde luego no lo hubiera podido hacer sin vuestra ayuda y sobre todo vuestra paciencia. Gracias por transmitirme vuestra su experiencia, que a pesar de que contáis con tan poco tiempo ha sabido resolver cada una de mis dudas, y ha dirigido, corregido y perfeccionado mi trabajo.

Gracias a todo el personal de Paritorio del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca por vuestra ayuda en la recogida de las muestras a las pacientes. A todos los integrantes del Servicio de Laboratorio de Terapia Celular de Salamanca, he aprendido mucho de vosotros y descubierto un mundo muy gratificante en el camino de la investigación totalmente desconocido para mí y el cual tiene todo mi respeto y admiración por su rigor científico. Gracias al equipo de compañeros y amigos de residencia de la especialidad de Obstetricia y Ginecología con los que he compartido mis cuatro años de especialidad llenos de grandes momentos, dentro y fuera del hospital, que no olvidaré.

Mi reconocimiento a todas esas mujeres que, de forma altruista y desinteresada, han participado en este estudio.

A todos mis amigos y familiares, que de manera indirecta me habéis animado a seguir adelante.

A mis padres, gracias por vuestra comprensión y confianza en cada una de mis decisiones. Por vuestra actitud en todo momento, siempre optimista.

A mis abuelos, allá donde estéis, espero que podáis estar orgullosos de mí. Siempre permaneceréis en mi corazón.

“Siempre tenemos la posibilidad de recomenzar una vez más”

Jack Kornfield

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μ

μl · microlitro

A

AAS · Ácido acetil salicílico
ACM · Arteria Cerebral Media
ADN · Ácido desoxirribonucleico
ANGPT2 · Angiopoyetina 2
AU · Arteria umbilical

B

BMP4 · Proteína Morfogénica Ósea 4

C

CAMs · Moléculas de adhesión celular
CDH1 · Cadherina 1
CDKN1A · Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1
cDNA · ADN complementario
CIBERehd · Centro de Investigación de Enfermedades Hepáticas y Digestivas
CIR · Crecimiento intrauterino restringido
CLNH4 · Cloruro amónico
COX-1 · Ciclooxygenasa 1

D

dL · Decilitros
Doppler AUt · Estudio Doppler de la pulsatilidad en arterias uterinas
DPPNI · Despredimiento prematuro de placenta normoinserta

E

EDTA · Ácido edético y ácido etilnodiaminatetraacético
EG · Edad gestacional
EHE · Estados hipertensivos del embarazo
ENG · Gen endoglina
ERalpha · Receptor de estrógeno alfa

F

FMF · Fetal Medicine Foundation

G

g · Gramos
GADH · Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa

H

HELLP · Hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia
HEVEPHARM · Departamento de la Universidad de Salamanca de Bioquímica y Biología Molecular Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos
HIF1 · Factor 1 inducible por hipoxia
HLA · Complejo Mayor de Histocompatibilidad G
HTA · Hipertensión arterial

I

IBSAL · Instituto Biomédica de Salamanca
IC · Intervalo de confianza
IL-10 · Interleucina 10
IL-4 · Interleucina 4
IL-6 · Interleucina 6
IMC · Índice de masa corporal
IP · Índice de pulsatilidad
ISSHP · Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión
ISUOG · Sociedad Internacional de Ultrasonidos en Obstetricia y Ginecología

K

kg · Kilogramo
KHCO₃ · Bicarbonato potásico

M

MDS · Multidimensional scaling

MET · Microscopia Electrónica de Transmisión
mg - Miligramo ·
mg/día · Miligramo por día
mg/dL · Miligramos por decilitros
mg/mol · Miligramos mol
miRNA · MicroRNA
mm Hg · Milímetros de mercurio
MMP · Metaloproteinasas
MoM · Múltiplos de la mediana normal

N

ncRNAs · MicroRNA no codificantes
NFKB · Nuclear kappa kb1
nm · Nanomol
NTA · Nano particle Tracking Analysis

O

OMS · Organización Mundial de la Salud
OVF · Onda de velocidad de flujo

P

PAM · Presión arterial media
PAPP-A · Proteína plasmática A asociada al embarazo
Partículas/ml · Partículas por mililitro
PBS · Tampón fosfato salino
PCR · Reacción en cadena de polimerasa
PDGFB · Proteína del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE Preeclampsia
PEG · Pequeño para la edad gestacional
PFE · Peso fetal estimado
PGI2 · Prostaciclina
PLAP · Fosfatasa alcalina de tipo placentaria
PIGF · Factor de crecimiento placentario

R

RCIU · Retraso de crecimiento intrauterino
RNA · Ácido ribonucleico
RNAm · RNA mensajeros
RPBF · Riesgo de Pérdida de Bienestar Fetal
rpm · Revoluciones por minuto
RR · Riesgo relativo

RT · Tiempo real

S

SCUBE2 · Péptido de señal, dominio CUB y dominio similar a EGF que contiene 2
sEng · Endoglina soluble
sFlt- 1 · Tirosina quinasa 1 soluble tipo fms
SOP · Síndrome de Ovario Poliquístico
SP · Sangre periférica
SRAA · Sistema renina angiotensina aldosterona

T

TAD · Tensión arterial diastólica
TAS · Tensión arterial sistólica
TGF · Transforming Growth Factor
TGF-b · Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α · Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6 · TNF receptor associated factor 6
TXA2 · Tromboxano A2

U

UI · Unidades Internacionales ·
UI/L · Unidades internacionales por litro

V

V · Voltios
VEGF-A · Factor de crecimiento endotelial vascular
VEs · Vesículas extracelulares

W

WB · Western Blot
WNT · Wingless-related integration site

M

μ mol Micromol ·
 μ mol/L · Micromoles por litro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Criterios de severidad en la preeclampsia.....	13
Figura 2-. Factores maternos para preeclampsia según las diferentes sociedades científicas.....	16
Figura 3-. Fisiopatología de la PE.....	20
Figura 4-. Defectos en arterias espirales.....	22
Figura 5-. Onda de velocidad de flujo de la arteria uterina en el segundo trimestre.	23
Figura 6-. Esquema representativo del equilibrio normal entre factores angiogénicos circulantes y su desequilibrio en la preeclampsia... ..	24
Figura 7-. Resumen de los mecanismos fisiopatológicos y hallazgos biofísicos en las fases del proceso de redistribución circulatoria fetal.	31
Figura 8-.Origen de los exosomas.....	33
Figura 9-.Morfología de la placenta.	44
Figura 10-.Pasos realizados a través de la obtención del plasma de sangre periférica.	45
Figura 11-. Proceso de la técnica de Elisa	49
Figura 12-. Estudios realizados con las VEs extraídas del plasma de la SP de las embarazadas.....	50
Figura 13-. Caracterización de VEs.....	52
Figura 14-. Representación de los valores medios de la tensión arterial sistólica (TAS), diastólica (TAD) y media (TAM) en los distintos grupos de estudio.	59
Figura 15-. Peso fetal medio en cada uno de los grupos de estudio.	61
Figura 16-. Peso medio de la placenta en cada uno de los grupos.	61
Figura 17-. Distribución de las pacientes del estudio según su hábito tabáquico.	62
Figura 18-. Representación del porcentaje de cada una de las etnias de las pacientes del estudio.	62
Figura 19-. Representación de la inducción de parto según grupos.	63
Figura 20-. Tipo de parto según los diferentes grupos de estudio.....	64
Figura 21-. Elevación del Índice de Pulsatilidad de las arterias uterinas en la semana 24 según grupos de estudio.....	66
Figura 22-. Expresión del gen (ENG) en patología placentaria.	67
Figura 23-. Expresión del gen (BMP4) en patología placentaria	68
Figura 24-. Expresión del gen (HIF1) en patología placentaria	69
Figura 25-. Expresión del gen (ANGPT2) en patología placentaria.	70
Figura 26-. Expresión del gen (CDH1) en patología placentaria.	70
Figura 27-. Expresión del gen (Il6) en patología placentaria.....	71
Figura 28-. Diagrama de cajas comparando las concentraciones séricas de endoglina soluble (sEng) en mujeres con embarazos sanos, CIR, PPrecoz y PTardía.	72

Figura 29-. Caracterización de vesículas extracelulares.....	73
Figura 30-. Tamaño de las VEs referido en nanomicras mediante NTA.....	74
Figura 31-. Cuantificación de partículas mediante NTA.....	75
Figura 32-. Concentración de partículas (partículas/ml) según grupos	76
Figura 33-. Western Blot de CD63 en VEs de pacientes embarazadas en cada uno de los grupos.....	76
Figura 34-. Análisis no supervisado del agrupamiento de las pacientes según la patología.....	77
Figura 35-. MicroRNAs infraexpresados en PEG.....	78
Figura 36-. MicroRNAs desregulados en las embarazadas sanas vs CIR.....	79
Figura 37-. MicroRNAs característicos de mujeres embarazadas con CIR.....	80
Figura 38-. Vías significativamente alteradas en el desarrollo del PEG.....	80
Figura 39-. Vías significativamente alteradas en el desarrollo del CIR.	82
Figura 40-. Análisis no supervisado del agrupamiento de similitudes entre pacientes según la patología.....	83
Figura 41-. MicroRNAs sobreexpresados diferencialmente en preeclampsia.	84
Figura 42-. MicroRNAs infraexpresados diferencialmente en preeclampsia.	84
Figura 43-. Vías significativamente alteradas en el desarrollo de preeclampsia.	85
Figura 44-. Expresión del microRNA 29c.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-Principales diferencias entre las dos formas clínicas de PE.....	15
Tabla 2-Primers empleados para el estudio de genes mediante RT-PCR.....	48
Tabla 3-Características generales de las pacientes del estudio	57
Tabla 4-Distribución de las variables TA media, Sistólica y Diastólica según los grupos de estudio	59
Tabla 5-Distribución de la edad gestacional al final de la gestación.....	60
Tabla 6-Distribución del peso fetal medio, mínimo y máximo en cada uno de los grupos de estudio en gramos....	60
Tabla 7-Distribución de la inducción de parto según grupos.....	63
Tabla 8-Distribución del tipo de parto en cada uno de los grupos.	64
Tabla 9-Índice de pulsatilidad medio de las arterias uterinas en la semana 20 según grupos de estudio	65
Tabla 10-Distribución del Índice de Pulsatilidad de las arterias uterinas en la semana 24 según grupos de estudio.	65

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Hoja de información para la paciente y Consentimiento Informado	123
ANEXO 2 - Hoja de recogida de datos	131
ANEXO 3 - Instrucciones para la recogida de muestras	135
ANEXO 4 - TaqMan Human MicroRNA Array A.....	139
ANEXO 5 - Ejemplo de captura de NTA (NANOSIGHT).....	143

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
LISTA DE ANEXOS.....	7
1.- INTRODUCCIÓN	11
1.1. La preeclampsia.....	11
1.1.1. Definición.....	11
1.1.2. Epidemiología.....	12
1.1.3. Formas clínicas de la preeclampsia	13
1.1.4. Factores de riesgo	16
1.1.5. Fisiopatología de la preeclampsia.....	17
1.1.6. Predicción de la preeclampsia	21
1.1.7. Modelos de predicción	27
1.1.8. Prevención de la preeclampsia	28
1.2. Alteraciones del crecimiento.....	29
1.2.1.- Clasificación de los trastornos del crecimiento intrauterino:	29
1.2.2.- El papel de la ecografía en el diagnóstico de los trastornos del crecimiento intrauterino	30
1.2.3.- Cronología de la insuficiencia placentaria y adaptación fetal	31
1.3. Vesículas extracelulares.....	31
1.4. MicroRNAs (MiRNAs)	34
2.- HIPÓTESIS	39
3.- OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo principal	39
3.2. Objetivos específicos	39
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	41
4.1. Pacientes.....	41
4.2. Criterios de inclusión:	42
4.3. Criterios de exclusión:	42
4.4. Datos del estudio prospectivo:.....	43

4.5. Procesamiento de las muestras	43
4.5.1. Placenta	43
4.5.2. Obtención del plasma de sangre periférica	45
4.6. Análisis de la expresión génica en placenta	46
4.6.1. Extracción de RNA	46
4.6.2. Reacción en cadena de polimerasa(RT-PCR) de genes implicados en patología placentaria.	47
4.7. ELISA	48
4.8. Aislamiento de las vesículas extracelulares procedentes del plasma	49
4.8.1. Caracterización de VES	50
4.8.2. Análisis de expresión de microRNAs de VEs de plasma de EDTA.....	53
4.9. Análisis estadístico	55
5.- RESULTADOS	57
5.1. Estudio de los pacientes	57
5.1.1. Características generales	57
5.1.2. Variables cuantitativas	58
5.1.3. Variables cualitativas	62
5.2. Estudios experimentales.....	67
5.2.1. RT-PCR genes implicados en patología placentaria.....	67
5.2.2. Elisa.....	71
5.2.3. Caracterización de las VEs.....	73
5.2.4 Análisis del perfil de expresión de micro-RNAs.....	76
6.- DISCUSIÓN	87
7.- CONCLUSIONES	105
8.- BIBLIOGRAFIA	107
9.- ANEXOS.....	121

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 La preeclampsia

La preeclampsia (PE) es un estado hipertensivo específico del embarazo de carácter multisistémico y progresivo, que típicamente se presenta con hipertensión arterial después de las 20 semanas de gestación, acompañada de proteinuria y/o afectación de otros órganos¹.

Es una de las principales causas de mortalidad materna, fetal y neonatal, especialmente en los países con ingresos bajos y medios.

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para clarificar los aspectos fundamentales de su fisiopatología y para establecer unos criterios diagnósticos precisos, la PE sigue siendo una enfermedad compleja e impredecible, que habitualmente genera dificultades a los clínicos en su diagnóstico y manejo. Por ello, resulta importante el desarrollo de nuevas y mejores herramientas pronósticas que nos permitan identificar a aquellas embarazadas con un mayor riesgo de padecer formas precoces y severas de PE que supongan una mayor amenaza para el pronóstico materno y fetal, y que obliga a finalizar la gestación antes de llegar a término.

1.1.1 Definición

Los estados hipertensivos del embarazo (EHE) son un grupo de patologías que aparecen durante la gestación cuyo nexo común es la hipertensión.

La preeclampsia es un trastorno hipertensivo específico de la gestación que se asocia a un daño vascular sistémico materno, con particular afectación de los endotelios fenestrados presentes en el riñón, el hígado y el cerebro².

En la actualidad la definición internacionalmente aceptada es la propuesta por Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP)³, que define la PE como la presión arterial sistólica a ≥ 140 mm Hg y/o la presión arterial diastólica a ≥ 90 mm Hg en al menos dos ocasiones medidas con 4 horas de diferencia en mujeres previamente normotensas y

se acompaña de una o más de las siguientes alteraciones de inicio reciente a las 20 semanas de gestación o después:

- 1. Proteinuria (≥ 30 mg/mol de proteína/creatinina; ≥ 300 mg/24 horas; o ≥ 2 + tira reactiva).
- 2. Evidencia de otra disfunción de órganos maternos que incluye: **lesión renal aguda** (creatinina ≥ 90 μ mol/L: 1 mg/dL); **afectación hepática** (transaminasas elevadas: alanina aminotransferasa o aspartato aminotransferasa > 40 UI/L) con o sin dolor en cuadrante superior derecho o **dolor abdominal epigástrico**; **complicaciones neurológicas** (por ejemplo, eclampsia, estado mental alterado, ceguera, accidente cerebrovascular, dolores de cabeza severos y escotomas visuales persistentes); o **complicaciones hematológicas** (trombocitopenia-recuento de plaquetas <150000 dL, coagulación intravascular diseminada, hemólisis).
- Disfunción uteroplacentaria (como restricción del crecimiento fetal, análisis de forma de onda Doppler de la arteria umbilical anormal o muerte fetal).

1.1.2 Epidemiología

A nivel mundial, la incidencia de preeclampsia oscila entre 2-8 % de los embarazos, aunque las cifras varían en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia de preeclampsia es siete veces mayor en los países en desarrollo que en los desarrollados⁴. Esta mayor incidencia de preeclampsia y eclampsia en países en vías de desarrollo se debe probablemente a la dificultad del acceso al sistema sanitario y la menor calidad y disponibilidad de recursos, que pueden elevar el número y la gravedad de complicaciones derivadas de esta enfermedad.

En presencia de determinados factores de riesgo como son el antecedente de una PE previa, hipertensión arterial crónica, diabetes o la existencia de una gestación múltiple, la posibilidad se eleva al 10-25%.

En cuanto a la mortalidad, el 15% de las muertes maternas relacionadas con el embarazo se atribuyen a la aparición de PE. La PE es también es una importante causa de morbi-mortalidad perinatal como consecuencia de su asociación con el abruptio placentae, el crecimiento intrauterino restringido (CIR) y el parto prematuro iatrogénico⁴.

1.1.3 Formas clínicas de la preeclampsia

Preeclampsia leve y severa

El espectro clínico de la PE es muy amplio. Existen **formas leves** que suelen presentarse a término y cursan sin repercusión en el pronóstico materno fetal. Sin embargo, existen **formas severas** que aumentan el riesgo de morbilidad y mortalidad en la preeclampsia. La preeclampsia grave puede resultar en complicaciones agudas y a largo plazo, tanto para la mujer como para su recién nacido.

Las complicaciones maternas de la preeclampsia grave incluyen, entre otros, edema pulmonar, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria aguda, coagulopatía, insuficiencia renal grave y retinopatía. El curso clínico de la preeclampsia severa se caracteriza a menudo por un deterioro progresivo de las condiciones maternas y fetales. Teniendo en cuenta que el único tratamiento de la preeclampsia es la finalización de la gestación, está indicado finalizar el embarazo si aparece alguna de estas complicaciones, independientemente de la edad gestacional. Este es uno de los motivos por los que la preeclampsia contribuye de una manera importante a la prematuridad yatrogénica, que a su vez se asocia a múltiples complicaciones postnatales⁵.

La PE tiene su origen en una placentación anormal. En las formas graves de preeclampsia pueden aparecer trombosis placentarias y desprendimiento prematuro de placenta (DPPNI) que puede conducir a la muerte fetal intrauterina.

Criterios ACOG 2020 de las formas graves de PE

- PA sistólica ≥ 160 mm Hg o PA diastólica ≥ 110 mm Hg en dos ocasiones con al menos 4 horas de separación mientras el paciente está en reposo en cama (a menos que el tratamiento antihipertensivo se inicie antes de este tiempo)
- Trombocitopenia: recuento de plaquetas $< 100.000 /\mu\text{L}$.
- Alteración de la función hepática: concentraciones sanguíneas anormalmente elevadas de enzimas hepáticas (superior a dos veces los valores normales), dolor persistente en el cuadrante superior derecho o dolor epigástrico que no responde a la medicación y no se explica por otro diagnóstico o ambos.
- Insuficiencia renal progresiva: concentración de creatinina sérica superior a $1,1 \text{ mg / dL}$ o duplicación de la concentración sérica de creatinina en ausencia de otra enfermedad renal u oliguria.
- Edema pulmonar o cianosis.
- Trastornos cerebrales o visuales de aparición reciente.

Figura 1- Criterios de severidad en la preeclampsia. Modificada de: Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. Obstet Gynecol. 2020 Jun;135(6): e237-e260.

Preeclampsia precoz y tardía

La clasificación más utilizada es la que clasifica la preeclampsia en temprana o tardía según el momento de aparición (Tabla 1), con un punto de corte establecido en 34 semanas³.

- PE de inicio temprano, cuando la PE aparece antes de la semana 34 de gestación.
- PE de inicio tardío, cuando debuta a las 34 semanas de gestación o de forma posterior.

La gran mayoría de los diagnósticos corresponden a formas tardías y, aproximadamente, el 10% pertenecen a formas precoces.

La preeclampsia de inicio precoz se asocia más frecuentemente con resultados adversos maternos y fetales que la preeclampsia de inicio tardío, no solo debido a probables diferencias etiológicas entre estas dos entidades, sino también por la mayor tasa de prematuridad asociada. La PE de inicio precoz se relaciona casi invariablemente con una insuficiencia placentaria como consecuencia de una placentación inadecuada al inicio de la gestación⁶. Representa un 15-20% del total de casos de PE, lo que supone que afecta solamente un 0.3-0.5% de todos los embarazos, pero se asocia con una mortalidad materna 20 veces mayor que la PE tardía.

La PE tardía, es decir, la que se presenta más allá de la semana 34 de gestación, es el tipo más frecuente, ya que comprende el 75-80% de los casos de PE afectando al 1.5-4.5% de los embarazos y, cursa habitualmente como formas leves sin repercusión en el pronóstico materno y/o fetal. No prevalece la alteración trofoblástica como principal causante del síndrome sino factores constitucionales maternos⁷.

La PE que debuta a término presenta una morbilidad y mortalidad semejante a una gestación normal, excepto en el 1-2% de casos en que se asocia al síndrome de HELLP.

Más raramente, la preeclampsia puede desarrollarse en el período posparto.

Tabla 1-. Principales diferencias entre las dos formas clínicas de PE. En: Lacunza Paredes, R. O., & Pacheco Romero, J. (2015). Preeclampsia de inicio temprano y tardío: una antigua enfermedad, nuevas ideas. Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia, 60(4), 351–361.

Prevalencia	Preeclampsia de inicio precoz	Preeclampsia de inicio tardío
	5 a 20%	75 a 80%
Factores de riesgo	• preeclampsia en gestación previa • primigestación • raza negra • uso de inductores de la ovulación • hipertensión arterial crónica • factor protector, el tabaquismo	• historia familiar de preeclampsia • edad materna menor de 20 años o mayor de 40 años • multiparidad • obesidad • diabetes pregestacional • diabetes gestacional • anemia materna • tabaquismo
Inicio del síndrome materno	Antes de las 34 semanas	Posterior a las 34 semanas
Severidad	Más severo: HELLP, eclampsia	Menor asociación
Crecimiento fetal	Mayor asociación a RCIU	Frecuentemente fetos adecuados o grandes para edad gestacional
Signos de hipoxia placentaria	Muy frecuentes	Poco frecuentes
Tamaño placentario	Pequeño	Adecuado o grande
Doppler de arteria uterina en primer y segundo trimestres	Alterado (IP por encima de percentil 95)	Habitualmente normal
Balance angiogénico	sFlt-1 muy elevado PlGF/sEng disminuida sFlt-1/PlGF muy elevada	sFlt-1 ligeramente elevada PlGF/sEng levemente disminuida sFlt-1/PlGF ligeramente elevada
Predicción	Buenos resultados en el primer y segundo trimestre	Pobres resultados en todos los trimestres

Síndrome de HELLP (hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia)

Es un tipo de preeclampsia grave que se caracteriza por la combinación de hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia. El ISSHP recomienda que las mujeres con síndrome HELLP, sean consideradas como mujeres con preeclampsia para reducir la confusión que pueda haber al respecto, y para garantizar un tratamiento rápido y adecuado².

1.1.4 Factores de riesgo

La PE es una enfermedad sistémica de origen placentario. Por ello, las situaciones médicas que condicionen una predisposición a la disfunción vascular, tales como hipertensión crónica, diabetes mellitus, obesidad, lupus eritematoso sistémico o trombofilias se relacionan con la PE. La identificación de dichos factores al comienzo del embarazo es un paso fundamental para establecer el tipo de control que se debe llevar a cabo con cada gestante^{8,9}.

Se han tratado de identificar los factores de riesgo para desarrollar preeclampsia, y desde las diversas sociedades científicas se han propuesto combinaciones de diferentes situaciones clínicas que podrían favorecer la aparición de preeclampsia (Figura 2).

ACOG 2018 ⁴⁸ (United States of America)	NICE 2019 ⁴⁹ (United Kingdom)	SOGC 2014 ⁴⁰ (Canada)	SOMANZ 2014 ⁵¹ (Australia)	ISSHP 2018 ⁴²	WHO 2011 ⁵³
High-risk factors	High-risk factors	High-risk factors	Risk factors	High-risk factors	Risk factors
☐ Previous pregnancy with PE ☐ Chronic hypertension ☐ Systemic lupus erythematosus ☐ Type 1 or type 2 diabetes mellitus ☐ Renal disease ☐ Multifetal gestation ☐ Antiphospholipid syndrome	• Previous pregnancy with PE • Chronic hypertension • Autoimmune disease • Type 1 or type 2 diabetes mellitus • Chronic kidney disease • Antiphospholipid syndrome	• Previous pregnancy with PE • Antiphospholipid syndrome • Preexisting diabetes mellitus • Renal disease or proteinuria • Chronic hypertension or booking diastolic BP, ≥ 90 mm Hg	• Nulliparity • Multiple pregnancy • Previous history of PE • Family history of PE • Overweight • Obesity (BMI, ≥ 30 kg/m²) • Age, ≥ 40 y • Systolic BP, > 130 mm Hg or diastolic BP, > 80 mm Hg before 20 wk • Antiphospholipid syndrome • Preexisting diabetes mellitus • Underlying renal disease • Chronic autoimmune disease • Interpregnancy interval, > 10 y	• Prior PE • Chronic hypertension • Pregestational diabetes mellitus • BMI, > 30 kg/m² • Chronic kidney disease • Antiphospholipid syndrome	• Previous PE • Diabetes • Chronic hypertension • Renal disease • Autoimmune disease • Multifetal pregnancy
Moderate risk factors	Moderate risk factors	Moderate risk factors (first trimester)		Moderate risk factors	
☐ Nulliparity ☐ Age, ≥ 35 y ☐ Interpregnancy interval, > 10 y ☐ BMI, > 30 kg/m ² • Family history of PE (mother or sister) • History of SGA or adverse outcome • Sociodemographic characteristics (African American race or low socioeconomic status)	• Nulliparity • Age, ≥ 40 y • Interpregnancy interval, > 10 y • BMI at first visit, ≥ 35 kg/m² • Family history of PE • Multifetal pregnancy	☐ Age, 40 y ☐ Family history of PE (mother or sister) ☐ Family history of early-onset cardiovascular disease ☐ Lower maternal birthweight or preterm delivery ☐ Heritable thrombophilia ☐ Nonsmoking ☐ Increased prepregnancy triglycerides ☐ Previous miscarriage of < 10 wk with same partner ☐ Cocaine and methamphetamine use ☐ Booking systolic of BP ≥ 130 mm Hg or diastolic BP of ≥ 90 mm Hg ☐ Vaginal bleeding in early pregnancy ☐ Gestational trophoblastic disease ☐ Abnormal PAPP-A or free beta-hCG		☐ Advanced maternal age, > 35 y ☐ Family history of preeclampsia ☐ Short duration of sexual relationship (< 6 mo) before the pregnancy ☐ Primiparity ☐ Primipaternity (both changed paternity and an interpregnancy interval of > 5 y have been associated with an increased risk for preeclampsia) ☐ Connective tissue disorder	

Figura 2-. Factores maternos para preeclampsia según las diferentes sociedades científicas. En: Chaemsaitong, P., Sahota, D. S., & Poon, L. C. (2022). First trimester preeclampsia screening and prediction. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 226, Issue 2, pp. S1071-S1097.e2).

1.1.5 Fisiopatología de la preeclampsia

La PE tiene una naturaleza multifactorial y a día de hoy, a pesar de muchos intentos por entender sus orígenes, éstos siguen siendo en gran medida desconocidos. Se piensa que se asocia principalmente con una mala placentación, debida en parte a una mala adaptación inmunológica que conlleva una inflamación materna excesiva, y aumento del estrés oxidativo, con la consiguiente disfunción endotelial generalizada que esto produce¹⁰.

Placentación anormal

La placenta juega un papel central en la patogénesis de preeclampsia. El mecanismo exacto responsable por el momento se desconoce. Los estudios establecen un vínculo directo con la placenta más que con el feto, ya que la enfermedad parece remitir solamente después de la extracción de la placenta y, de hecho, complicaciones como la eclampsia posparto, se han relacionado con fragmentos placentarios retenidos¹¹.

El proceso fisiopatológico de la PE comienza con una invasión inadecuada del trofoblasto. Durante la placentación normal las células citotrofoblásticas forman un trofoblasto altamente invasivo que puede migrar a la decidua e invadir el primer tercio del miometrio, induciendo la remodelación de las arteriolas espirales para producir el sistema vascular de baja resistencia, que permita un aumento de 10 veces en el flujo sanguíneo, algo esencial para el crecimiento fetal. La reducción relativa del flujo uteroplacentario, secundaria a la placentación anormal causada por una alteración de la invasión de trofoblasto, es el desencadenante del desarrollo de la PE, ya que lleva a un estado de hipoxia placentaria que desencadena un aumento de la necrosis de la placenta. Como consecuencia se liberan fragmentos celulares a la circulación sanguínea, lo que se traduce en una respuesta inmunológica sistémica y, por consiguiente, un aumento de la inflamación y del estrés oxidativo, que contribuye al desarrollo de disfunción endotelial sistémica en las fases posteriores de la enfermedad¹².

Mal adaptación inmunológica

La respuesta inmunológica materna se modifica durante el embarazo, lo que conlleva un estado de tolerancia inmunológica al feto, que se comporta como un trasplante semialogénico, ya que posee la mitad de genes de origen materno y la otra mitad de origen paterno. Existen mecanismos

fetales, maternos y placentarios que protegen al feto frente al sistema inmunológico materno, para que las células fetales no sean rechazadas innatamente a su llegada.

En contraste con los embarazos normales, los embarazos de las mujeres con PE, se asocian con una respuesta inmune inadecuada y un medio de células inmunitarias activadas de manera anómala, lo que provoca la expresión de citoquinas proinflamatorias que puede conducir a una placentación defectuosa¹³.

Inflamación

Se ha demostrado que la isquemia placentaria, resultado de la invasión insuficiente de trofoblasto observada en la PE, produce un desequilibrio en la función inmune que conduce a la inflamación crónica. Este desequilibrio inmune consiste en un aumento de las células inmunitarias proinflamatorias y la expresión de citoquinas de este tipo, en detrimento de las células y citoquinas reguladoras, creándose un estado crónico e incontrolado de la inflamación. Durante la PE se evidencian niveles aumentados de TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6) en la circulación, mientras que la IL-10 (interleucina-10) y la IL-4 (interleucina 4) están disminuidos en las células trofoblásticas¹⁴.

Estrés oxidativo

Durante el embarazo normal, en el proceso de remodelación de las arterias uterinas y los vasos placentarios, se forman radicales libres. Estas moléculas se incrementan durante el embarazo, pero se controlan fisiológicamente mediante los antioxidantes, defensas encargadas de neutralizarlas. Durante la PE, se cree que la mala perfusión placentaria causa hipoxia intermitente, que conduce a un estado de estrés oxidativo, donde se aumenta la generación de radicales libres de oxígeno en la placenta. Si los niveles incrementados de radicales libres de oxígeno supera la capacidad antioxidante, habrá un daño a nivel de ADN (ácido desoxirribonucleico), lípidos y proteínas, provocando daño celular y endotelial¹⁵.

Disfunción endotelial

La disfunción endotelial es un daño en el sistema endotelial vascular materno representado por un vasoespasmo generalizado, aumento de la permeabilidad capilar y activación plaquetaria. En el endotelio dañado se reduce la liberación de agentes vasodilatadores (prostaciclina, óxido nítrico), no es capaz de activarse el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), y además

se desarrolla una hipersensibilidad a la angiotensina II que lleva a una vasoconstricción generalizada y a un aumento de la permeabilidad vascular, lo que a nivel sistémico se traduce en un incremento de las resistencias vasculares, mayor agregación plaquetaria y activación de la coagulación, creándose depósitos de fibrina y agregados plaquetarios a nivel endotelial, sistémico y placentario. Esto puede provocar trombos e infartos placentarios, con el consiguiente aumento de estrés oxidativo, inflamación, disfunción endotelial e isquemia, creándose un verdadero círculo vicioso¹⁰.

Estatus antiangiogénico

En la preeclampsia son claves los factores moduladores de la angiogénesis. La formación de la placenta precisa una importante angiogénesis para asegurar un adecuado suministro sanguíneo, y para ello se sintetizan y liberan factores proangiogénicos, como VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular) y PlGF (factor de crecimiento placentario), y factores anti angiogénicos, como sFlt-1 y sEng (endoglina soluble), entre los cuales debe haber un equilibrio que asegure el intercambio sanguíneo materno fetal. Uno de los mecanismos de la disfunción endotelial consiste en la pérdida del equilibrio entre los factores proangiogénicos y anti angiogénicos^{16,17}.

El modelo unificado: “el modelo de dos etapas”

El modelo unificado distingue dos fases en la patogénesis de la PE:

- **La primera fase o de lesión placentaria**, se da en el primer y segundo trimestre, en la cual se produciría el fenómeno de placentación anómala. Durante esta etapa, la predisposición genética e inmunológica junto con el estrés oxidativo generado provocan una invasión defectuosa del trofoblasto invasor, pérdida de la elasticidad de la pared de las arterias espirales y del control vasomotor. De esta manera el lecho vascular placentario no se transforma en territorio de baja resistencia, permaneciendo en un territorio de alta resistencia al flujo sanguíneo. Esto finalmente se traduce en un estado de vasoespasmo e isquemia local, lo que determina hipoxia y daño placentario.
- **La segunda fase o de disfunción endotelial e inflamación sistémica**, se da en el tercer trimestre. Como consecuencia de la placentación anómala, se genera un estado inflamatorio y gran estrés oxidativo, lo que provoca una alteración en el equilibrio entre factores proangiogénicos (disminuyen PlGF y VEGF) y anti angiogénicos (aumentan sFlt-1 y sEng)

producidos por la placenta. Todo ello contribuye al desarrollo de la disfunción endotelial, responsable de las típicas manifestaciones clínicas de la PE, como HTA (hipertensión arterial), proteinuria, fallo hepático, alteraciones neurológicas y alteraciones hematológicas^{3,18}.

En resumen...

La comprensión actual de la patogénesis de la preeclampsia sostiene que existe una causa iniciadora inmunológica que conduce a disfunción placentaria, que lleva a la disregulación angiogénica que tiene efectos a nivel de múltiples lechos vasculares (Figura 3). Por tanto, la mal adaptación inmune fetomaterna y la genética son probablemente el origen, y la disfunción / activación de las células endoteliales representa la vía común en el síndrome.

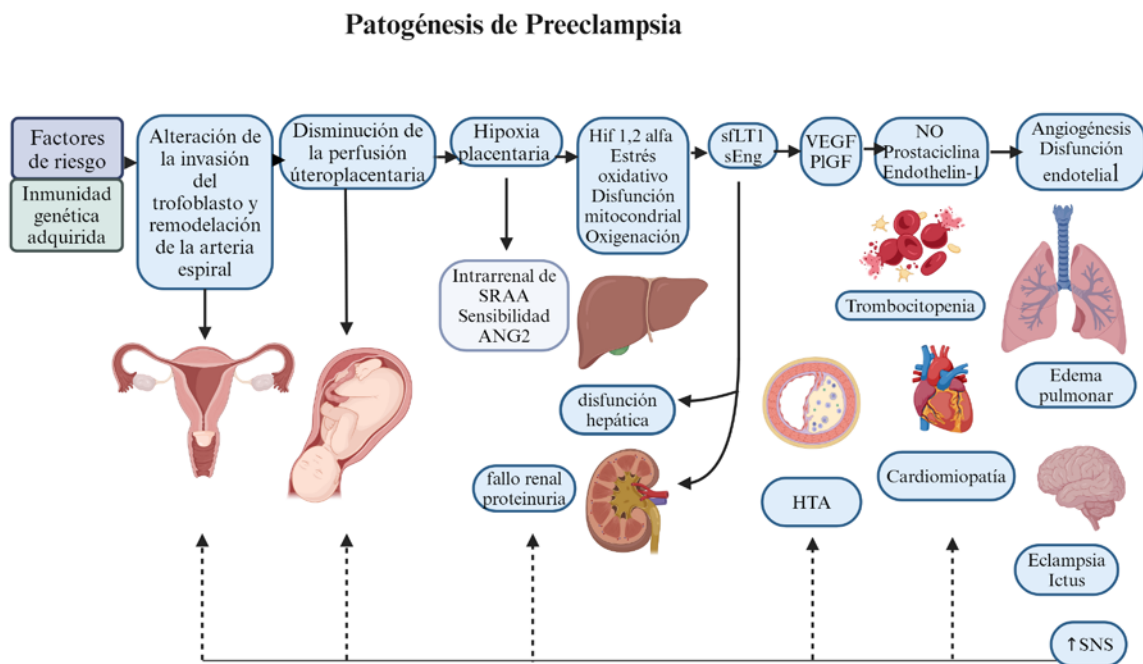


Figura 3-. Fisiopatología de la PE. Modificada de: Ives, C. W., Sinkey, R., Rajapreyar, I., Tita, A. T. N., & Oparil, S. (2020). Preeclampsia—Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 76, Issue 14, pp. 1690–1702).

1.1.6 Predicción de la preeclampsia

La evidencia de que la mayor parte de los fenómenos patogénicos que conducen a la PE preceden en el tiempo al establecimiento de la sintomatología ha generado múltiples intentos por encontrar marcadores clínicos, bioquímicos y ecográficos de los cambios en el entorno placentario y en la circulación materna que fuesen de utilidad para la predicción, diagnóstico y pronóstico de la PE. Los marcadores más extensamente estudiados por estar involucrados en la patogenia de la PE son el estudio Doppler de las arterias uterinas maternas, los marcadores reguladores de la angiogénesis, la medida de la presión arterial y las características maternas de la historia clínica².

Medida de la Presión Arterial Media (PAM)

Para la predicción de la PE, es más útil que la medida de las presiones sistólica y diastólica por separado. En el embarazo normal, la PAM depende de factores maternos, principalmente el peso y la hipertensión crónica. En los embarazos que desarrollan PE la PAM aumenta de forma más significativa en las etapas tempranas del embarazo que en las tardías. El aumento de la MAP en pacientes que posteriormente desarrollan PE probablemente refleja una elasticidad reducida de las arterias maternas combinada con un aumento de la vasoconstricción. Por lo tanto, la MAP es una medida de un factor condicional materno que aumenta el riesgo de desarrollar PE¹⁹.

Estudio Doppler de la pulsatilidad en arterias uterinas (Doppler AUt)

Durante el embarazo normal, el lecho placentario y la circulación uterina experimentan un aumento de la vascularización para permitir la circulación entre el feto y la madre. La vascularización placentaria implica vasculogénesis, angiogénesis y remodelación de las arterias espirales maternas²⁰.

La placentación humana se caracteriza por una invasión profunda del citotrofoblasto en la vasculatura materna. En mujeres destinadas a desarrollar PE, la invasión del trofoblasto es superficial. Esta implantación superficial conduce a hipoxia placentaria y estrés, lo que a su vez no solo da como resultado la liberación de factores circulantes, sino también el desarrollo anormal de la placenta (Figura 4).

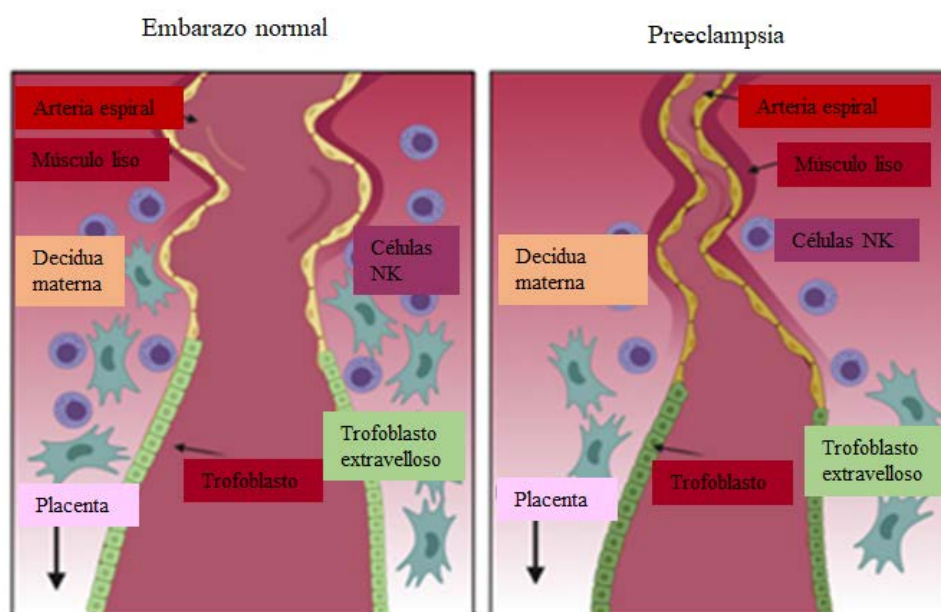


Figura 4-. Defectos en arterias espirales modificada de: Placenta. Modificada de Rana, S., Burke, S. D., & Karumanchi, S. A. (2021). Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1, 1–16.

Dado que a través de las arterias uterinas pasa todo el flujo uteroplacentario, la valoración de la onda de velocidad de flujo (OVF) de las arterias uterinas permite obtener una información indirecta y promediada de la situación de los cambios gestacionales en el árbol arterial uterino (Figura 5). Así, la pulsatilidad aumentada en la OVF de las arterias uterinas se correlaciona con hallazgos anatomopatológicos de invasión trofoblástica defectuosa e inadecuada transformación de las arterias espirales, por lo que se asocia con la aparición de PE y de otras complicaciones del embarazo relacionadas con la insuficiencia placentaria, tales como el crecimiento intrauterino restringido, el abrupcio placentae, los abortos tardíos e, incluso, con el parto prematuro.

El aumento del índice de pulsatilidad de las arterias uterinas es un hallazgo ecográfico que puede preceder y predecir el desarrollo de PE, aunque tiene mayor valor cuando se analiza conjuntamente con los hallazgos clínicos²⁰.

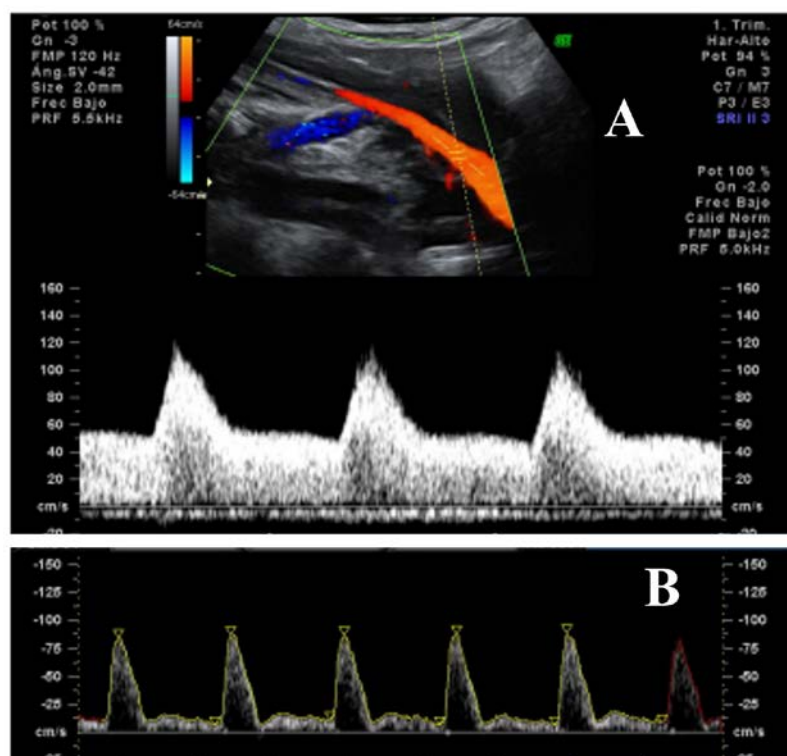


Figura 5-. Onda de velocidad de flujo de la arteria uterina en el segundo trimestre. A) Ecografía Doppler de una arteria uterina normal en una gestación con adecuada invasión trofoblástica. B) Onda de velocidad de flujo patológica en el segundo trimestre con persistencia del notch protodiastólico y alta pulsatilidad. En: PROAGO: Programa oficial de actualización profesional para ginecólogos y Obstetras. Tema 8: Crecimiento Intrauterino Restringido. Hemodinámica Materno-Placentaria-Fetal.

Factores relacionados con la angiogénesis

Actualmente se atribuye el nexo de unión entre una placentación deficiente y la inducción de un daño vascular materno a la aparición de un desequilibrio en la producción y liberación a la circulación materna de factores reguladores de la angiogénesis desde las placentas en situación de isquemia (Figura 6). Las alteraciones en estos factores angiogénicos preceden al inicio de los signos clínicos de preeclampsia y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad¹⁷.

Los biomarcadores angiogénicos circulantes han demostrado tener un valor predictivo negativo muy alto para descartar enfermedad clínica en mujeres con sospecha de preeclampsia. Estos biomarcadores sanguíneos han proporcionado una herramienta valiosa para acelerar el tiempo hasta el diagnóstico clínico y minimizar los resultados adversos maternos en mujeres con

preeclampsia. También han sido útiles para ayudar a comprender la patogenia de trastornos relacionados de placentación anormal, tales como restricción del crecimiento intrauterino.

En particular, los niveles circulantes de la forma soluble del receptor de la tirosina quinasa 1, un factor anti angiogénico, aumentan notablemente en mujeres con preeclampsia, mientras que los niveles libres de su ligando, el factor de crecimiento placentario, están marcadamente disminuidos¹⁶.

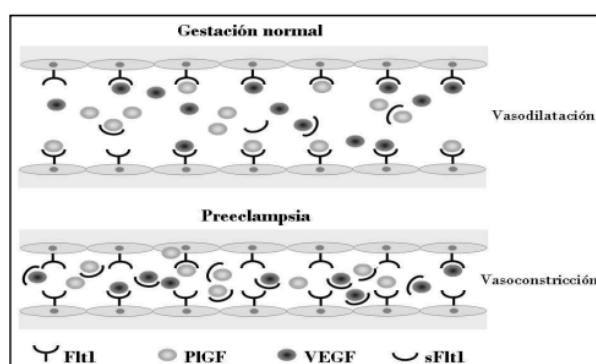


Figura 6-. Esquema representativo del equilibrio normal entre factores angiogénicos circulantes y su desequilibrio en la preeclampsia. En: Davison, J. M., Homuth, V., Jeyabalan, A., Conrad, K. P., Karumanchi, S. A., Quaggin, S., Dechend, R., & Luft, F. C. (2004). New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 15, Issue 9, pp. 2440–2448). Lippincott Williams and Wilkins.

Factor de crecimiento placentario (PlGF, Placental Growth Factor)

El factor de crecimiento placentario (PlGF) es un factor de crecimiento angiogénico relacionado con el factor de crecimiento endotelial vascular que es producido exclusivamente por el trofoblasto. En el embarazo normal, los niveles de PlGF aumentan durante la gestación, alcanzando un máximo aproximadamente entre las semanas 26 y 30²¹. En embarazos que desarrollan PE, la concentración de PlGF en suero es menor que en embarazos normales y esta reducción podría deberse a la hipoxia placentaria²².

También se ha informado en varios estudios que los niveles de PlGF disminuyen ya en el primer trimestre en mujeres que posteriormente desarrollan preeclampsia en comparación con el embarazo normal, lo que sugiere un papel como predictor de preeclampsia en el primer trimestre^{23–25}.

La proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A)

PAPP-A es sintetizado por la placenta y parece tener un papel importante en el propio crecimiento y desarrollo placentarios. El nivel de PAPP-A en suero materno en el primer trimestre está disminuido en embarazos de fetos con trisomías 21, 18 y 13. En comparación con embarazos normales, en los embarazos que desarrollan PE el nivel de PAPP-A en suero materno está disminuido en el primer trimestre, no son significativamente diferentes en el segundo trimestre y aumentado en el tercer trimestre²⁶. Los niveles bajos de proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) podrían estar asociados con una placentación anormal, lo que lleva al desarrollo de preeclampsia durante la última etapa de la gestación. Según un gran estudio poblacional (ensayo FASTER), los embarazos con niveles de PAPP-A < percentil 10 (0,52 múltiplos de la mediana normal [MoM]) se asociaron significativamente con preeclampsia, bajo peso al nacer, parto prematuro y rotura prematura de membranas y muerte neonatal. La medición de PAPP-A mejora el rendimiento de la detección de EP temprana proporcionada por una combinación de factores maternos y pruebas biofísicas entre las 11 y 13 semanas^{27,28}.

Forma soluble del receptor de la tirosina quinasa 1 (sFlt-1, Serum soluble fms-like tyrosine kinase-1) y VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

sFlt-1 es un factor anti angiogénico que parece tener un papel principal en la patogénesis de la PE. Se adhiere a los dominios de unión de los factores pro-angiogénicos, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) y PlGF, variando su configuración e impidiendo su interacción con los receptores de membrana de las células endoteliales, inhibiendo sus acciones mitogénicas y homeostáticas y promoviendo así la disfunción endotelial¹⁶.

En embarazos que desarrollan PE el nivel de sFlt-1 sérico está aumentado y este incremento precede el desarrollo de la enfermedad en aproximadamente cinco semanas. Sus niveles circulantes se correlacionan con la gravedad de la preeclampsia y la proximidad al inicio de la hipertensión o proteinuria. La concentración de sFlt-1 disminuye rápidamente después del parto, lo que se acompaña de una mejoría clínica materna significativa de los síntomas derivados de la PE.

VEGF es un conocido promotor de la angiogénesis; induce también óxido nítrico y prostaciclina vasodilatadoras en las células endoteliales teniendo así un papel en la disminución del tono vascular y presión arterial¹⁹.

Por tanto, se piensa que el exceso de sFlt-1 circulante es el principal responsable de una disfunción endotelial generalizada y consecuentemente del síndrome clínico de la PE al antagonizar el VEGF circulante y el PlGF¹⁷.

Ratio sFlt-1/PlGF

Se ha observado que el cociente sFlt-1/PlGF muestra una capacidad predictiva superior al empleo de los marcadores angiogénicos sFlt-1 y el PlGF por separado tanto para el diagnóstico precoz de PE como para el diagnóstico diferencial de casos atípicos y dudosos, identificación de los casos favorables para el tratamiento conservador y selección de candidatas para futuros tratamientos preventivos y curativos y seguimiento de éstos²⁹.

Un valor del ratio sFlt-1/PlGF por debajo de 38 en una gestante con sospecha de PE, permite descartar la existencia de una PE en la siguiente semana con una seguridad mayor del 99 %. Sin embargo, un valor del ratio sFlt-1/PlGF por encima de 85 obtenido antes de la semana 34 de gestación, se asocia con una probabilidad mayor del 85 % de tener que finalizar el embarazo en las próximas dos semanas como consecuencia de una complicación relacionada con la insuficiencia placentaria (PE, restricción del crecimiento intrauterino, abrupcio placentae...) ^{29,30}.

Endoglina soluble

La endoglina es un correceptor de superficie celular para los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF, Transforming Growth Factor), como TGF- β 1 y TGF- β 3. Estos dos factores de crecimiento son potentes inhibidores de la diferenciación y migración del trofoblasto actuando así la endoglina como un factor anti angiogénico.

La endoglina placentaria está elevada en preeclampsia, liberando endoglina soluble en la circulación materna. El aumento de los niveles circulantes de endoglina soluble produce disfunción endotelial y precede al inicio de la preeclampsia²⁹.

1.1.7 Modelos de predicción

La preeclampsia es muy difícil de predecir y diagnosticar. Diferentes organizaciones profesionales han propuesto sus propios modelos de predicción basados en los factores de riesgo actualmente reconocidos. Factores de riesgo como antecedentes de preeclampsia en embarazos anteriores, hipertensión crónica, enfermedades renales, la diabetes mellitus y la gestación múltiple incluidos en la figura 2. Los modelos hicieron una segmentación entre factores de riesgo «alto» y «moderado». La historia clínica previa y la hipertensión crónica se consideran los dos factores de riesgo contribuyentes más importantes. Esto permitiría orientar más apropiadamente la profilaxis desde el primer trimestre, así como una mayor vigilancia de aquellas personas con alto riesgo de enfermedad³¹.

El modelo que utiliza la Fetal Medicine Foundation (FMF) permite un enfoque más dinámico y específico para cada paciente y es el único que se ha sometido a extensas validaciones internas y externas. El modelo de la Fetal Medicina Foundation (FMF), es decir la triple prueba FMF, consiste en una combinación de factores maternos y mediciones de la presión arterial media, el índice de pulsatilidad de la arteria uterina y el factor de crecimiento placentario en suero. Tiene tasas de detección del 90% y el 75% para la predicción de preeclampsia temprana y prematura, respectivamente, con una tasa de falsos positivos del 10%. Este método de detección es superior al del método tradicional basándose únicamente en los factores de riesgo maternos. El mejor momento para realizar el cribado del riesgo de preeclampsia es alrededor de la semana 11-13 de gestación. Tan pronto como se obtiene el resultado, puede iniciarse la prevención precoz si se sospecha que existe un alto riesgo de preeclampsia³².

El estudio ASPRE, un ensayo aleatorio, doble ciego, multicéntrico y controlado con placebo, evaluó el efecto de la aspirina (AAS) profiláctica en dosis bajas administrada en el primer trimestre de embarazo sobre la incidencia de parto con preeclampsia antes de las 37 semanas de gestación en pacientes de alto riesgo³³.

La AAS se aplica ampliamente como antitrombótico debido a su efecto sobre la inactivación plaquetaria. El mecanismo de inactivación plaquetaria se basa en la inhibición de la COX-1 (ciclooxigenasa 1), que bloquea la síntesis de TXA2 (tromboxano A2). Suele administrarse en dosis bajas (75-81 mg/día), que son suficientes para la inhibición del TXA2, pero no de la PGI2 (prostaciclina)³¹.

El ensayo ASPRE confirmó el efecto de la aspirina en la preeclampsia de inicio precoz. La administración de aspirina se asoció a una reducción del riesgo de preeclampsia pretérmino (riesgo relativo (RR): 0,62; intervalo de confianza (IC) del 95%: 0,45-0,87), pero no hubo efectos significativos sobre la preeclampsia a término³⁴. La reducción de la preeclampsia pretérmino se limitó al subgrupo en el que la aspirina es iniciada a las ≤ 16 semanas de gestación y a una dosis diaria de ≥ 100 mg (riesgo relativo: 0,33; intervalo de confianza del 95%: 0,19-0,21).

El efecto beneficioso de la aspirina en la prevención de la PE precoz es similar en subgrupos con diferentes características maternas, excepto en presencia de hipertensión crónica, donde no se evidencia ningún efecto beneficioso. En general, los ensayos aleatorios no tienen suficiente poder estadístico para investigar el efecto del tratamiento con aspirina sobre las tasas de otros resultados adversos asociados a la placenta, como la restricción del crecimiento fetal y la muerte fetal³⁵.

1.1.8 Prevención de la preeclampsia

Las posibles consecuencias de la preeclampsia suponen una gran amenaza y un gran daño para las madres y sus hijos, el sistema médico y la sociedad en todo el mundo. Para prevenir los resultados adversos, se han valorado diversas estrategias, como el control de la dieta, el ejercicio y la medicación. Entre ellas, la administración de dosis bajas de aspirina ha demostrado ser una de las formas más eficaces de prevenir el desarrollo y la progresión de la PE. Según su fisiopatología, la primera fase de la preeclampsia suele tener lugar en el primer trimestre, cuando una invasión inadecuada de trofoblastos conduce a una placentación anormal y a la subsiguiente insuficiencia uteroplacentaria. Durante este proceso, la paciente suele encontrarse en su fase subclínica, lo que permite una ventana para el cribado y la prevención³⁶.

La heparina de bajo peso molecular, la enoxaparina, el yoga, la L -arginina, el ácido fólico y la vitamina D solas o combinadas con calcio pueden utilizarse como factores rentables, disponibles y aceptables para prevenir la preeclampsia³⁴.

El ejercicio aeróbico se asocia con una reducción de los trastornos hipertensivos gestacionales ya que promueve la placentación y una reacción inmune más saludable en general. El control del peso materno, la ingesta elevada de fibra, el uso de probióticos, suplementos de calcio y vitamina D, suplementos multivitamínicos y evitar una dieta rica en sal y alimentos crudos también son factores protectores frente al desarrollo de PE. También se ha demostrado que una dieta de estilo mediterráneo rica en verduras, frutas y grasas saludables reduce los riesgos de preeclampsia³¹.

En resumen...

Los factores de riesgo de preeclampsia, como la raza, la edad materna avanzada, la obesidad, la nuliparidad, el embarazo gemelar y los trastornos médicos coexistentes, pueden servir como marcadores que exigen una mayor vigilancia del bienestar materno y fetal. La ecografía Doppler y los biomarcadores que incluyen la presión arterial media (PAM), el índice de pulsatilidad de la arteria uterina (UtA-PI), el PLGF y la proteína plasmática A asociada al embarazo en suero (PAPP-A) se pueden utilizar para predecir la preeclampsia. Para las mujeres con alto riesgo de desarrollar preeclampsia, la administración diaria de dosis bajas de aspirina desde el comienzo del embarazo ha demostrado ser la forma más eficaz de prevenir la preeclampsia. Antes, durante y después del parto, se debe intensificar el seguimiento y la preparación de las gestantes afectadas para evitar complicaciones graves de la preeclampsia. En casos graves, el parto del feto y la placenta es la solución definitiva para tratar la preeclampsia.

1.2 Alteraciones del crecimiento

La placenta constituye una barrera especializada entre la madre y el feto, es la ruta principal para la transferencia de nutrientes, gases y iones al feto y tiene un papel predominante en el crecimiento y desarrollo fetal.

En fetos sin patología, el crecimiento fetal depende fundamentalmente de un adecuado funcionamiento placentario (suministro de nutrientes y oxígeno), de una correcta regulación endocrina y de algunos factores epidemiológicos como una predisposición genética determinada en parte por la talla materna, peso materno y paterno al nacimiento o la etnia.

Uno de los parámetros que refleja de manera indirecta la existencia de una insuficiencia placentaria es la disminución del crecimiento fetal. La preeclampsia temprana se ha asociado con bajo peso fetal debido a la afectación vascular placentaria³⁷.

1.2.1. - Clasificación de los trastornos del crecimiento intrauterino:

- Se considera un **feto pequeño para edad gestacional (PEG)** aquel que tiene un peso fetal estimado (PFE) inferior al percentil 10 y mayor al percentil 3 para edad gestacional (EG) con estudio Doppler dentro de la normalidad.

- Se considera un feto con **crecimiento intrauterino restringido (CIR)**: la presencia de un PFE inferior al percentil 3; o la presencia de PFE inferior al percentil 10 con alteración del flujo cerebro umbilical o de las arterias uterinas. Los fetos CIR se clasifican en cuatro tipos (I-IV) según las alteraciones en el estudio Doppler, de menor a mayor gravedad³⁰.

De todos los procesos que potencialmente pueden dar lugar a un CIR, la patología placentaria es clínicamente la más relevante. El CIR, al igual que la preeclampsia, está asociado de forma significativa a una hipoperfusión e isquemia placentaria. Los fetos con CIR tienen un aumento de riesgo de deterioro fetal intrauterino, muerte fetal intrauterina y presentan peores resultados perinatales comparados con los fetos con crecimiento intrauterino normal³⁸.

1.2.2.- El papel de la ecografía en el diagnóstico de los trastornos del crecimiento intrauterino

La ecografía Doppler permite analizar el estado de la vascularización fetal y uterina, lo que es muy útil como indicador indirecto de función placentaria y de bienestar fetal.

Mediante Doppler pueden estudiarse vasos maternos o fetales, tanto arteriales como venosos. A efectos de este estudio, nombraremos brevemente los vasos más relevantes en la valoración del crecimiento fetal y la insuficiencia útero placentaria.

- **Doppler en arteria umbilical (AU)** Refleja el número de capilares y el estado de vasodilatación o vasoconstricción de los vasos vellositarios de la placenta, es decir, la capacidad de intercambio gaseoso entre el feto y la madre.

- **Doppler en arteria cerebral media (ACM)** aporta información valiosa acerca de la existencia del fenómeno de “brain sparing” o redistribución, que aparece cuando el flujo de sangre oxigenada hacia el feto está limitado y se dirige preferencialmente a órganos vitales como el cerebro y el miocardio mediante vasodilatación de su circulación, en detrimento de órganos no vitales (intestino, músculo, riñón, piel...).

- **Doppler de las arterias uterinas**, descrito en el apartado anterior (página 22).

El cribado de la ecografía Doppler de las arterias uterinas en la mitad de la gestación, valorando el índice de pulsatilidad (IP) identifica aquellas gestaciones de alto riesgo, con una sensibilidad de un 85 % para la preeclampsia precoz y para las formas graves de CIR. El estudio de las arterias

uterinas se puede realizar también en el primer trimestre de gestación, pero con una sensibilidad menor: del 27 % para la preeclampsia y del 12 % para el CIR.

1.2.3.- Cronología de la insuficiencia placentaria y adaptación fetal

Gracias al estudio Doppler, es posible conocer las distintas etapas en el proceso progresivo de redistribución circulatoria que se pone en marcha como un mecanismo adaptativo frente a la hipoxemia³⁹.

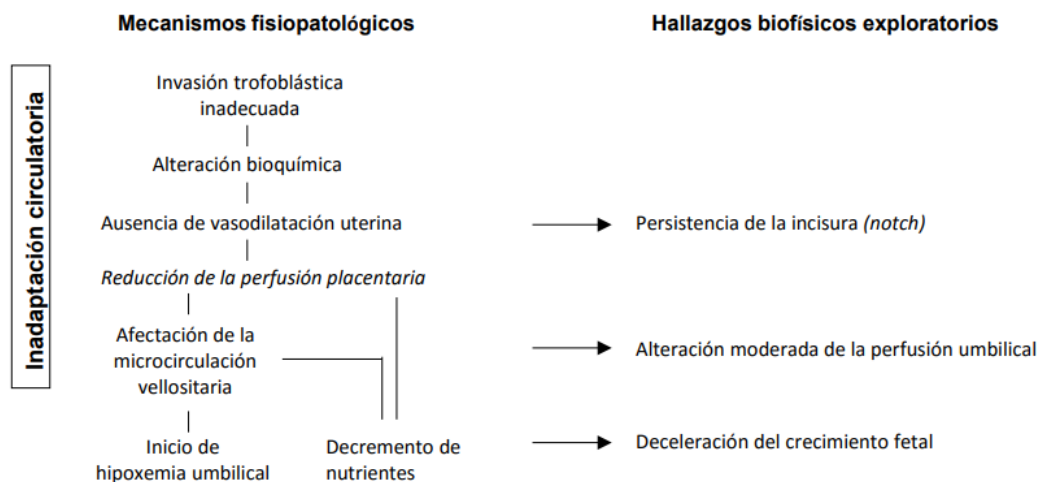


Figura 7-. Resumen de los mecanismos fisiopatológicos y hallazgos biofísicos en las fases del proceso de redistribución circulatoria fetal. En: Carrera, J. M., Figueras, F., & Antolín, E. (2003). Hemodinamia fetal: estudio mediante Doppler. Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia, 30(8), 242–269.

1.3 Vesículas extracelulares

En la Preeclampsia muchos procesos celulares como el crecimiento celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis y el sistema inmunitario materno funcionan de manera incorrecta, lo que conduce a la producción y liberación de fragmentos celulares involucrados en la señalización que da lugar a la disfunción endotelial, como las vesículas extracelulares (VEs) entre las que se encuentran las microvesículas o exosomas⁴⁰.

Las vesículas extracelulares (VEs), son estructuras con bicapa lipídica secretadas al medio extracelular por múltiples tipos de células tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Figura 8). Se han aislado de diversos fluidos corporales, incluido el semen, sangre, orina, leche materna, líquido amniótico, líquido de ascitis, líquido cefalorraquídeo, y la bilis⁴¹. Han sido reconocidas en los últimos 10- 15 años como transmisoras de mensajes clave en la comunicación molecular entre las células⁴².

Las diferentes clases de vesículas extracelulares integran redes de comunicación intercelular al transportar un subconjunto específico de proteínas, ácidos nucleicos como el RNAm y el microRNA (miRNA) y lípidos, todos específicos para las condiciones fisiológicas o patológicas de su célula de origen y que, al parecer, son cargados a las vesículas extracelulares de una forma determinada en lugar de constituir componentes aleatorios⁴³, permitiendo así el intercambio de información genética a distancia mediante el transporte de ácidos nucleicos, particularmente los microRNA^{44,45}.

Las VEs se clasifican en tres amplias clases basadas principalmente en su biogénesis, tamaño y presencia de proteínas, distinguiéndose entre exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, aunque la mayoría de los autores las engloban en vesículas extracelulares.

La población con el mayor tamaño de vesícula, los cuerpos apoptóticos, consisten en vesículas de tamaño heterogéneo, con un diámetro de 500 nm a 5 µm, y se desprenden de la membrana plasmática de las células moribundas que sufren la muerte celular programada. Las microvesículas, o ectosomas, como se denominan a veces, se considera que se desprenden de la membrana plasmática de las células viables y tienen un tamaño de 50 a 800 nm. Los exosomas tienen un tamaño de 30 a 150 nm y son originados a partir de la vía endocítica por la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática^{41,46,47}.

En situaciones fisiológicas, el papel de las VEs es fundamental para mediar la comunicación entre células con el fin de regular distintos procesos biológicos, transmitir señales, regular el sistema inmune, etc. En situaciones patológicas tienen un gran impacto favoreciendo la progresión y el mantenimiento de enfermedades mediante la liberación de material genético y proteínas, la transmisión de virus y patógenos y modificando el ambiente tumoral, haciéndolo más favorable al crecimiento del tumor, la invasión y la metástasis⁴⁸.

Actualmente se está investigando el uso de VEs con un fin terapéutico. Además de su efecto similar al inducido por la célula de origen, debido a su pequeño tamaño y flexibilidad, pueden atravesar membranas, por lo que podrían actuar como vehículo natural para agentes terapéuticos o vacunas. También se está estudiando su posible papel como biomarcadores para la detección precoz de distintas enfermedades, de ahí la importancia e interés de su estudio^{48,49}.

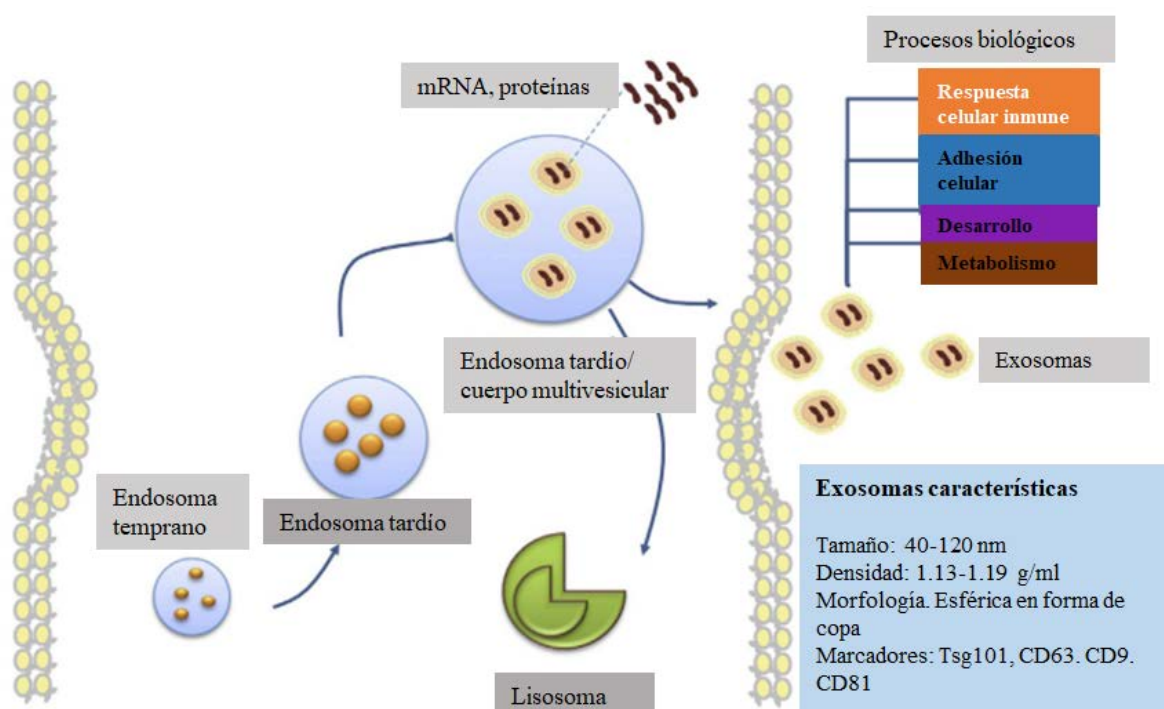


Figura 8-. Los exosomas se generan en la estructura endosomal incorporando la membrana plasmática en este proceso, y se secretan a través de vías endosómicas constitutivas en las que interviene el complejo de Golgi a partir de una amplia gama de tipos celulares, incluida la placenta humana. Modificada de: Mitchell, M. D., Peiris, H. N., Kobayashi, M., Koh, Y. Q., Duncombe, G., Illanes, S. E., Rice, G. E., & Salomon, C. (2015). Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. In American Journal of Obstetrics and Gynecology (Vol. 213, Issue 4, pp. S173–S181).

Las VEs derivadas de la placenta pueden representar una vía adicional por la cual la placenta se comunica con el sistema materno para inducir adaptaciones vasculares maternas al embarazo y desarrollo del intercambio vascular materno-fetal. Estos exosomas son únicos en comparación con otros exosomas debido a la presencia de proteínas como la fosfatasa alcalina de tipo placentario (PLAP) y HLAG (Complejo Mayor de Histocompatibilidad G)^{50,51}.

Se ha demostrado que los exosomas de origen placentario se liberan de la placenta a la circulación materna desde las siete semanas de gestación, y su concentración aumenta a lo largo de la gestación. Los exosomas placentarios en la circulación materna producen activación de las células T circulantes, lo que representa un papel esencial para evitar una respuesta inmune excesiva y para favorecer el desarrollo de tolerancia inmune en el embarazo humano normal⁴⁵.

En la Preeclampsia, la disminución del flujo sanguíneo uteroplacentario asociado a una invasión trofoblástica alterada que puede conducir a hipoxia placentaria y disfunción endotelial, lo que conlleva la liberación de materiales nocivos en la circulación, que ocasiona daños en la función

endotelial. Se han descrito cambios en la liberación, concentración en plasma materno, composición y actividad de vesículas placentarias en asociación con la Preeclampsia, que podrían estar involucrados en la patogénesis del síndrome. Su cuantificación en el plasma materno puede ser un indicador útil de la función placentaria y pueden ser utilizados como un nuevo potencial biomarcador para el diagnóstico de PE. Sin embargo, la función precisa y la importancia de los exosomas placentarios durante el embarazo aún no se han dilucidado⁴⁰.

1.4 MicroRNAs (MiRNAs)

Los microRNAs, son una clase de pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional degradando o bloqueando la traducción de las dianas de los RNA mensajeros (RNAm). Están constituidas por 21-25 nucleótidos y son capaces de interferir y/o regular la expresión de otros genes⁵².

Se considera que 10-30% de las regulaciones de expresión de genes son llevadas a cabo por los microRNAs. Existen unos 2.500 microRNAs y 1.000 de ellos están validados sólo en humanos⁵³.

Miles de RNA mensajeros (RNAm) humanos son objetivos de los microRNAs y un solo microRNA puede dirigirse a cientos de ARNm⁵⁴. Juegan un papel importante en el desarrollo, el metabolismo, la diferenciación celular, la proliferación, el control del ciclo celular y la muerte celular⁵⁵ y su desregulación se asocia con una variedad de enfermedades humanas, como infecciones virales⁵⁶, enfermedades cardiovasculares⁴¹ y el cáncer⁵⁷.

Los microRNAs se pueden detectar en fluidos corporales, como plasma⁵⁸, suero⁵⁹, saliva⁶⁰ y orina⁶¹. Este hecho los convierte en candidatos ideales para ser usados como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico no invasivos en diversas patologías, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y también patologías del embarazo⁶².

Existe una disminución de la expresión de los microRNAs en los cánceres humanos, lo que sugiere que los microRNAs pueden actuar como supresores de tumores. Además, los tumores pobremente diferenciados tienen niveles menores de microRNAs cuando se comparan con los bien diferenciados⁵⁷. Los cambios en el número de copias de algunos genes regulados por microRNAs pueden ser comunes a varios tipos de tumor, como el cáncer de ovario, el cáncer de mama y el

melanoma, mientras que otros de estos cambios genómicos pueden ser únicos a un tipo de tumor específico⁶³.

Los microRNAs expresados pueden ser liberados al medio de forma libre o en el interior de VEs, por lo que los resultados obtenidos del plasma pueden darse por ambas situaciones. De esta forma, el tratamiento con RNasas permite la eliminación de los microRNAs no protegidos por una vesícula, impidiendo que interfieran en los resultados. La presencia en el interior de las VEs de patrones de microRNAs y ribonucleoproteínas, las cuales estabilizan y condicionan la disposición de los microRNAs, es determinante para comprender cómo este mecanismo está regulado a nivel celular⁶⁴.

Como se ha explicado anteriormente, los microRNAs están implicados en varios procesos críticos, como el desarrollo, la diferenciación celular y la migración. También contribuyen a la concepción y el mantenimiento del embarazo al regular procesos clave como la inflamación, la tolerancia inmunitaria, la angiogénesis y la apoptosis. La expresión aberrante de microRNAs se encuentra en varios trastornos relacionados con el embarazo, como la PE, la restricción del crecimiento y el parto prematuro⁶⁵. Se han observado perfiles de expresión alterados de microRNAs específicos en muchos tejidos, incluida la placenta, la circulación materna y la orina de mujeres preeclámpticas, destacando su papel en la patogénesis de la enfermedad y su potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico⁶⁶. Estas vesículas también desempeñan un papel en la promoción de la tolerancia inmune materna en el feto al suprimir los componentes de señalización de las células T maternas⁶⁷.

Los niveles elevados de exosomas en la circulación materna junto a las diferencias observadas entre la PE de aparición temprana y la tardía llevan a suponer que los exosomas pueden servir como mediadores en la patogénesis de la PE. Los exosomas regulados positivamente en la PE de inicio temprano se han asociado con la función del sistema cardiovascular, la angiogénesis y la formación de lesiones trombóticas placentarias. Mientras que los exosomas regulados positivamente en la PE de aparición tardía se han vinculado con el metabolismo de los lípidos, el estrés oxidativo, la inflamación y la resistencia a la insulina^{68,69}.

La primera evidencia que relaciona los microRNA y la PE se encontró en el estudio de Pineles et al de 2007⁷⁰. Determinaron que los miR-210 y miR 182 estaban sobreexpresados en placentas preeclámpticas. Los objetivos de ambos microRNA están involucrados en procesos inmunes, lo

que proporciona otra línea de evidencia que respalda la asociación entre PE y respuestas inmunes anormales.

Salomon y cols. afirmaron que la cuantificación de exosomas derivados de la placenta en la sangre de mujeres embarazadas junto con la cuantificación de la expresión de hsa-miR-486-1-5p y hsa-miR-486-2-5p puede ser útil en la identificación del riesgo de la PE⁷¹.

Se han descrito microRNA específicos no solo para la PE si no, también para algunos trastornos asociados al embarazo como retraso de crecimiento intrauterino (RCIU)⁷².

En los últimos años, la secuenciación de próxima generación (NGS) se ha convertido en el enfoque principal para la elaboración de perfiles globales de microRNA porque demuestra una alta sensibilidad y reproducibilidad en comparación con otras tecnologías y, al mismo tiempo, facilita su cuantificación absoluta. La aplicación de la tecnología NGS a la placenta y la sangre materna ha dado resultados prometedores. Mavreli et al.⁷⁴, analizaron la expresión de 1682 microRNA en una población no seleccionada de 2437 mujeres embarazadas caucásicas entre las 11+0 y las 13+6 semanas de gestación. Los autores demostraron que 387 estaban regulados positivamente, 95 regulados negativamente y el resto tenían niveles de expresión similares entre ambos grupos. La sobre o infraexpresión de dos microRNAs, miR-99b-5p y miR -23b-5p, se asocia con el desarrollo posterior de preeclampsia de aparición tardía, lo que implica que estos microRNA alterados posiblemente estén implicados en los mecanismos patogénicos que conducen a la aparición de PE tardía y pueden servir como biomarcadores no invasivos candidatos para la predicción y prevención tempranas.

En un estudio reciente de Timofeeva et al.⁷³ encontraron una expresión irregular de ciertos microRNAs en muestras de 54 mujeres embarazadas susceptibles a la preeclampsia. Yoffe et al ⁷⁴ también investigaron pequeños RNA no codificantes (ncRNAs), incluyendo microRNAs en el plasma materno del primer trimestre de 75 muestras de PE y de control e identificaron 25 transcritos expresados de forma aberrante entre los dos grupos.

Hay otra serie de microRNAs que han sido estudiados en Ginecología. El perfil de expresión entre miR-21, miR-126 y miR-146 podría considerarse marcador molecular de corioamnionitis. Los resultados de los estudios muestran que la corioamnionitis produce variaciones en la expresión de estos microRNAs: disminución del miR-21, incremento en la expresión del miR- 126 y miR-146.

Este hallazgo es consistente con otros estudios que han reportado la detección de los microRNAs en suero y que se han asociado con la respuesta inflamatoria en diferentes enfermedades⁷⁵.

En las pacientes con endometriosis las expresiones de hsa-miR-21 y hsa-miR-210b aumentaron significativamente. La detección de microRNAs circulantes en el plasma y otros fluidos permite utilizarlos como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de endometriosis⁷⁶.

La etiología del síndrome de ovario poliquístico (SOP), una endocrinopatía heterogénea, engloba rasgos genéticos complejos asociados a factores epigenéticos, como las diferencias en la expresión de microRNAs en diversos tejidos. MiR-21-5p, miR -23a-3p y miR-26a-5p circulantes están aumentados en mujeres con SOP en comparación con controles normo ovulatorios sanos. Estos microRNAs en combinación, se han relacionado con vías implicadas en la señalización de insulina, la biosíntesis de esteroides y la regulación endotelial, así como en la foliculogénesis⁷⁷.

Hoy en día, el análisis de microRNAs circulantes en fluidos corporales como sangre periférica, saliva y orina, se plantea como marcador no invasivo, diagnóstico y pronóstico para la detección temprana de complicaciones asociadas al embarazo, el seguimiento de enfermedades, la predicción del pronóstico, y también el tratamiento de los pacientes, siendo uno de los retos de investigación más importantes. Algunos microRNAs expresados en la placenta están relacionados con complicaciones del embarazo. Muchas de estas enfermedades, como la PE, el embarazo ectópico, la restricción del crecimiento intrauterino, el parto prematuro o la diabetes mellitus gestacional son causadas por la expresión aberrante de microRNA placentarios⁶².

2.-HIPÓTESIS

Existe amplia evidencia en la literatura de que tanto la preeclampsia como los trastornos del crecimiento intrauterino están significativamente asociados con alteraciones en la síntesis de mediadores bioquímicos y moleculares, y la liberación de vesículas extracelulares (exosomas) que modulan los micro RNA mensajeros, contribuyendo a una comunicación celular defectuosa que afecta tanto al desarrollo fetal como a la salud materna. Sin embargo, la comprensión detallada de estos mecanismos en el contexto de la preeclampsia y los trastornos del crecimiento intrauterino aún es limitada. Por este motivo, nuestra hipótesis de trabajo a la hora de plantear esta tesis fue tratar de conocer con más detalle la influencia de los exosomas como mediadores de la comunicación intercelular en la fisiopatología de estas patologías.

3.-OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

El objetivo principal del presente trabajo es:

- Analizar los biomarcadores y VEs plasmáticas totales y placentarios de pacientes con preeclampsia, trastornos de restricción del crecimiento (PEG, CIR) y en controles sanos (gestaciones normales).

3.2 Objetivos específicos

- Identificar los factores de riesgo clínicos que puedan estar relacionados con la aparición de enfermedad en los distintos grupos de estudio.
- Conocer las características clínicas generales presentes en los distintos grupos de estudio.
- Cuantificar las vesículas extracelulares su relación con patología materno-fetal, preeclampsia y trastornos del crecimiento.

- Analizar el contenido de las Vesículas Extracelulares (microRNAs, mRNA) de las diferentes patologías del estudio que puedan servir de biomarcadores de la enfermedad, permitiendo distinguir a pacientes con preeclampsia o restricción del crecimiento fetal de las embarazadas sanas.
- Buscar potenciales biomarcadores genéticos en la sangre periférica de los pacientes que permitan diagnosticar precozmente y establecer el pronóstico de las mujeres con preeclampsia, con el fin de reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular futura de la madre y del recién nacido.
- Establecer la posible correlación entre la concentración de Vesículas extracelulares y biomarcadores detectados en la sangre periférica de los pacientes con las características clínicas o analíticas de interés.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

Se trata de un estudio prospectivo de casos y controles, entendiendo por casos mujeres gestantes con clínica compatible con PE o gestaciones con retraso de crecimiento intrauterino (PEG, CIR) y por controles, mujeres sanas, con gestaciones evolutivas de curso normal y con una edad gestacional y características clínicas similares a las de los controles.

Teniendo en cuenta que el número de partos en nuestro centro, el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, es de 1800/año, la incidencia estimada de PE en nuestro medio es del 3%, por lo que el tamaño muestral calculado necesario para un nivel de confianza del 95% con un margen de error del 10% es 10 sujetos en cada grupo.

Se analizaron de forma prospectiva las características clínicas y biológicas de 120 pacientes diagnosticadas de Preeclampsia (Precoz < 34 semanas y Tardía > 34 semanas), CIR y PEG y controles sanos procedentes del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Salamanca. Para la clasificación de las pacientes con PE se siguieron los criterios descritos por la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP). Para la clasificación de los trastornos del crecimiento intrauterino se siguieron los criterios publicados por la Sociedad Internacional de Ultrasonidos en Obstetricia y Ginecología (ISUOG)⁷⁸.

Se estudiaron las muestras de sangre periférica y placenta de 40 pacientes (10 pacientes sanos, 10 pacientes con PEG, 10 pacientes CIR, 10 pacientes con preeclampsia precoz y 10 pacientes con preeclampsia tardía) para encontrar potenciales marcadores genéticos en la sangre periférica de los pacientes que permitan diagnosticar precozmente y establecer el pronóstico de las mujeres con preeclampsia e identificar biomarcadores de la enfermedad.

Se utilizaron las muestras de sangre periférica de 4 gestantes sanas, 4 pacientes diagnosticadas de PEG, 4 pacientes CIR y 8 pacientes con Preeclampsia Precoz y Tardía para analizar y caracterizar el contenido de las VEs (microRNA) de las diferentes patologías del estudio.

En todos los casos, las pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado y hoja de información al paciente (Anexo 1 y 2). Los procedimientos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Salamanca, de acuerdo a los principios éticos de la declaración de Helsinki⁷⁹.

4.2. Criterios de inclusión:

Para poder participar en el estudio las pacientes debían ser mayores de edad, con gestaciones únicas, que dieran su consentimiento por escrito mediante la firma del consentimiento informado y cumplieran con las siguientes características:

- Grupo control: Gestantes sanas, normotensas, con gestaciones de evolución normal y fetos en percentil adecuado para su edad gestacional según las exploraciones ecográficas llevadas a cabo en el embarazo, sin alteraciones genéticas o malformaciones fetales asociadas, con características clínicas (edad, peso) y gestacionales (edad gestacional) similares a los grupos de estudio.
- Grupo preeclampsia: gestantes con criterios clínicos de Preeclampsia, sin otra patología intercurrente asociada.
- Grupo CIR: gestantes con fetos cuyo peso estimado por ecografía estuviera en percentil <3 o <10 y asocien alteraciones del Doppler (ratio cerebroplacentario <p5, IP de las Arterias Uterinas >p95).
- Grupo PEG: gestantes con fetos cuyo peso estimado por ecografía estuviera entre los percentiles 3 y 10, con estudio Doppler normal.

4.3. Criterios de exclusión:

Pacientes menores de edad, que rechazasen participar en el estudio o no reuniesen las características requeridas para el mismo.

4.4. Datos del estudio prospectivo:

Para realizar el análisis de los factores clínicos y biológicos que pudieran tener impacto en el desarrollo de los síndromes materno fetales se analizaron un total de 120 pacientes durante junio de 2019 a enero de 2022.

Se utilizó una hoja de recogida de datos y se complementó la información con la recogida a lo largo del seguimiento de control del embarazo en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, incluida en el anexo 3.

Los datos de cada gestante fueron incluidos en una base informática creada para el estudio, para su posterior correlación con los resultados de laboratorio obtenidos de las gestantes incluidas y sus diferentes tipos de muestras.

La recogida de los diferentes tipos de muestras se realizó en dos momentos diferentes:

- En el momento de llegar a paritorio, obteniendo una muestra de sangre periférica con dos tubos de 10 cc de EDTA (ácido edético y ácido etilenodiaminatetraacético) y dos tubos de 10 cc de heparina sódica
- En el momento del parto, obteniendo un fragmento de 2 x 2 cm de placenta que se conservó en PBS (tampón fosfato alcalino) hasta su llegada al laboratorio para su análisis.

4.5. Procesamiento de las muestras

4.5.1. Placenta

Materiales y reactivos

- PBS (phosphate buffered saline)
- Trizol
- Lisis 1x
- Cloruro amónico (CLNH₄).....82,92g
- Bicarbonato potásico (KHCO₃).....10 g
- EDTA.....372 mg
- Agua destilada.....1L

Se recibió en laboratorio un cotiledón de placenta en un frasco de 150 ml de polipropileno estéril con PBS. Se colocó en una placa de Petri con una pequeña cantidad de PBS y se disgregó mecánicamente, finalmente se filtró en un filtro de 40 nm(nanomol) y se centrifugó durante 5 minutos a 2800 rpm para quedarnos con el pellet.

El pellet se lisó con CLNH4 1X durante 20 minutos en frío, se lavó con PBS y se centrifugó a 2000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos. Se repitió el mismo proceso nuevamente hasta comprobar que no quedaban eritrocitos. Al pellet se añadió 1 ml de trizol y se congeló a -80°C hasta su posterior extracción de RNA.

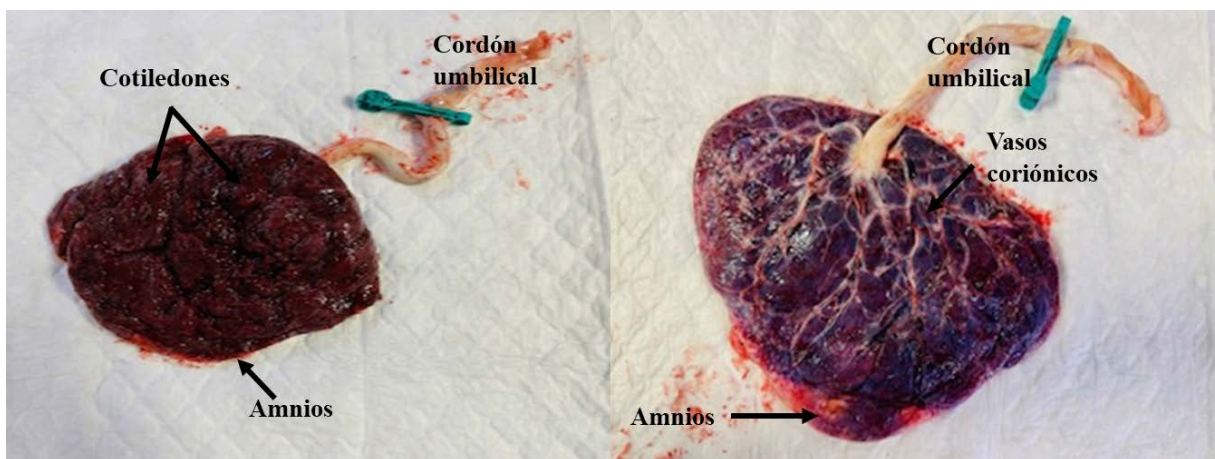


Figura 9-. Morfología de la placenta. Imagen propia modificada con biorrender.com

A) Superficie materna. La apariencia característica de empedrado se debe a unos lóbulos a los que se les denomina cotiledones. Se pueden ver de 15 a 20 cotiledones a simple vista, pero microscópicamente hay más de 200.

B) Superficie fetal. Placa corial revestida por el amnios. Es la cara brillante. El cordón umbilical se une a esta superficie. Los vasos sanguíneos que irradian desde el cordón umbilical hacia las vellosidades coriónicas y de las vellosidades hacia el cordón, son visibles a través del amnios transparente.

4.5.2. Obtención del plasma de sangre periférica

La sangre periférica del paciente (alrededor de 10 ml) se extrajo mediante punción venosa, y fue recogida en tubos con EDTA y Heparina, como anticoagulantes. Los tubos fueron centrifugados a 1800rpm durante 20 minutos formándose dos fases: un precipitado de células sanguíneas (desecho) y el sobrenadante formado por el plasma. Este plasma se mantuvo a -80°C hasta la realización de los estudios que conlleva esta tesis (Figura 10).

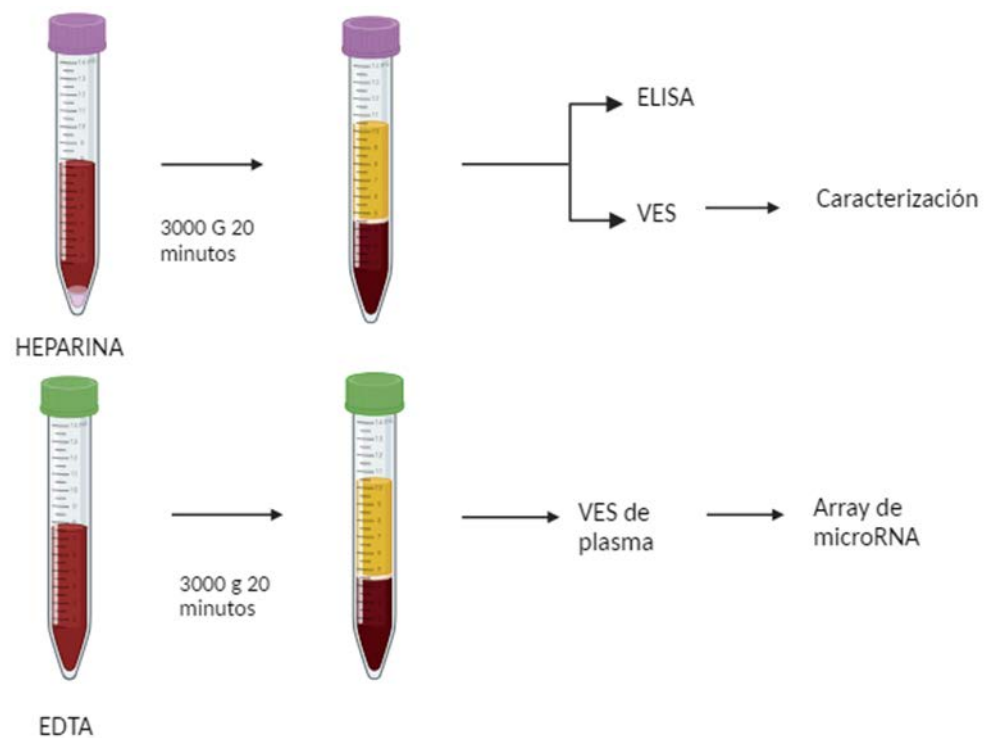


Figura 10-. Pasos realizados a través de la obtención del plasma de sangre periférica.

4.6. Análisis de la expresión génica en placenta

4.6.1. Extracción de RNA

Se realizó a partir de la placenta utilizando el método de tiocianato-fenol-cloroformo⁸⁰.

Reactivos Necesarios:

- Trizol: TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, USA)
- Cloroformo (Sigma, Aldrich)
- Isopropanol (Merk, USA)
- Etanol (Miltenyi Biotec, Merck KGaA, Germany)

Método:

Para la extracción de RNA, las células resuspendidas en Trizol como hemos comentado anteriormente, se descongelaron en frío y se les añadió cloroformo con el fin de romper las células y así obtener el material genético. Posteriormente las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C de modo que la muestra quedó separada en tres fases de las cuales la fase superior acuosa, que contenía el RNA se transfirió a un eppendorf nuevo. A esta capa acuosa se le añadió Isopropanol frío y se mezcló manualmente. Los eppendorfs se guardaron a -20°C hasta la mañana siguiente que se centrifugaron. El pellet de RNA se hidrató con etanol frío al 70% y tras la centrifugación se resuspendió en agua libre de nucleasas.

Una vez obtenido, la concentración e integridad del RNA se determinó empleando un espectrofotómetro NANOdrop (Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA) con el kit RNA 6000 Nano LabChip).

4.6.2. Reacción en cadena de polimerasa(RT-PCR) de genes implicados en patología placentaria.

Reactivos Necesarios:

✓ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

✓ FAST Universal PCR Master Mix

✓ Primers específicos: TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) descritos en la Tabla x.

* High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit contiene: dNTPs with dTTP 100mM, MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/μl, 10x RT Buffer, RNase Inhibitor 20U/μl, RT Random Primers, 10x.

Método:

Se realizó la transcripción reversa de 2.000ng de RNA total utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. La reacción se incubó en un termociclador en las siguientes condiciones:

10minutos a 25°C, dos horas a 37°C y 5 segundos a 85°C.

Para analizar la expresión de los genes de interés, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR en placas MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems). Para ello, se añadieron 2μl del cDNA obtenido en el paso anterior a un volumen de 8μl de Master Mix compuesta por 5μl de FAST Universal PCR Master Mix, 2,5μl de agua destilada y 0,5μl del primer específico correspondiente al gen de estudio llegando a un volumen final de 10μl que se incubó en el termociclador Step One Plus Real-Time PCR System en las siguientes condiciones:

15 segundos a 95°C y 40 ciclos de 1 segundo a 95°C - 20 segundos a 60°C.

El gen control GADH) se empleó como control para normalizar la expresión de los genes en estudio. Los CTs sirvieron para cuantificar la expresión de los genes del estudio con respecto al control. La cuantificación relativa se contabilizó como $\log_2$ – siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Gene}} - Ct_{\text{Control}}$$

Tabla 2-. Primers empleados para el estudio de genes mediante RT-PCR.

Símbolo Gen	Nombre	ID
ENG	Endoglin	Hs00923996
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	Hs00153153
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4	Hs00370078
CDH1	Cadherin 1	Hs01023895
CDH5	Cadherin 4	Hs00901470
IL6	Interleukin 6	Hs99999032
ANGPT2	Angiopoietin 2	Hs00169867
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Hs99999905

4.7. ELISA

Reactivos Necesarios:

- Human Endoglin microplate
- Human Endoglin conjugate
- Human Endoglin standart
- Assay Diluent RD1S
- Calibratos Diluent RD5K
- Wash Buffer Concentrate
- Color Reagent A
- Color Reagent B
- Stop Solution (ácido sulfúrico)
- ELISA Kit R&DSsystems

Método:

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteína endoglin presente en el plasma de pacientes con PE (precoz y tardía), CIR y PEG se procedió a realizar la técnica de ELISA, siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Para ello, se preparó la curva estándar presente en el kit y se añadieron 50µl del plasma. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente con el diluyente durante 2h en agitación. Después de los lavados, se añadieron 200µl de anticuerpo de endoglina conjugado a cada pocillo. Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente, repitiéndose los lavados posteriores. Tras lo cual se añadió 200 µl de sustrato en cada pocillo de la placa con cada una de las muestras. Se incubaron posteriormente durante 30 minutos a temperatura ambiente protegiéndose de la luz. Finalmente se añadió 50 µl de ácido sulfúrico (solution stop) a cada pocillo provocando el cambio de color de azul a amarillo. Se determinó la densidad óptica en un lector de microplacas establecido en 450 nm empleando el software XFLUOR4 Versión V 4.50.

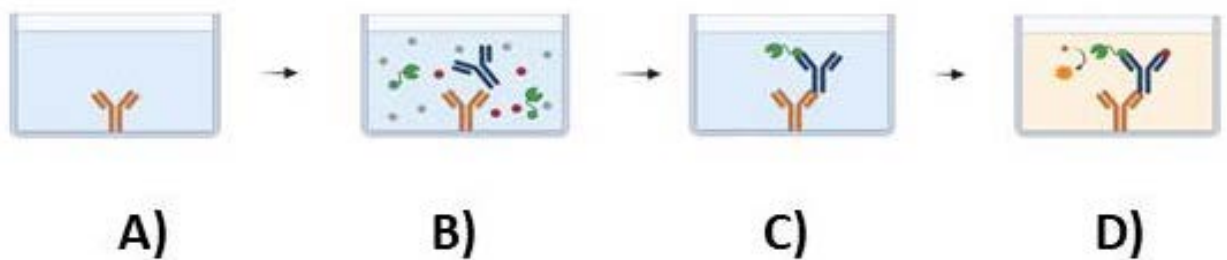


Figura 11-. Proceso de la técnica de Elisa: A) Pocillo con anticuerpo secundario; B y C) Anticuerpo de captura, conjugado y muestra añadida compiten por la unión; D) Reacción enzimática con color. Imagen propia, creada con biorrender.com

4.8. Aislamiento de las vesículas extracelulares procedentes del plasma

De los plasmas recogidos, procesados y congelados en el momento del parto, se procedió a extraer las vesículas extracelulares procedentes del plasma de nuestras pacientes para los diferentes estudios que se detallan en la Figura 12

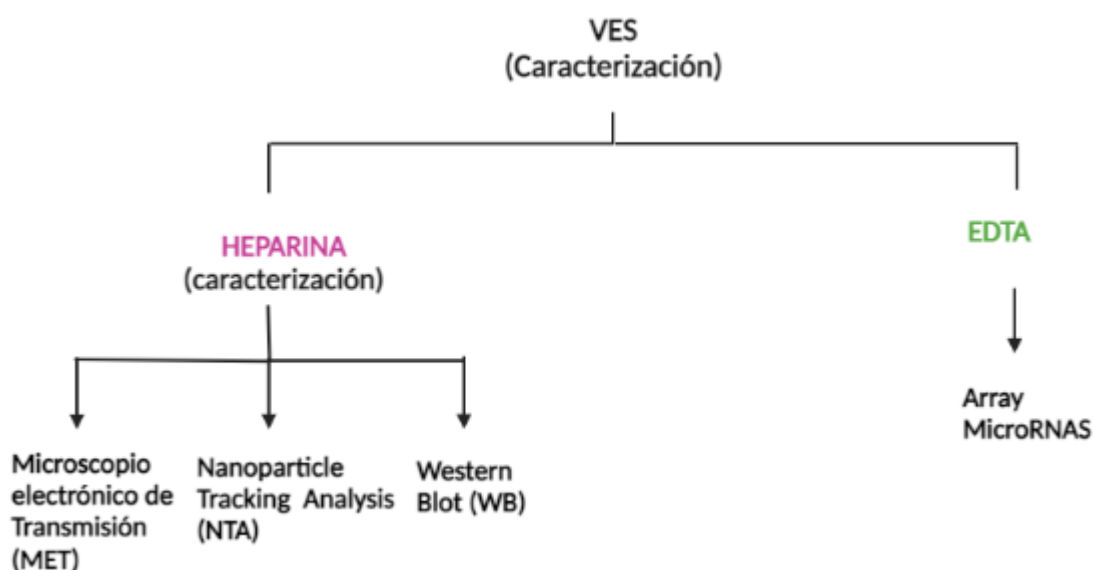


Figura 12-. Estudios realizados con las VEs extraídas del plasma de la SP de las embarazadas

4.8.1. Caracterización de VES

La caracterización de las vesículas se llevó a cabo según los criterios que las define⁴². Para ello, realizamos tres técnicas:

Microscopia electrónica de transmisión (MET):

Para el análisis de las VEs mediante microscopía electrónica, una vez ultracentrifugadas las muestras y tras haber sido lavadas con PBS doblemente filtrado, el pellet con las VEs se resuspendió en 150µl de PBS. A continuación, se fijaron en paraformaldehído al 2%, se extendieron en rejillas recubiertas de carbono (Formvar/carbon coated EM grids) y se volvieron a fijar en 1% de glutaraldehído. Las muestras fueron contrastadas con una solución de uraniloalato y fotografiadas en un microscopio electrónico (FEITecnaí G2, Spirit Biotwin) equipado con una cámara digital (Morada, Soft Imaging System, Olympus). Este trabajo se realizó en el Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Madrid (Figura 7).

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

El análisis de la cantidad de partículas/ml y de la distribución de tamaños de estas partículas se realizó mediante NTA empleando un equipo Nanosight (Nanosight LM10 instrument, Nanosight Ltd., UK) equipado con una cámara sCMOS y con el software de análisis NTA 3.1. Para ello, tras la

ultracentrifugación de las muestras, el pellet de VEs se resuspendió en 1ml de suero fisiológico doblemente filtrado. Las muestras fueron diluidas 1:100 antes de su adquisición debido a la alta concentración de partículas. Las condiciones de adquisición fueron de 25°C y una viscosidad de 0,8-1cP. Se realizaron 3-5 capturas por triplicado durante 60 segundos en cada muestra y el umbral (threshold) se estableció en 2-3. Los resultados se expresaron como la media de los 3 triplicados y su desviación estándar. Las mediciones y análisis de Nanosight se llevaron a cabo por el Departamento de la Universidad de Salamanca de Bioquímica y Biología Molecular Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos (HEVEPHARM) Instituto Biomédica de Salamanca (IBSAL) Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) Biología Molecular (Figura 7).

Western Blot (WB):

Reactivos Necesarios:

- Solución de lisis*
- Tapón de carga*
- Acrilamida: 30% Acrilamide/Bis Solution (Bio-Rad Laboratories, China)
- Running buffer: 10x Tris/Glicine/ Dodecil Sulfato Sódico (SDS) Buffer for SDS.PAGE applications (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Marcador de peso molecular: Precisión Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad, USA)
- Leche: Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, USA)
- Kit de transferencia: iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Regular (Novex Life Technologies, Israel)
- Anticuerpo monoclonal de mouse anti-CD63 humano (ABCAM)
- Anticuerpo secundario anti-mouse (NA931V)
- Solución de revelado (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories, USA)

* Solución de lisis: Se preparó con los componentes del kit RIPA Lysis Buffer system (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) al que se añadió un 1% PMSF, un 2% de inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail) y ortovanadato (sodium orthovanadate).

*Tampón de carga: Se preparó mezclando 8% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 40% glicerol y 2% β -mercaptoetanol en Tris H-Cl 200mM de pH 6.8.

Método:

Para su caracterización mediante Western Blot, las VEs obtenidas mediante ultracentrifugación, se lavaron con PBS y el pellet obtenido se resuspendió directamente en 150ul solución de lisis que se incubó en hielo durante 20 minutos. Seguidamente, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C en una microcentrífuga refrigerada para eliminar los elementos no solubles y quedarnos con el sobrenadante donde están las proteínas.

Los extractos de proteínas fueron resuspendidos en un volumen igual de tampón de carga para su desnaturalización a una temperatura de 100°C durante 5 minutos. Una vez desnaturalizadas, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% preparados según describió Laemmli⁸¹ y para la electroforesis de las muestras aplicando un voltaje de 100-120V. La transferencia de proteínas del gel a la membrana de PVDF se llevó a cabo en el aparato iBlot® Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) durante 7 minutos. La membrana se bloqueó con leche al 5% durante 1 hora.

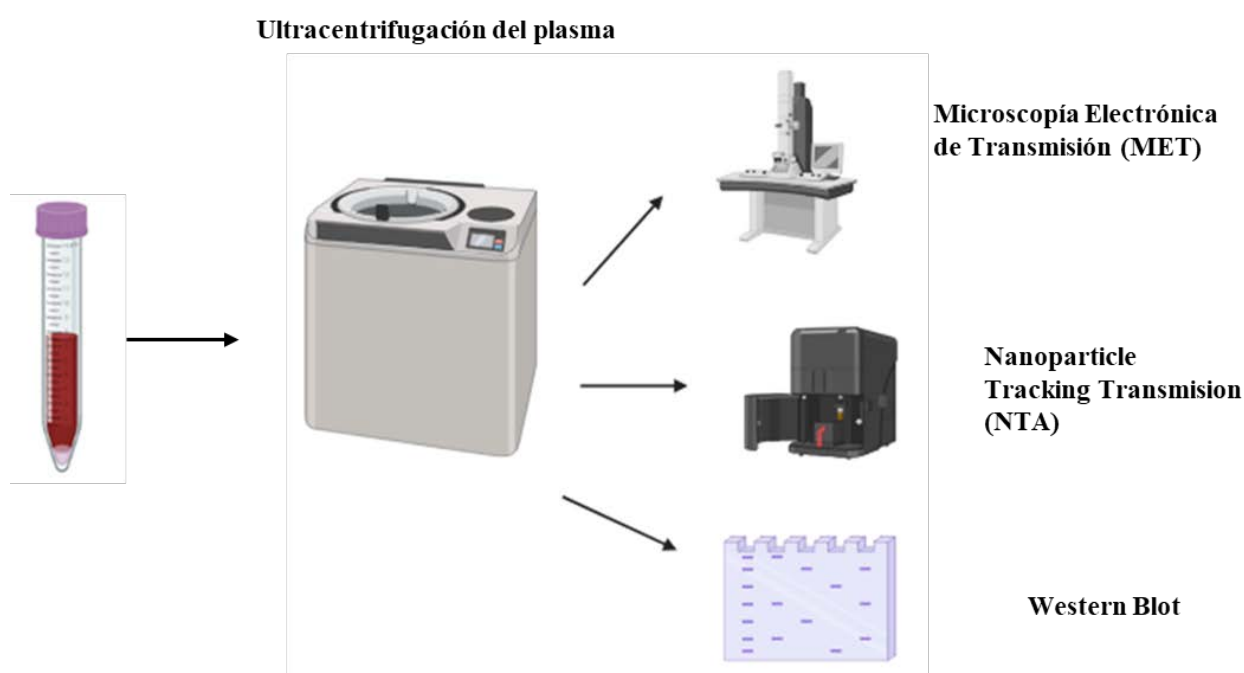


Figura 13-. Caracterización de VEs. Imagen propia, creada con biorrender.com

A continuación, se incubó con el anticuerpo primario antiCD63 humano a una dilución 1:500 a 4°C durante la noche. Tras varios lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución 1:5000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de sucesivos lavados se procedió a la visualización utilizando el modelo iBright FL 1500 Imaging Systems (Thermofisher) para la adquisición de imágenes de WB (Figura 7).

4.8.2. Análisis de expresión de microRNAs de VEs de plasma de EDTA

Reactivos Necesarios:

- Megaplex RT primers
- dNTPs
- MultiScribe Reverse Transcriptase
- RT Buffer
- MgCl₂
- RNase Inhibidora
- Agua libre de nucleasas

Método:

A partir de las VEs de plasma procedente de los tubos de EDTA se obtuvo su RNA mediante el método con trizol en el apartado anterior de expresión génica en placenta.

La concentración de RNA fue cuantificada usando el Nanodrop. Se estudió el contenido en microRNAs de VEs procedentes de 4 gestantes control, 4 CIR, 5PEtardía, 3 PEprecoz y 4PEG. Para el estudio se utilizaron las tarjetas de microRNAs -A humano que contienen 384 ensayos de microRNAs Taqman de Affimetrix que cuantifica 377 microRNAs (ANEXO 4). Como la cantidad de RNA era inferior a 350ng las instrucciones de la casa comercial recomendaba realizar un paso de preamplificación. Se preparó la reacción mixta usando el kit de Megaplex™ Pools For microRNA Expression Analysis (Applied Biosystems). 4.5 µl de la mezcla fueron usados con 3µl de cada muestra. Según las indicaciones propuestas por el protocolo del kit, realizando una transcripción reversa (RT) del contenido en RNA con las siguientes condiciones: 7900 HT usando STd en 40° ciclos a 42° C durante 1 minuto, 50° C durante un segundo, 85 °C 5 minutos y finalmente 4°C hasta

ser almacenada. El cDNA obtenido (DNA complementario) puede ser guardado a (-15°C-25°C) durante al menos una semana. El siguiente paso fue preparar la reacción de preamplificación para aumentar la cantidad de copias de material genético presente en las VEs, para ello se mezclaron los siguientes reactivos: TaqMan PreAmp Mix con Megaplex PreAmp Primers (10X) y agua libre de nucleasas con 2.5ul del producto obtenido de la reacción anterior (RT) y se incubaron en las siguientes condiciones: 9700 HT usando STd a 95°C durante 10 minutos, 55°C durante 2 minutos, 72°C durante 2 minutos, 95°C durante 15 segundos. Estas condiciones se mantienen durante 12 ciclos, posteriormente 4 minutos durante 60°C, 99.9°C durante 10 minutos y la reacción se mantiene a 4°C.

Estos procesos se realizaron en el equipo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Finalmente, 9ul del producto de la reacción anterior se mezcló con 991ul de TaqMan Master Mix y agua. Una vez resuspendido y mezclado se cargaron 100ul en cada pocillo de la tarjeta para cada paciente. La reacción se llevó a cabo en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) acoplado al software SDS 2.2.2 en: las condiciones del ciclo 94.5°C durante 10 minutos, 97°C-30'' (50 ciclos) y 59.7°C durante 1min. Los datos de Cts se exportaron en formato Excell para su análisis bioinformático.

La expresión de los microRNAs se analizó con la plataforma de Affimetrix DataAssit v3.0.1. Los CT para cada microRNA se normalizo con la expresión de los microRNAs controles (RNU48 y snRNA-U6) menos el valor del Ct para cada target para que el sentido de la expresión sea directamente proporcional al valor de dCt. Además, se calcularon los Fold change (FC; $2^{-\Delta CT}$). El análisis de la expresión diferencial de estos microRNAs se realizó utilizando Limma en R. Se consideraron como estadísticamente significativos los microRNAs que presentaban un q-valor (p-value adj) menor de 0.05 o o fold change [$\leq 0,5$ y ≥ 2] con respecto al grupo de referencia.

Para estudiar los genes regulados por estos microRNAs y las rutas biológicas en las que están implicados se utilizó la base de datos miRBase y mirPath v.3 (Diana Tools) respectivamente.

4.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 26.

En todos los casos, se calculó la media y desviación estándar, así como la mediana y su rango. Para analizar la diferencia entre los grupos se utilizó el test de Friedman para ver entre que grupos existían diferencias y posteriormente analizar grupo a grupo con el test de u de Mann Whitney. Se consideraron diferencias significativas cuando los valores era $p < 0.05$.

5.- RESULTADOS

5.1. Estudio de los pacientes

5.1.1. Características generales

Durante los 3 años del estudio se han reclutado un total de 120 pacientes con gestaciones con fetos Pequeños para la Edad Gestacional (PEG), Preeclampsia Precoz, Preeclampsia Tardía y Retraso del Crecimiento Intrauterino (CIR).

Las características generales de las pacientes se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3-. Características generales de las pacientes del estudio. Variables cuantitativas: Edad; peso, IMC (índice de masa corporal), TA (tensión arterial); Edad Gestacional al final de la gestación; peso fetal; peso placenta. Variables cualitativas: Hábito tabáquico, etnia, embarazo, AAS (ácido acetil salicílico), IPM (índice de pulsatilidad media) de arterias uterinas (>95 percentil semana 20 o 24s).

VARIABLES CUANTITATIVAS				
Variable	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
Edad (n= 116)	33,34	35	15	46
Peso (n= 110)	72,4	72	43	120
IMC (n=107)	27,8	26	15,8	43,5
TA (n= 109)	106	103	78	139
EG al final de la gestación (semanas) (n=115)	37	38	25	41
Peso fetal (g) (n=111)	2632	2695	734	4220
Peso placenta (g) (n= 87)	381	380	80	800
Tensión Arterial (TA)				
TA Sistólica	131		97	177
TA Diastólica	81		49	107
TA Media	106		78	139
VARIABLES CUALITATIVAS				
Variable	Categoría	N	PORCENTAJE	
Hábito tabáquico (n=109)	Fumadora	92	85 %	
	No fumadora	17	15 %	
Etnia (n=114)	Blanca	98	86 %	
	Árabe	4	3.5 %	
	Latina	11	10 %	
	Negra	1	0.5%	
Inducción de parto (n=105)	Inducido	83	79%	
	No inducido	22	21%	
Tipo de parto (n=115)	Eutócico	54	47%	
	No eutócico	61	53%	
IPM AA Uterinas s20 (n=107)	>95percentil	25	23%	
	<95 percentil	82	77%	
IPM AA Uterinas s24 (n=107)	>95 percentil	18	17%	
	<95 percentil	89	83%	

Los datos no pudieron recogerse en todas las pacientes, por lo que la n de cada variable se muestra entre paréntesis junto a la variable de estudio en la tabla. El cálculo de los porcentajes se ha realizado teniendo en cuenta las pacientes en las que se han recogido estos datos, y no respecto al número de pacientes totales.

5.1.2. Variables cuantitativas

Edad materna

La edad media de las pacientes fue de 33 años, siendo la edad menor de 15 años y la mayor de 46 años.

La edad media fue similar en todos los grupos: tanto en el grupo control como en Preeclampsia fue de 33 años, en el grupo PEG fue de 34 años y en el CIR de 32 años, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Peso materno

El peso medio de las gestantes fue de 72 kg (kilogramo) siendo el mínimo 43 kg y el máximo 120 kg.

El peso de las mujeres de nuestro estudio fue mayor en el grupo de Preeclampsia (76 kg), frente a 71 kg en el grupo de CIR y control, siendo menor en el grupo de PEG con 68 kg, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Índice de masa corporal (IMC) materno

El IMC también fue mayor en el grupo PE con un IMC de media de 29, seguido del grupo CIR con un IMC de 27 y el PEG y grupo control con un IMC de media de 26. Las diferencias encontradas no tuvieron significación estadística.

Tensión arterial media (TAM)

La TA Media global de todas las pacientes fue 106 mmHg, con un mínimo de 78 mmHg y máximo de 139 mmHg. Se analizó la TA Media, Sistólica y Diastólica en todos los grupos. Tanto la cifra de

TA Sistólica como Diastólica y Media fue superior en el grupo de Preeclampsia con respecto al resto de los otros grupos (Tabla 4, Figura 14). Estas diferencias sí fueron estadísticamente significativas.

Tabla 4-. Distribución de las variables TA media, Sistólica y Diastólica según los grupos de estudio

TA SISTÓLICA				
Grupo	Media	Mínimo	Máximo	p
Control	114	97	135	0.05
PEG	121	100	160	
CIR	123	98	151	
Preeclampsia	151	114	177	
TA DIASTÓLICA				
Grupo	Media	Mínimo	Máximo	
Control	74	60	86	0.05
PEG	75	49	96	
CIR	79	62	106	
Preeclampsia	91	51	107	
TA MEDIA				
Grupo	Media	Mínimo	Máximo	
Control	94	78	105	0.05
PEG	98	80	126	
CIR	101	80	124	
Preeclampsia	121	85	139	

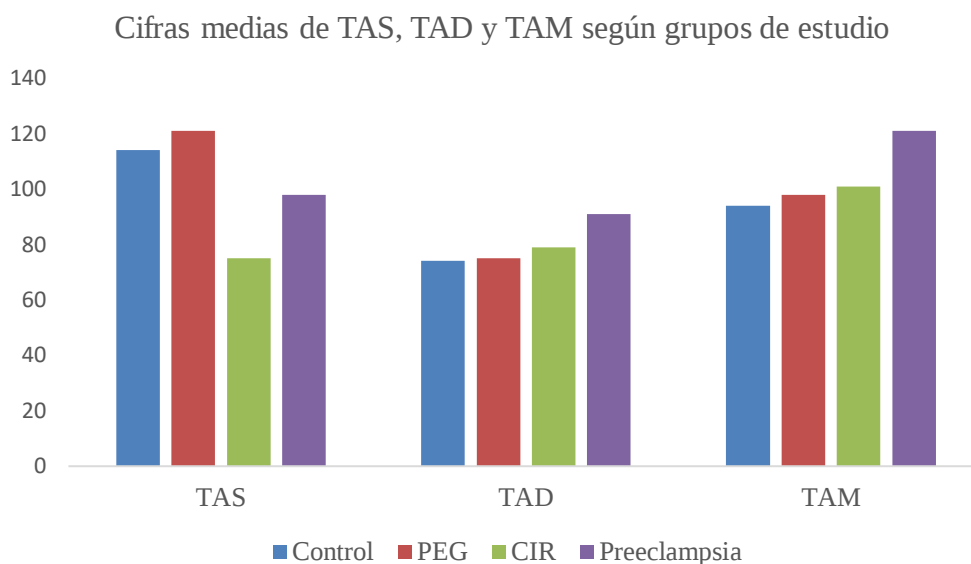


Figura 14-. Representación de los valores medios de la tensión arterial sistólica (TAS), diastólica (TAD) y media (TAM) en los distintos grupos de estudio. Se puede observar como en el grupo preeclampsia estos valores son significativamente superiores ($p < 0.05$).

Edad gestacional al final de la gestación

La edad gestacional global al final de la gestación fue de 37 semanas con un mínimo de 25 semanas y un máximo de 41 semanas.

La edad gestacional media en el grupo control fue de 39 semanas, en el grupo PEG de 38 semanas, en el CIR de 37 semanas y en la Preeclampsia de 35 semanas siendo estas diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos grupos de estudio.

Tabla 5-. Distribución de la edad gestacional al final de la gestación (semanas) media, mínimo y máximo en cada uno de los grupos de estudio en semanas.

Edad gestacional al final de la gestación (semanas)				
Grupos	Media	Mínimo	Máximo	p
Control	39	34	41	<0.05
PEG	38	37	40	
CIR	37	33	39	
Preeclampsia	36	25	41	

Peso fetal

El peso fetal medio fue de 2632 g (gramos) con un mínimo de 734 g y un máximo de 4220 g (Tabla 6, Figura 15).

Se analizó el peso fetal en cada uno de los grupos, siendo el peso fetal en el CIR y Preeclampsia significativamente inferiores

Tabla 6-. Distribución del peso fetal medio, mínimo y máximo en cada uno de los grupos de estudio en gramos.

Peso fetal (g)				
Grupos	Media	Mínimo	Máximo	p
Control	3196	1770	4220	<0.05
PEG	2707	2225	3165	
CIR	2275	1580	2745	
Preeclampsia	2427	734	4135	

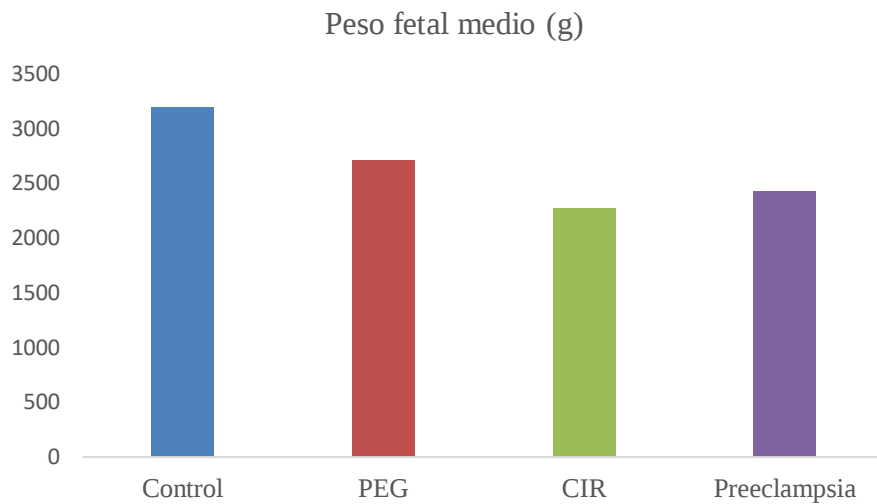


Figura 15-. Peso fetal medio en cada uno de los grupos de estudio.

Peso de la placenta

El peso medio de las placentas de todas las pacientes del estudio fue de 381 g, con un mínimo de 80 g y un máximo de 800 g.

El peso de la placenta fue mayor en el grupo control con 479 g, posteriormente en el CIR con 397 g, 380 g en el PEG y 343 g en la Preeclampsia. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

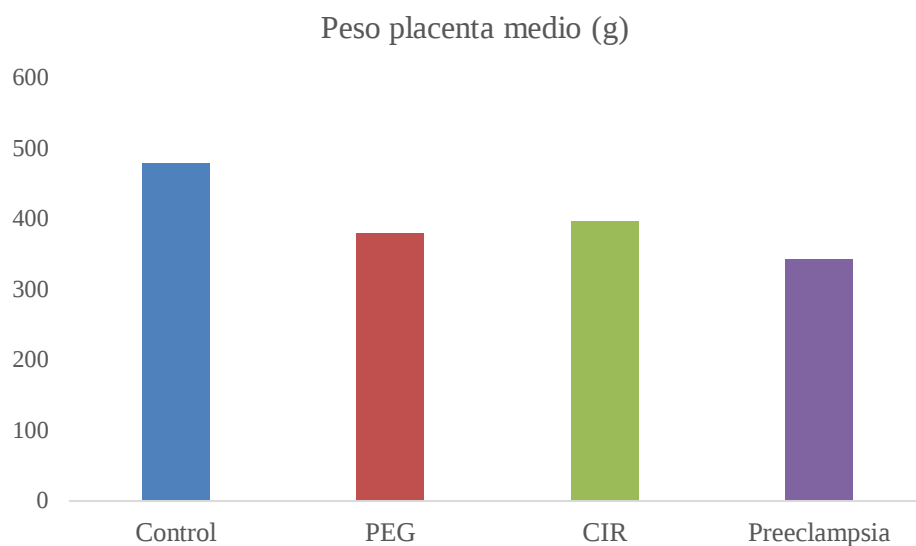


Figura 16-. Peso medio de la placenta en cada uno de los grupos.

5.1.3. Variables cualitativas

Hábito tabáquico

El hábito tabáquico se registró en 109 de las 120 pacientes reclutadas (90%). La mayor parte de las pacientes del estudio fueron no fumadoras (85% frente a un 15% que sí lo fueron, Figura 17).

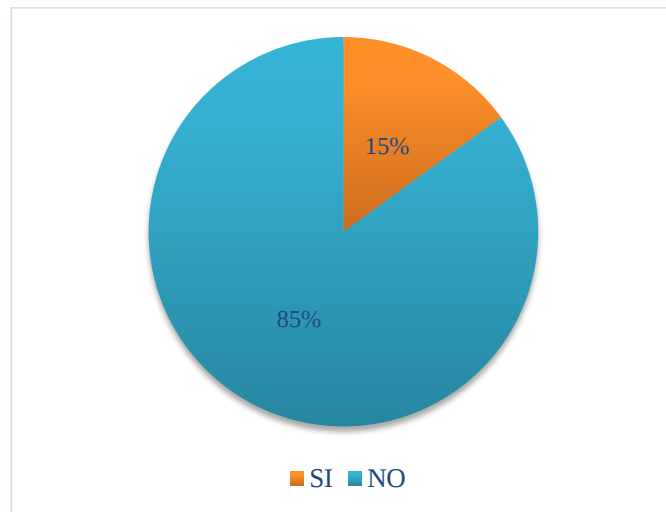


Figura 17-. Distribución de las pacientes del estudio según su hábito tabáquico.

Raza

La etnia se registró en 114 pacientes (99%).

La mayor parte de las pacientes reclutadas para este estudio fueron de raza blanca (86%), seguido de raza latina (10%), árabe (3.5%) y negra (1%) (Figura 18).

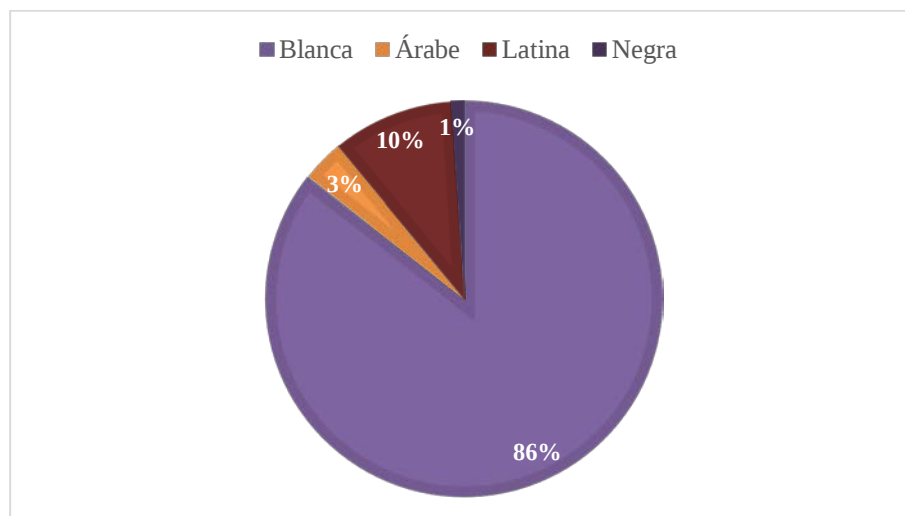


Figura 18-. Representación del porcentaje de cada una de las etnias de las pacientes del estudio.

Inducción de parto

Los datos referentes a la inducción de parto se registraron en 105 pacientes. La inducción de parto se produjo en la mayoría de los grupos (79%). (Tabla 7, Figura 19).

Hubo un mayor número de inducciones de parto en el grupo Preeclampsia, seguido del grupo CIR, control y PEG. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Tabla 7-. Distribución de la inducción de parto según grupos.

Inducción de parto			
Grupo	No	Si	p
Control	11 (10.5%)	13 (12.5%)	<0.05
PEG	1 (1%)	19 (18%)	
CIR	4 (4%)	20 (19%)	
Preeclampsia	6 (5.5%)	31 (29.5%)	
Total	22 (21%)	83 (79%)	

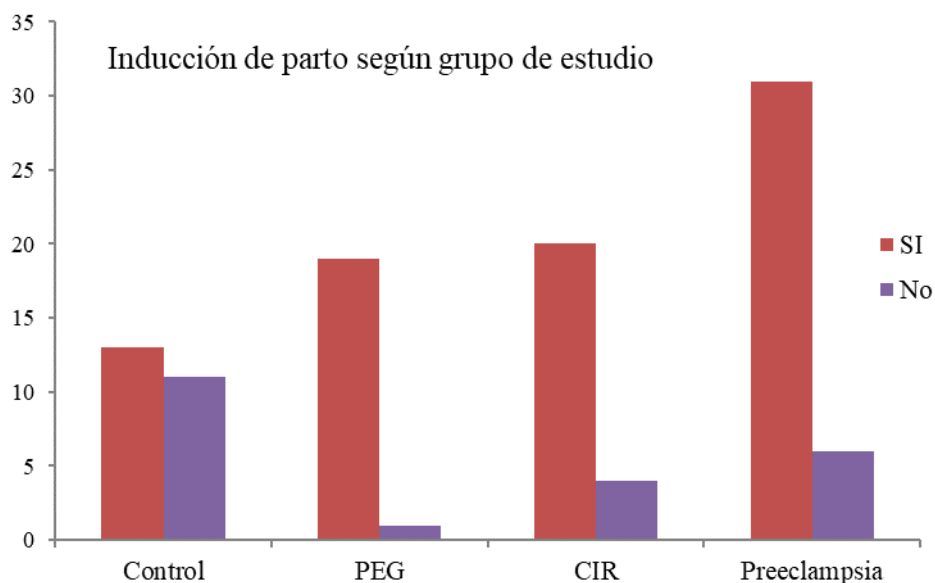


Figura 19-. Representación de la inducción de parto según grupos.

Tipo de parto

Analizando los resultados según el final del embarazo, se vio que la cesárea fue mayor en el grupo de CIR y Preeclampsia, sobre todo por riesgo de pérdida de bienestar fetal (RPBF). En el grupo

control el RPBF fue también el principal motivo para realizar una cesárea. Las diferencias en número de cesáreas en los distintos grupos fueron estadísticamente significativas.

Tabla 8-. Distribución del tipo de parto en cada uno de los grupos.

		TIPO DE PARTO				Total	p
Grupo		Eutócico	Fórceps	Ventosa	Cesárea		
	Control	15(51%)	1 (3%)	3(10%)	10 (36%)	29	<0.05
	PEG	13(65%)	1 (5%)	3(15%)	3 (15%)	20	
	CIR	11(44%)	1 (4%)	1 (4%)	12 (48%)	25	
	Preeclampsia	15(36%)	2 (5%)	6 (15%)	18 (44%)	41	

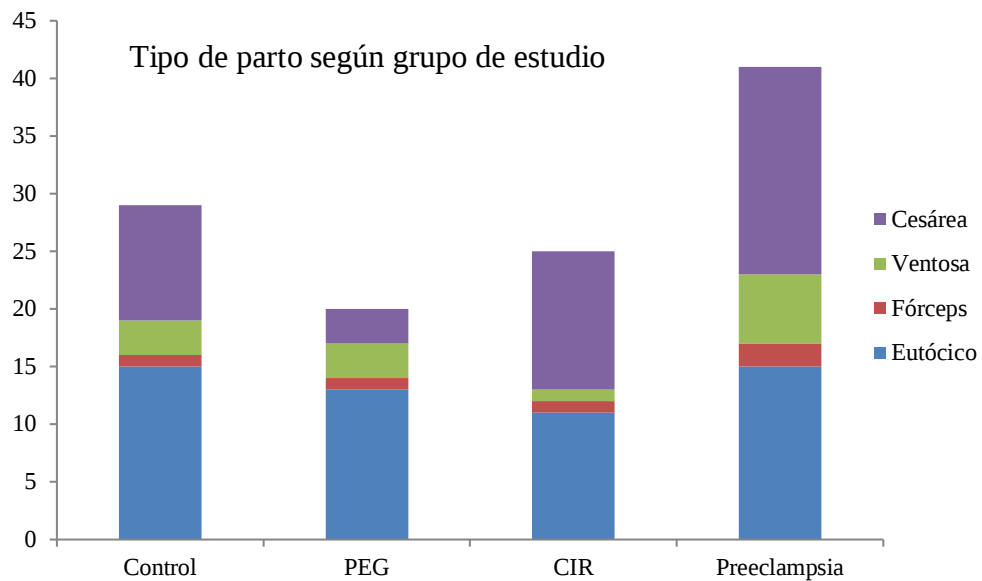


Figura 20-. Tipo de parto según los diferentes grupos de estudio.

IPm arterias uterinas

IPm arterias uterinas en Semana 20

El IP medio de las arterias uterinas en la semana 20 se registró en 107 pacientes de las 120 que participaron en el estudio (89%). En 25 de ellas el Índice de Pulsatilidad fue superior al percentil 95 mientras que en 82 fue inferior. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 9-. Índice de pulsatilidad medio de las arterias uterinas en la semana 20 según grupos de estudio (n=107)

Grupo	IP Normal	%	IP Patológico	%	total
Control	21	88%	3	13%	24
PEG	18	90%	2	10%	20
CIR	15	63%	9	38%	24
Preeclampsia	28	72%	11	28%	39

IPm arterias uterinas en Semana 24

18 pacientes tuvieron un IPm por encima del percentil 95 de las 107 pacientes en las que se registró este dato.

El grupo con mayor número de pacientes con elevación del IPm de las arterias uterinas en semana 24 fue el grupo de Preeclampsia seguido del grupo CIR. No hubo ningún caso de elevación del IP en el grupo PEG en la semana 24, y solo en una paciente del grupo Control el IP se mantuvo elevado en la semana 24. Estos resultados fueron estadísticamente significativos.

Tabla 10-. Distribución del Índice de Pulsatilidad de las arterias uterinas en la semana 24 según grupos de estudio.

IPm arterias uterinas semana 24						
Grupo	IP Normal	%	IP Patológico	%	Total	p
Control	23	96%	1	4%	24	<0.05
PEG	20	100%	0	0%	20	
CIR	18	75%	6	25%	24	
Preeclampsia	28	72%	11	28%	39	

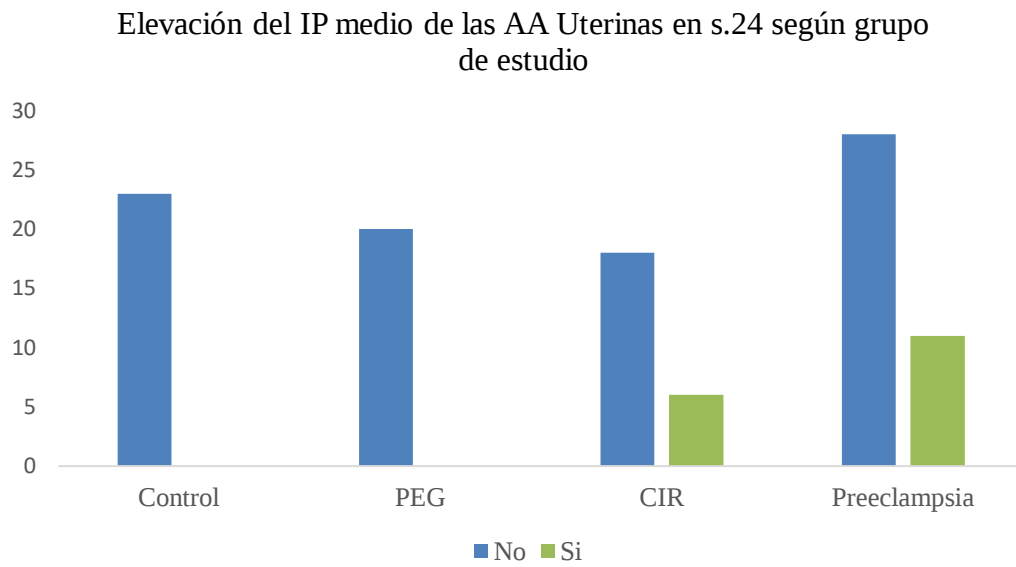


Figura 21-. Elevación del Índice de Pulsatilidad de las arterias uterinas en la semana 24 según grupos de estudio.

5.2. Estudios experimentales

5.2.1. RT-PCR genes implicados en patología placentaria

Con el fin de profundizar en la fisiopatología de las enfermedades propuestas, se analizó la expresión de los genes implicados en patología placentaria en 10 pacientes de cada uno de los grupos de estudio (PEG, CIR, Preeclampsia precoz y Preeclampsia tardía) mediante técnicas de RT-PCR siendo un total de 40 muestras. Al realizar los primeros análisis observamos que en los grupos CIR y Preeclampsia precoz había dos outliers que podían interferir en los resultados de la expresión. La revisión de la historia de la paciente diagnosticada de CIR confirmó la presencia del índice proteínas/creatinina patológico y angiogénicos positivos en semana 31, por lo que podría ser considerada una Preeclampsia precoz. Consideramos, entonces, su eliminación del estudio al no estar bien definido la estratificación. Lo mismo ocurrió con la paciente incluida en el grupo de Preeclampsia precoz, la cual presentaba características del grupo CIR tras el control de crecimiento fetal. Con estas modificaciones nuestro grupo de estudio se redujo a 38 pacientes estudiadas, 10 en los grupos de PEG y Preeclampsia tardía y 9 para los otros dos grupos.

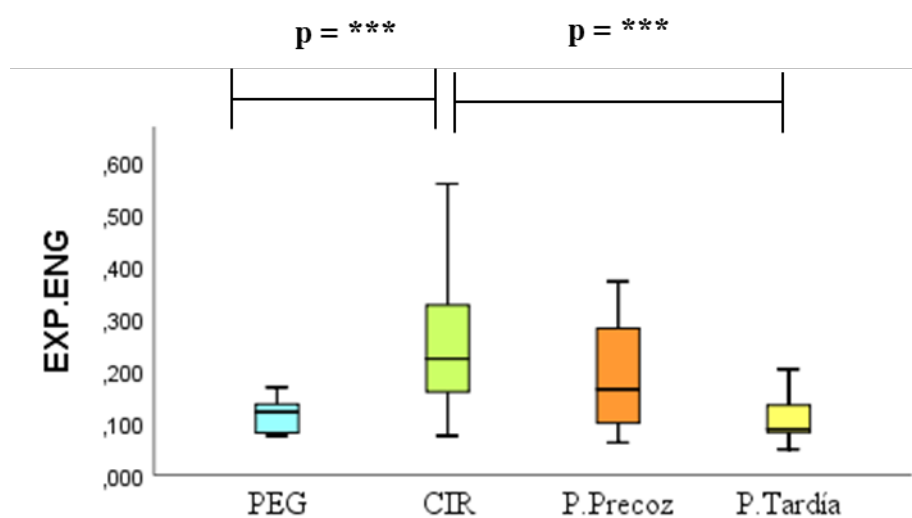


Figura 22-. Expresión del gen (ENG) en patología placentaria. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardía: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

El gen Endogлина ENG implicado en la disfunción endotelial que precede a la preeclampsia y actúa como factor antiangiogénico, presentó mayor expresión en el grupo CIR y Preeclampsia precoz,

con diferencias estadísticamente significativas al compararlos los CIR con el grupo de bajo peso (PEG) y la Preeclampsia Tardía (Figura 22).

La Proteína Morfogénica Ósea 4, gen (BMP4) son un conjunto de proteínas endógenas que pertenecen a la familia de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) implicado en funciones esenciales en muchos procesos de desarrollo embrionario, fetal y del adulto; incluido el desarrollo vascular, la angiogénesis y la disfunción endotelial. Aunque apenas hay expresión en las pacientes, la expresión fue mayor en el grupo de bajo peso (PEG), con diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo de Preeclampsias Tardías.

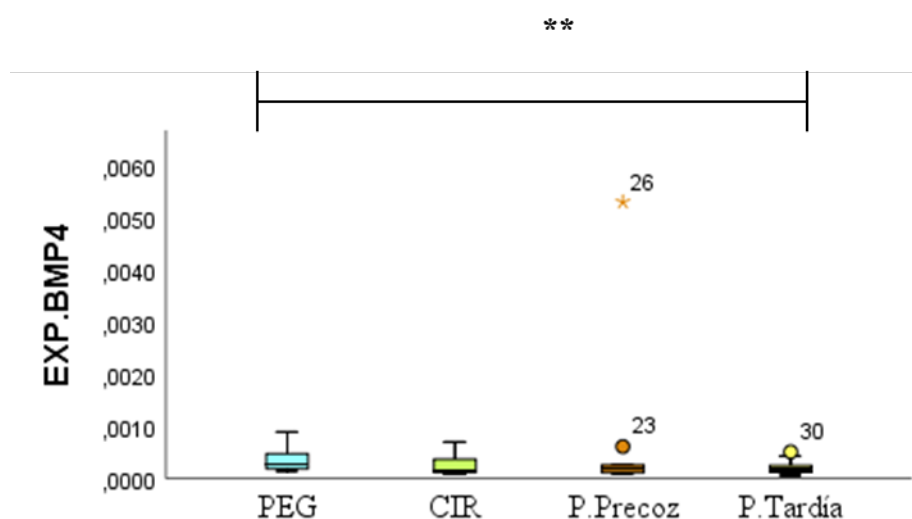


Figura 23-. Expresión del gen (BMP4) en patología placentaria. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardía: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

El gen *HIF1 α* (factor 1 inducible por hipoxia) es un factor de transcripción que regula la respuesta celular y sistémica a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno. El factor de transcripción se activa exponencialmente a medida que disminuye el oxígeno y activa a genes que codifican para proteínas que aumentan la disponibilidad del oxígeno y permiten la adaptación metabólica en ausencia de oxígeno, controlando la expresión de decenas de genes y proteínas implicados en la angiogénesis, la eritropoyesis, la glucólisis, la invasión, la apoptosis.

En nuestros resultados se observó que el gen Factor Inducible por Hipoxia, (*HIF1α*) estaba sobreexpresado en el grupo CIR respecto a los otros grupos con diferencias significativas con respecto a las pacientes con PE precoz.

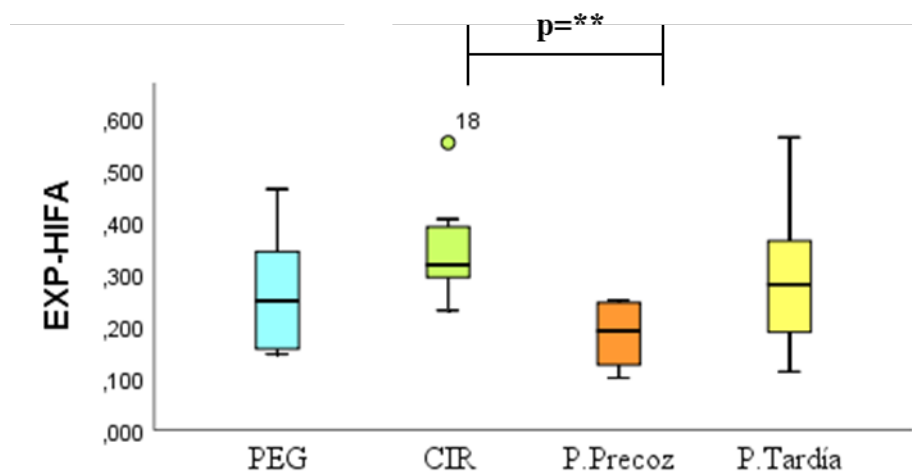


Figura 24-. Expresión del gen (*HIF1α*) en patología placentaria. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardía: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

El gen Angiopoyetina 2 (*ANGPT2*) implicado en regular la angiogénesis, la permeabilidad vascular y las funciones linfáticas durante la embriogénesis, presenta mayor expresión en las pacientes con severidad patológica (P.Precoz) con diferencias significativas al compararlos con el grupo de pequeños para edad gestacional (PEG) y con el grupo de Preeclampsia Precoz. Analizando las diferencias en el resto de los grupos se observa que también existe una tendencia al alza en el grupo CIR al compararlo con las pacientes diagnosticadas de Preeclampsia tardía ($p=0.06$). Como se observa en la figura 25 la expresión de este gen también aumenta con la severidad de la patología.

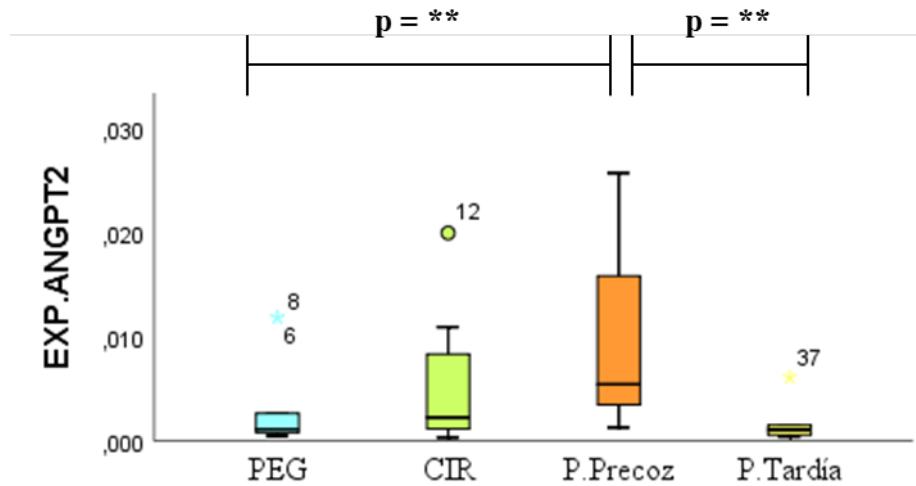


Figura 25-. Expresión del gen (ANGPT2) en patología placentaria. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardía: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Las cadherinas median la adhesión y desempeñan un papel importante en la formación de los tejidos, comportamiento celular y la formación del cáncer. El gen Cadherina1 (*CDH1*) sigue el mismo patrón que la angiopoyetina 2, la expresión aumenta con la severidad de la enfermedad.

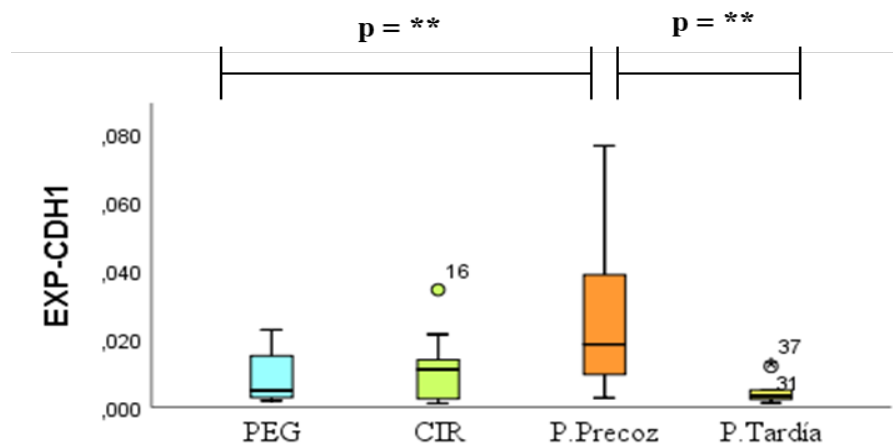


Figura 26-. Expresión del gen (*CDH1*) en patología placentaria. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardía: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

La (*IL6*) es una citoquina multifuncional que regula las respuestas inmunes, reacciones inflamatorias de fase aguda, hematopoyesis y que puede jugar un papel central en los mecanismos de defensa del huésped. Aunque el grupo PEG es muy heterogéneo en cuanto a la expresión de *IL6*, en el resto de grupos se observó un perfil inflamatorio asociado a la severidad de la enfermedad.

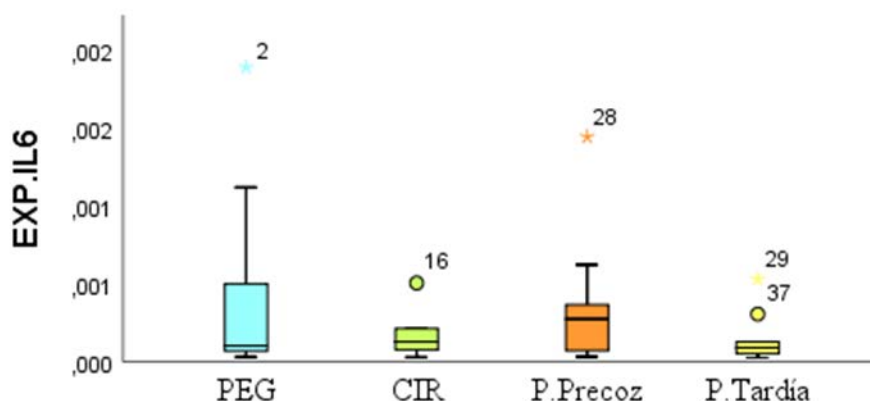


Figura 27-. Expresión del gen (*IL6*) en patología placentaria. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardía: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5.2.2. Elisa

La concentración plasmática de endoglina se analizó mediante técnica de ELISA en 36 mujeres embarazadas clasificadas en los distintos grupos de estudio. Se cuantificó la cantidad de proteína endoglina presente en el plasma de 10 embarazadas sanas, 9 con CIR, 8 con preeclampsia precoz y 9 con preeclampsia tardía. Observamos que las pacientes que tienen un embarazo con cualquier alteración presentan mayores concentraciones de sEng en plasma que las embarazadas sanas con resultados estadísticamente significativos.

Resultados

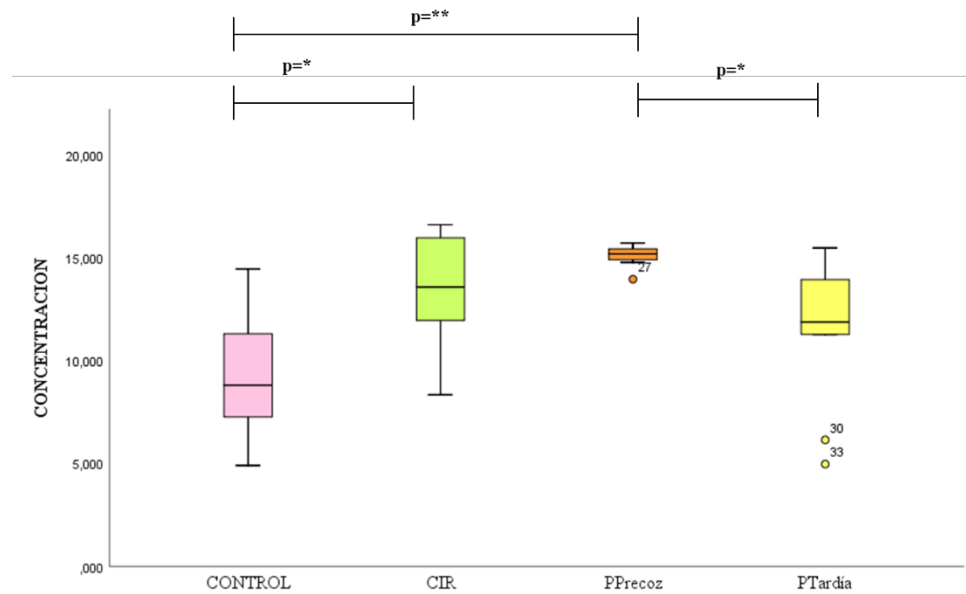


Figura 28-. Diagrama de cajas comparando las concentraciones séricas de endoglina soluble (sEng) en mujeres con embarazos sanos, CIR, PPrecoz y PTardia. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardia: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5.2.3. Caracterización de las VEs

Microscopía electrónica de transmisión.

La morfología de las vesículas extracelulares procedentes del plasma de cada grupo de pacientes, se estudió mediante microscopía electrónica. Como se observa en la figura 29 todas las VEs aisladas mediante ultracentrifugación presentaban una morfología redondeada, con la parte central hipodensa y una doble membrana, confiriéndoles una morfología característica de “donuts”.

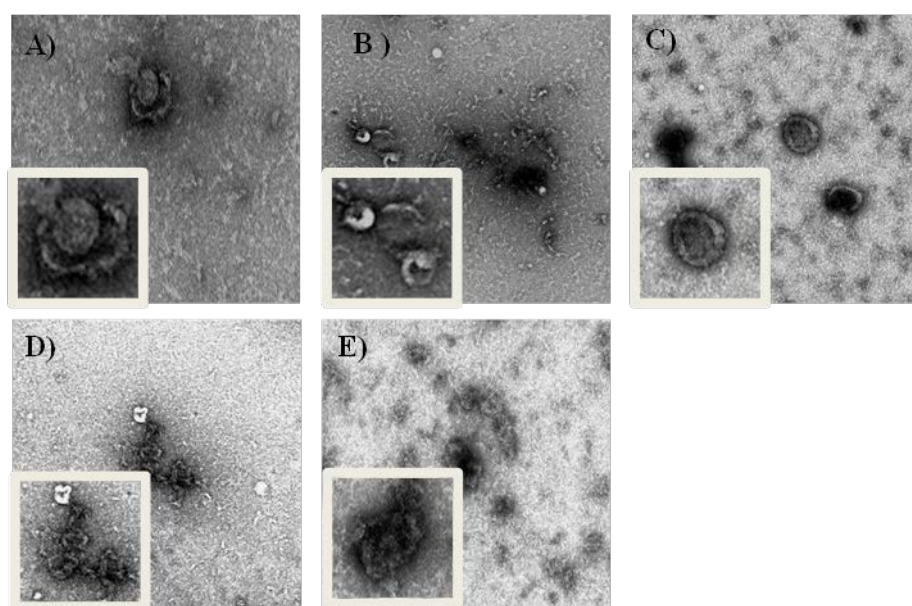


Figura 29-. Caracterización de vesículas extracelulares. VEs plasmáticas de diferentes pacientes mediante Microscopia Electrónica de Transmisión. Ejemplo de MET en VEs de: A) Control; B) PEG; C) CIR; D) Preeclampsia Precoz; E) Preeclampsia Tardía.

NTA

En primer lugar, se analizaron los tamaños y concentraciones de partículas medidas mediante NTA en 41 muestras de plasma obtenidas de pacientes embarazadas pertenecientes a los diferentes grupos de estudio: control (n=3), PEG (n=9), CIR (n=10), Preeclampsia Precoz (n=10) y Preeclampsia Tardía (n=9).

Las VEs se aislaron a partir de 1 ml de plasma de las pacientes. Tras las sucesivas ultracentrifugaciones se recogieron en 1ml de suero fisiológico. Las muestras se han analizado previa dilución 1:100 en PBS.

Para todas las muestras se han realizado entre 3 y 5 capturas de 60 segundos en flujo continuo.

Se observó que el tamaño de las partículas era homogéneo entre todas las muestras, sin embargo, el grupo de Preeclampsia Tardía presentó VEs de mayor tamaño con una mediana de 179,100 nm (133,6 nm-195,1 nm), seguidas de las procedentes del grupo de Preeclampsia Precoz con una mediana de 161,35 nm (135,8 nm- 184,4 nm), PEG con una mediana 160,8 nm (131-189), CIR con una mediana de 159,200 nm (135-178,7 nm) y las VEs más pequeñas fueron las de las embarazadas control 139,1 (123,1nm-161,20nm). La VEs procedentes de PE tardía eran significativamente más grande que las VEs del grupo control $p= 0.033$ y las VEs del grupo CIR $p= 0,034$ respectivamente.

Sin embargo, el tamaño más repetido o moda demostró que todos grupos presentan VEs menores a 150nm como definen los criterios de la IVES⁸². ISEV En el grupo control la moda fue de 109,90, en PEG de 130, en el grupo CIR de 124,35, en las de PE precoces de 127,75 y en las de PE tardía 138,50nm.

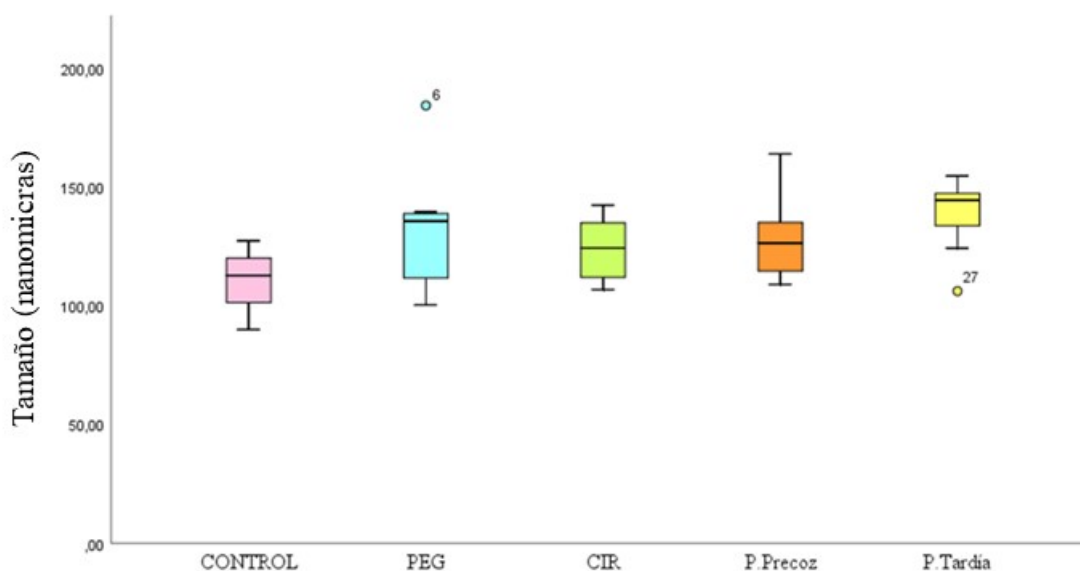


Figura 30-. Tamaño de las VEs referido en nanomicras mediante NTA.

Resultados

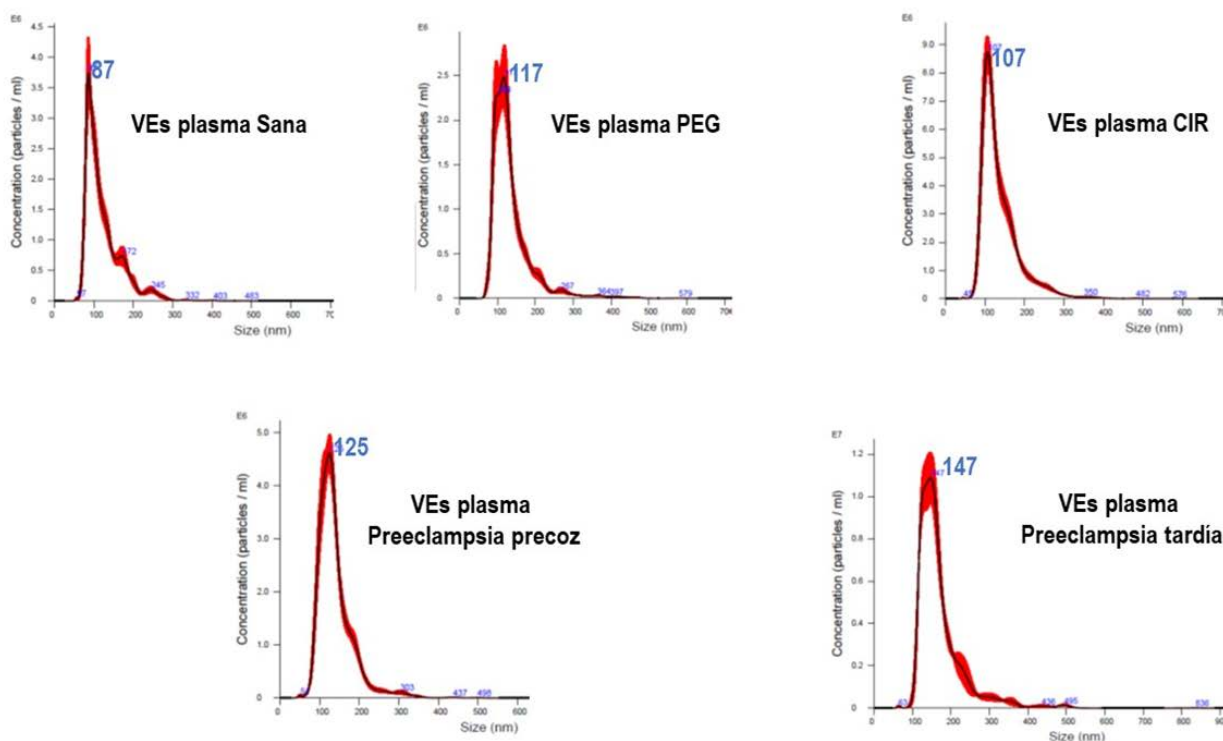


Figura 31-. Cuantificación de partículas mediante NTA. Análisis de la distribución de tamaños (nm). Ejemplo representativo de: A) Muestra obtenida de sano B) Muestra obtenida de PEG C) CIR D) Preeclampsia Precoz E) Preeclampsia tardía.

La concentración de partículas fue mayor en Preeclampsia Precoz con una mediana de $3,40 \times 10^{10}$ partículas/ml, posteriormente el grupo CIR $2,80 \times 10^{10}$ partículas/ml, seguida del grupo de Preeclampsia tardía con una mediana de $2,37 \times 10^{10}$ nm, una mediana de concentración en sanos de $2,05 \times 10^{10}$ partículas/ml frente a PEG de $1,76 \times 10^{10}$ partículas/ml.

En cuanto al estudio de la concentración, existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar la concentración del grupo PEG (pequeños para edad gestacional) con CIR (crecimiento intrauterino restringido) y con el grupo de Preeclampsia Precoz ($p < 0.05$). Entre los grupos de mayor severidad patológica, no se observaron diferencias significativas cuando se comparaba CIR con Preeclampsia Precoz o Tardía (Figura 32).

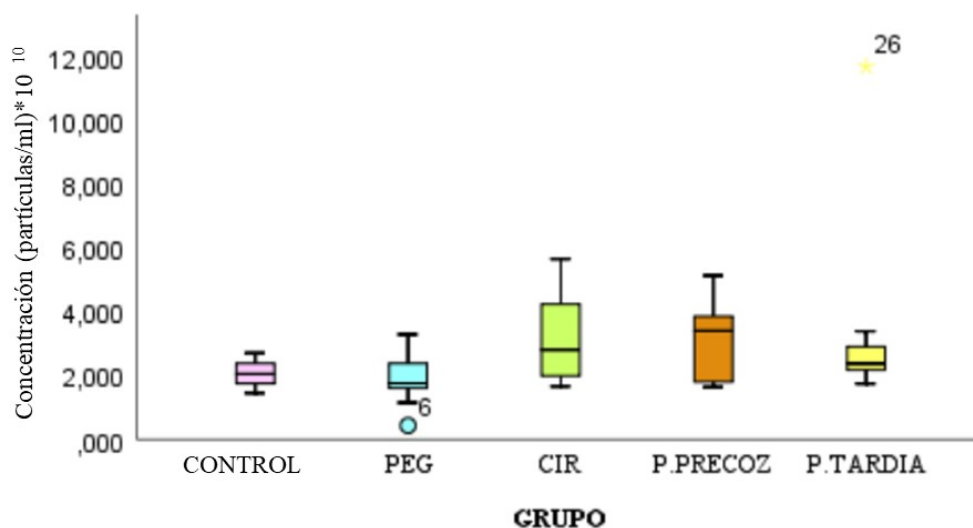


Figura 32-. Concentración de partículas (partículas/ml) según grupos cuantificadas mediante NTA. p=significancia estadística. PEG: pacientes con fetos Pequeño para edad Gestacional; CIR: pacientes con Crecimiento Intrauterino Restringido; P.Precoz: pacientes con preeclampsia precoz; P.Tardia: pacientes con Preeclampsia Tardía. Datos expresados como la mediana (recorrido intercuartílico). Test U de Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Western Blot

Mediante Western Blot se confirmó la presencia de la proteína de membrana CD63 (Figura 34). Todos estos resultados cumplen los criterios establecidos para la caracterización de las VEs por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV)⁸².

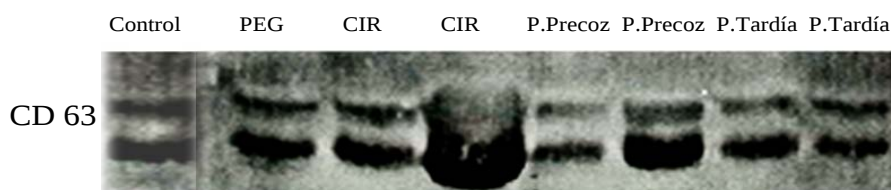


Figura 33-. Western Blot de CD63 en VEs de pacientes embarazadas en 8 muestras aisladas de un control sano, 1 paciente con PEG (Pequeño para edad gestacional); 2 con CIR (crecimiento intrauterino restringido); 2 con PE Precoz (Preeclampsia Precoz) y 2 con PE Tardía (Preeclampsia Tardía).

5.2.4 Análisis del perfil de expresión de micro-RNAs

Se analizó el contenido de las VEs procedentes de plasma de 20 muestras que correspondían a 4 pacientes sanos, 4 PEG, 4 pacientes con CIR, 5 con Preeclampsia Precoz, y 3 con Preeclampsia

Tardía mediante una plataforma de micro-arrays de baja densidad para el estudio de 384 micro-RNAs con el objetivo identificar micro-RNAs como biomarcadores en sangre periférica que pudieran estar implicados en el crecimiento fetal y trastornos hipertensivos.

Primeramente, se realizó un análisis no supervisado de los datos mediante gráficos de agrupamiento *MultiDimensional Scaling* (MDS). En este gráfico se observa la agrupación de las muestras según la similitud en el perfil de microRNAs. Se observó que las VEs extraídas del plasma de pacientes con PEG presentaban un perfil de microRNAs muy similar entre ellas (Fig 34). Lo mismo ocurría en las muestras procedentes de embarazadas sanas las cuales se agrupaban separadas de los otros dos grupos patológicos. En las VEs del grupo CIR se observó una mayor dispersión de las muestras según su contenido en microRNAs. Estos resultados podrían indicar que el contenido en microRNAs de las VEs plasmáticas fue dependiente de la patología. El gráfico indica también la proximidad entre una paciente CIR con una PEG.

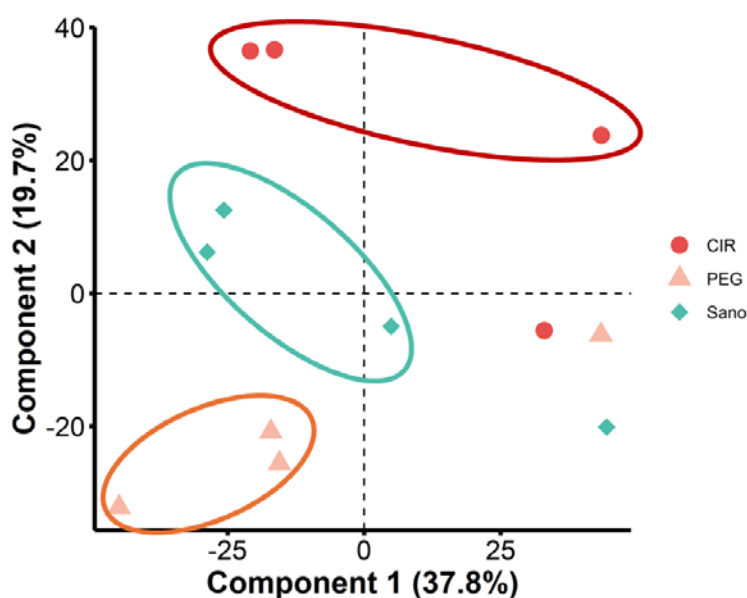


Figura 34-. Análisis no supervisado del agrupamiento de las pacientes según la patología.

El análisis de la expresión diferencial se realizó comparando varios grupos de patologías entre sí, según las muestras:

1. Sanos *versus* Pequeños para Edad Gestacional (PEG)

2. Sanos *versus* Crecimiento Fetal Restringido (CIR)

3. CIR *versus* PEG

Los microRNAs desregulados tras la comparación de las pacientes clasificadas como PEG vs las embarazadas sanas, identificó únicamente dos microRNAs desregulados significativamente, ambos infraexpresados en nuestras pacientes.

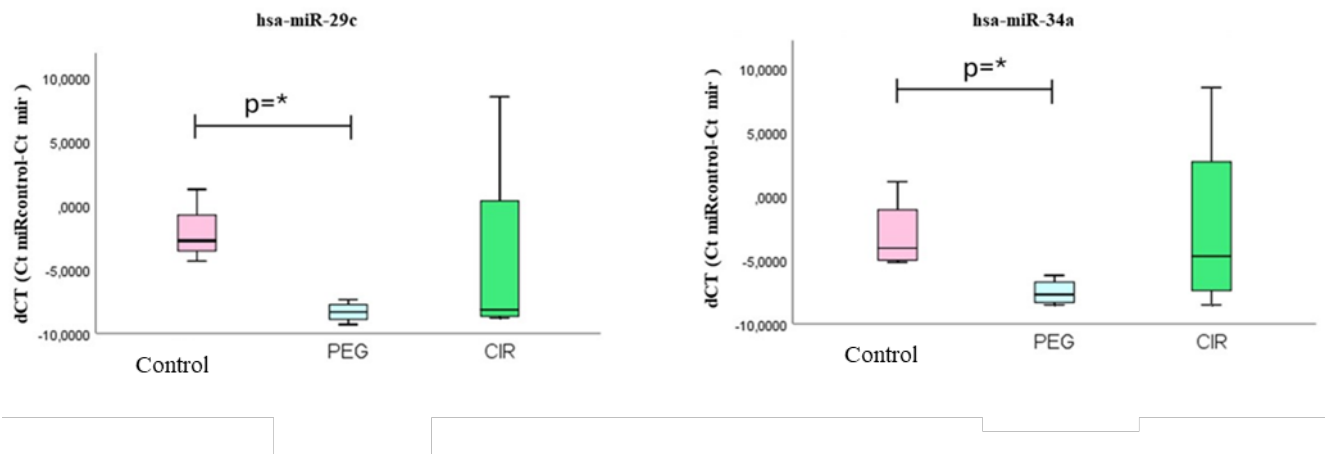


Figura 35-. MicroRNAs infraexpresados, posibles marcadores de bajo peso en PEG.

De manera similar se procedió a comparar nuestro grupo control (embarazadas sanas) vs las embarazadas con crecimiento fetal restringido. En este caso se identificaron 12 microRNAs desregulados significativamente.

Resultados

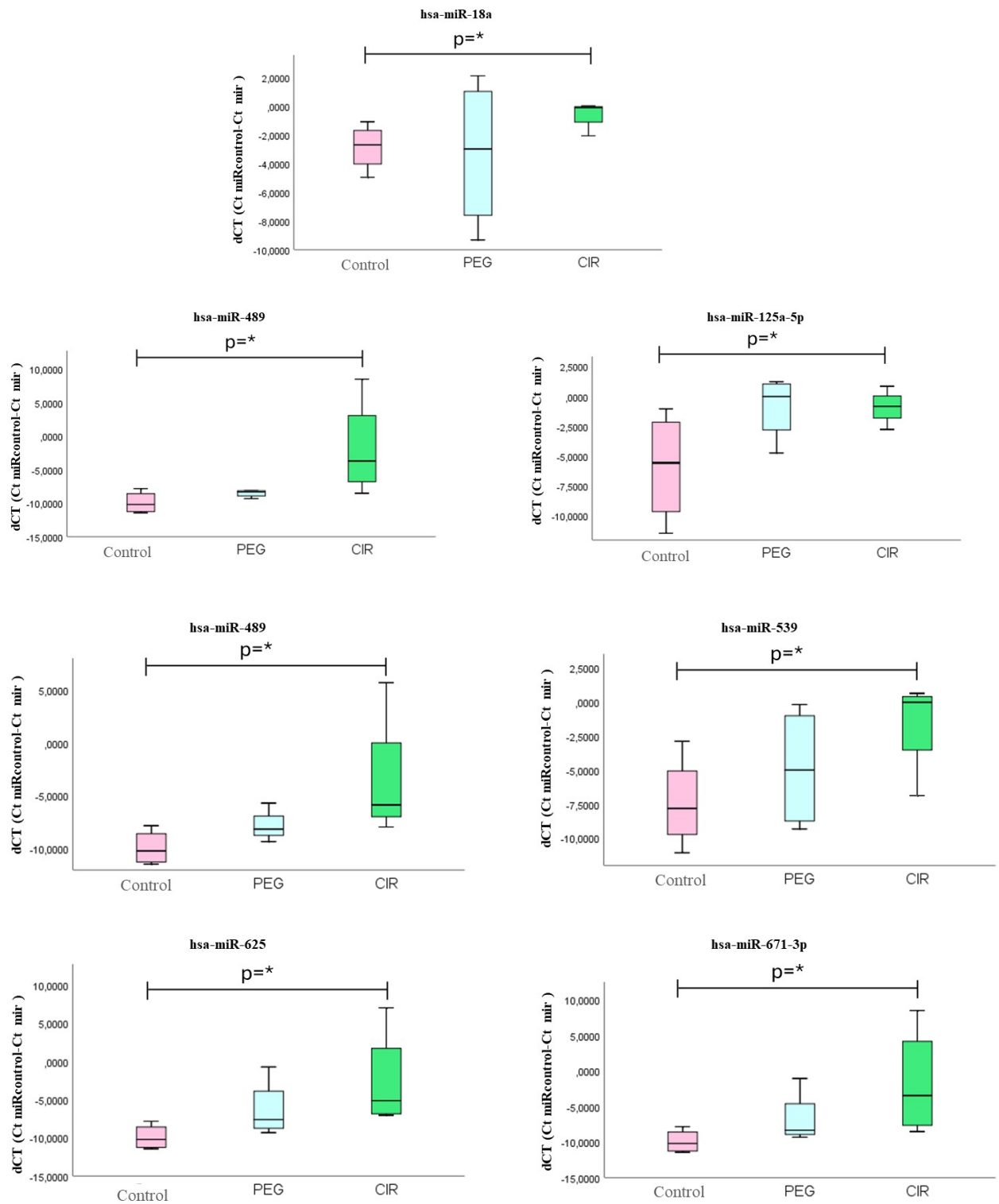


Figura 36-. MicroRNAs desregulados en las embarazadas sanas vs CIR.

Resultados

Finalmente, el análisis entre los dos grupos patológicos PEG vs CIR mostró que solamente dos microRNAs estaban desregulados, aunque con significancia limitada a $p=0,05$, y que coincidían con los encontrados en el análisis anterior. Lo cual podría indicar que estos dos microRNAs sean específicos del desarrollo de un crecimiento fetal restringido.

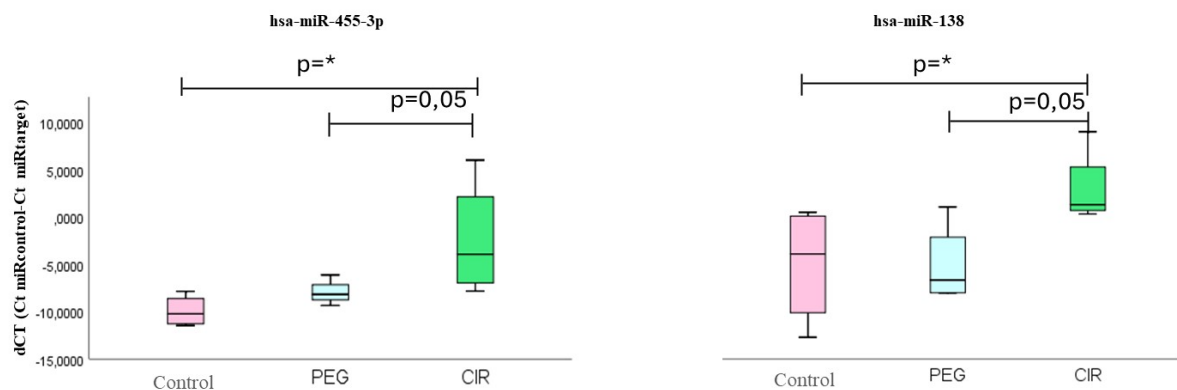


Figura 37-. MicroRNAs característicos de mujeres embarazadas con CIR.

Posteriormente se analizaron los procesos biológicos que podrían estar regulados por estos microRNAs alterados. Se utilizó la plataforma miRPath (V 2.0) para estudiar los cambios biológicos en nuestra patología de estudio. Introducimos los 2 microRNAs desregulados que identificaban a las pacientes con PEG, mir-29c y mir-34a. Se encontraron 41 procesos biológicos regulados por estos dos microRNAs (Figura 38)

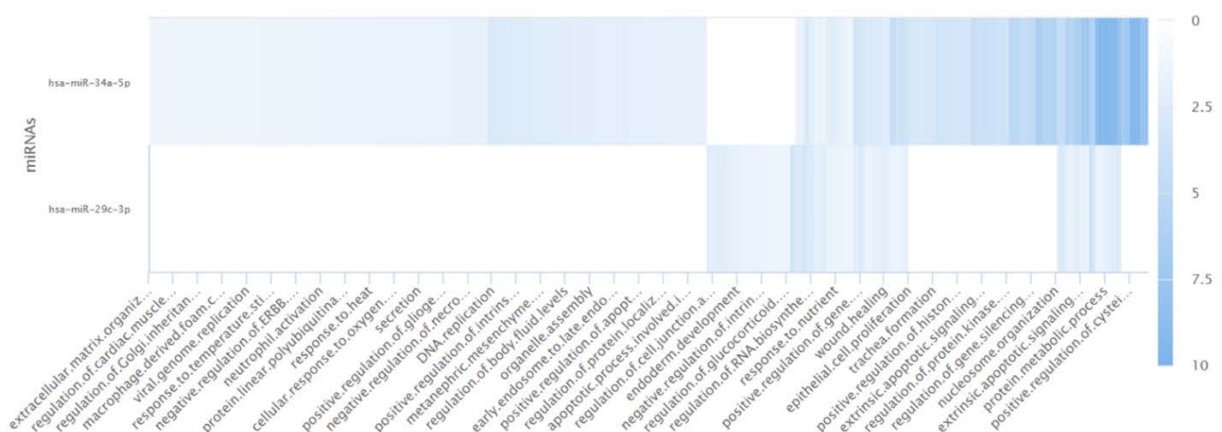


Figura 38-. Vías significativamente alteradas en el desarrollo del PEG.

Entre ellas podrían estar implicadas en la fisiopatología de la enfermedad de estudio, la organización de la matriz extracelular, la formación de macrófagos, respuesta a estímulos de temperatura, activación de neutrófilos, respuesta a oxígeno celular, apoptosis, respuesta a nutrientes....

El análisis de las vías en la que están implicados los microRNAs significativamente alterados en el desarrollo de CIR encontró vías como adhesión focal, regulación celular, reparación DNA, proliferación Linfocitos T, regulación de la cromatina, acetilación de histonas, respuesta celular, desarrollo embrionario, coagulación sanguínea.... (Figura 39).

Para estudiar que genes regulaban nuestros microRNAs de interés utilizamos la base de datos miRBase. Así, por ejemplo, el mir-146-b regula a varios genes, PDGFB (proteína del factor de crecimiento derivado de plaquetas), metaloproteinasas de matriz (MMP), y ERalpha (receptor de estrógeno alfa) entre otros. Los dos primeros genes esta implicados en varios procesos biológicos como el desarrollo embrionario, angiogénesis, proliferación y diferenciación celular. Mientras que el gen ERalpha regula la trascrición de genes inducibles por los estrógenos por lo que juega un importante papel en el desarrollo de la gestación.

Otros genes regulados por este microRNA son, nuclear kappa kb1 (NFKB) reguladora la transcripción que se activa por diversos estímulos intra y extracelulares, como citocinas y radicales libres de oxidación. La activación inapropiada de NFKB se ha asociado con una serie de enfermedades inflamatorias, mientras que la inhibición persistente de NFKB conduce a un desarrollo inapropiado de células inmunitarias o a un retraso en el crecimiento celular. La proteína TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) funciona como un transductor de señales en la vía NF-kappaB en respuesta a las citocinas proinflamatorias. La regulación de la supervivencia y proliferación celular, la hematopoyesis, el mantenimiento de las células madre, la gametogénesis, el desarrollo y la migración. SCUBE2 (péptido de señal, dominio CUB y dominio similar a EGF que contiene 2) es un gen codificador de proteínas probable correceptor de superficie celular para VEGFR2 involucrado en la angiogénesis. Y, por último, CDKN1A (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1a) funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en G1. Puede estar involucrado en la inhibición de la proliferación celular mediada por p53/TP53 en respuesta al daño del ADN.



Figura 39-. Vías significativamente alteradas en el desarrollo del CIR.

En el segundo análisis se comparó las embarazadas sanas vs las embarazadas que desarrollaron preeclampsia, en este caso los tres grupos se mantienen separados pero las pacientes con patologías presentan mayores similitudes entre ellas.

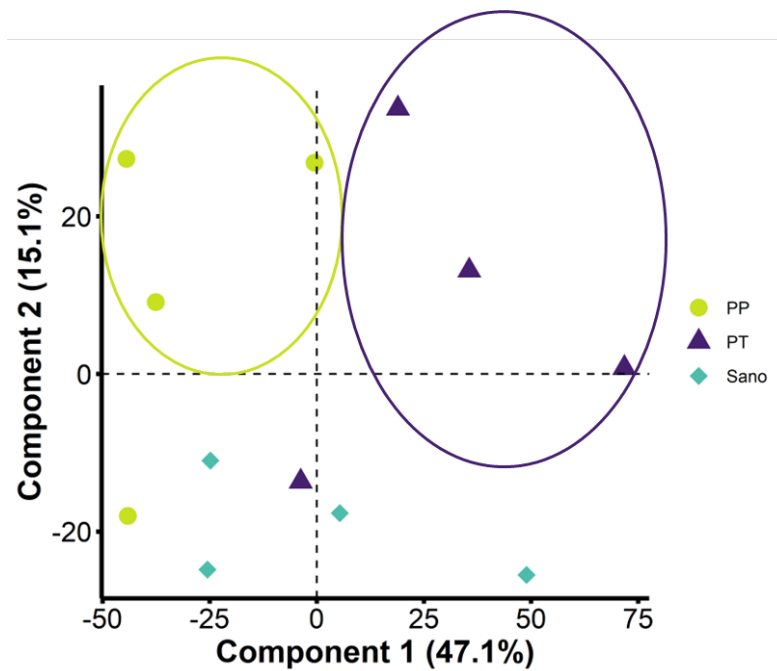


Figura 40-. Análisis no supervisado del agrupamiento de similitudes entre pacientes según la patología.

Como había gran similitud entre ellas y el número de muestras estudiadas estaba descompensado, debido a que se incluyeron 5 muestras con preeclampsia precoz y 3 de preeclampsia tardía, se analizaron todas bajo el término preeclampsia.

El análisis de expresión diferencial identificó a 12 microRNAs alterados significativamente cuando se compararon frente al perfil de microRNAs de las embarazadas control. De los cuales 6 aparecían sobreexpresados en las embarazadas con preeclampsia (figura 41)

Resultados

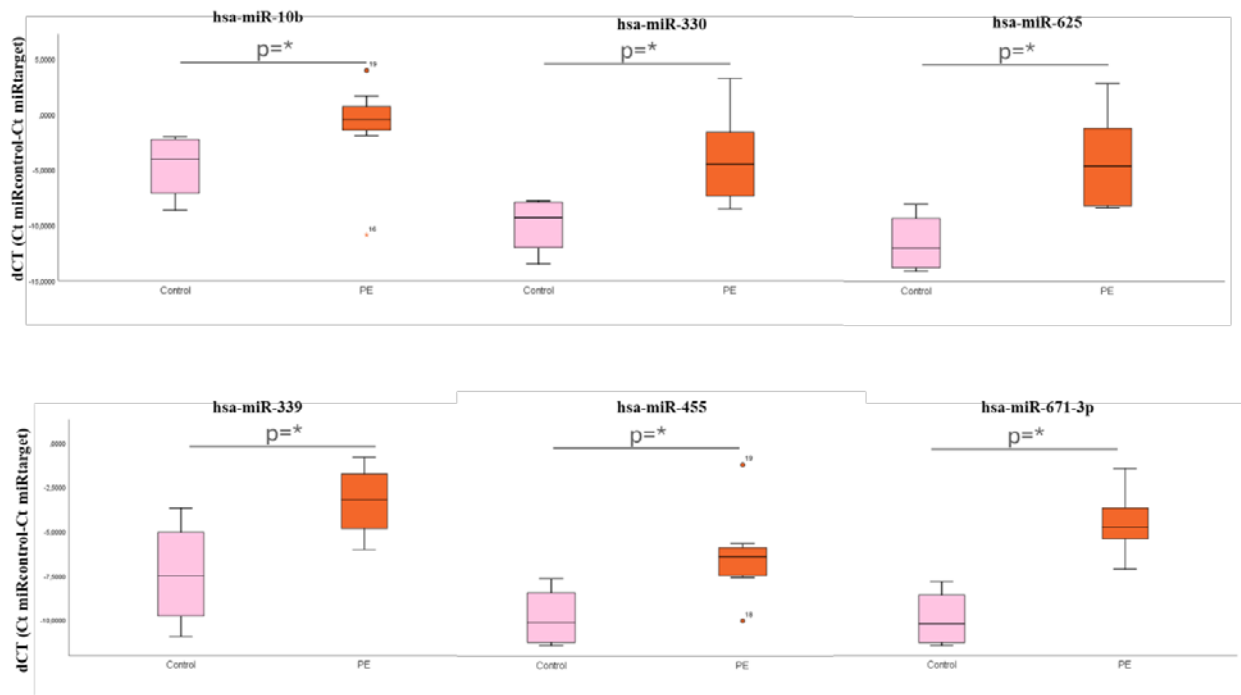


Figura 41-. MicroRNAs sobreexpresados diferencialmente en preeclampsia.

Los otros 6 microRNAs desregulados estaban infraexpresados (figura 42).

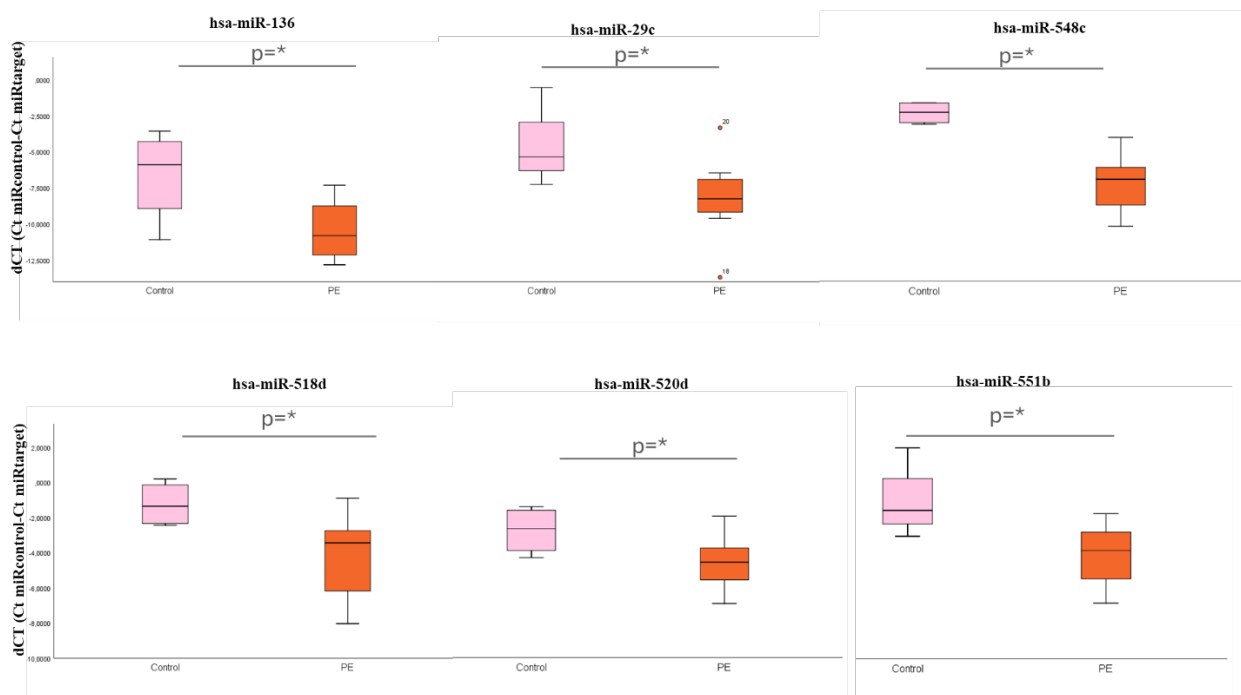


Figura 42-. MicroRNAs infraexpresados diferencialmente en preeclampsia.

Resultados

Todos los microRNAs alterados fueron introducidos en la plataforma miRPath V2.0 para el estudio de los procesos biológicos que pusieran estar alterados. Al igual que en los estudios previos se generó un heat map para conocer las vías alteradas que pudieran compartir estos microRNAs. (Figura 43)

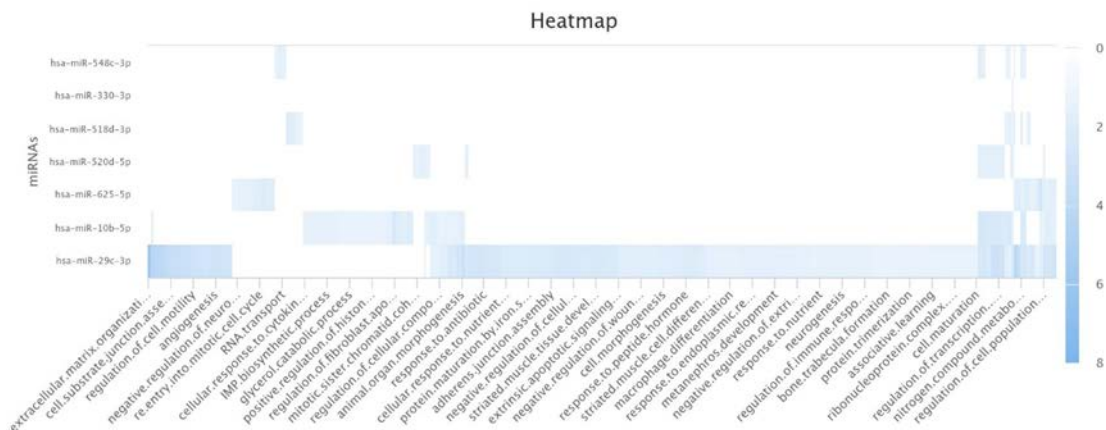


Figura 43-. Vías significativamente alteradas en el desarrollo de preeclampsia.

Revisando en profundidad todos los microRNAs desregulados en las pacientes patológicas, observamos que había un microRNA común sobreexpresado, el miR-29c, aunque en el grupo CIR no haya diferencias significativas respecto al grupo control si existe una tendencia en la disminución de la expresión que se podría confirmar si el grupo fuera más homogéneo como en el resto de grupos.

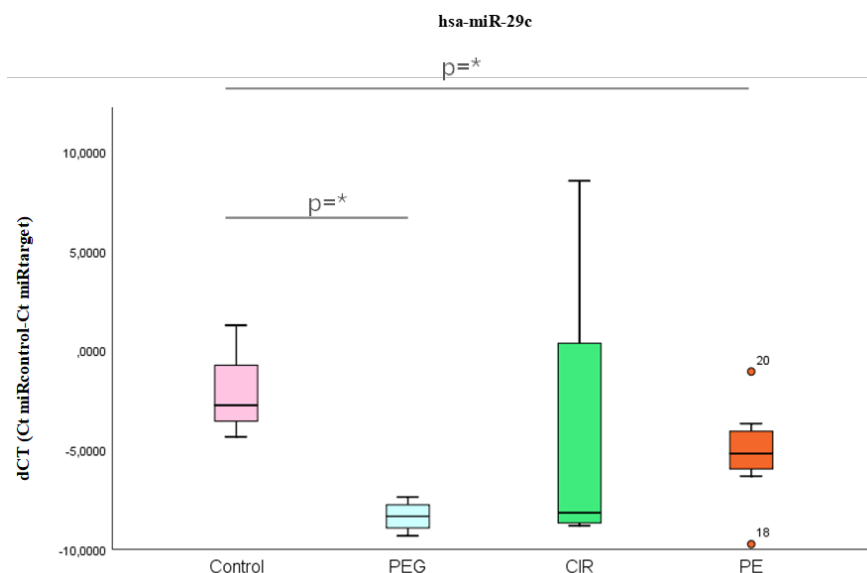


Figura 44-. Expresión del microRNA 29c.

Este microRNA está implicado en vías importantes para el desarrollo multicelular del organismo y en el desarrollo de las patologías de estudio como, respuesta a los niveles de oxígeno, respuesta al daño del DNA, respuesta a los niveles de nutrientes. Así mismo se ha visto implicado también en la vía de WNT (wingless-related integration site) que se encarga de regular procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular; y en la señalización del Calcio. Esta última vía está muy relacionada con la liberación de vesículas extracelulares lo que podría explicar el aumento de VEs liberadas en cualquier patología.

6. DISCUSIÓN

Los trastornos del crecimiento fetal y los trastornos hipertensivos del embarazo han supuesto un desafío en el abordaje tanto terapéutico como preventivo. La gravedad que suponen para la madre y para el feto, especialmente en los segundos, ha hecho que se busquen estrategias no sólo para su tratamiento, sino también para su prevención.

La edad materna avanzada se ha asociado de forma clara a peores resultados perinatales^{83,84}. Las guías internacionales incorporan la edad materna avanzada como un criterio de riesgo para desarrollar enfermedad hipertensiva en el embarazo⁸⁵⁻⁸⁷, siendo el dintel de riesgo la edad superior a 35 ó 40 años, según la guía clínica. Además, el riesgo de desarrollar preeclampsia tardía (>37 semanas de gestación) aumenta un 4% por cada aumento de año en la edad materna más allá de los 32 años⁸⁸. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos de estudio. Esto puede deberse, entre otras cosas, a que la edad media de las pacientes fue inferior a 35 años (33 años) y a que el tamaño muestral ha sido pequeño (n=116) para poder poner en evidencia estos cambios.

Tampoco hemos encontrado diferencias significativas en peso e IMC materno en los diferentes grupos de estudio, a pesar de que existe evidencia de que la obesidad incrementa el riesgo tanto de preeclampsia⁸⁵⁻⁸⁷ como de trastornos del crecimiento intrauterino⁸⁹. En nuestro estudio, el IMC medio de las pacientes incluidas fue de 27.8, inferior al límite designado por la OMS para clasificar la obesidad tipo I (IMC=30). Si bien hubo pacientes que tuvieron un IMC de 46, la mediana del total de pacientes se situó en 26, claramente inferior al rango de obesidad tipo I de la OMS. Este hecho, unido al tamaño muestral reducido (n=107), puede contribuir de manera importante a que no se pongan de manifiesto estas diferencias.

Con respecto al consumo de tabaco en la población del estudio, la prevalencia de mujeres fumadoras fue de un 15%, inferior a la estimada en España para la población general, que según los últimos datos se sitúa en un 25%⁹⁰, pero similar a la descrita para la población de mujeres gestantes, en las que los estudios realizados reflejan prevalencias de consumo que oscilan entre el 12%⁹¹ y el 27%⁹². No se reflejaron diferencias significativas entre los grupos de estudio respecto a esta variable, a pesar de que está descrito con evidencia firme que el tabaquismo es un factor de riesgo independiente para

la aparición de preeclampsia⁸⁵⁻⁸⁷ y retraso del crecimiento intrauterino^{93,94}. Al igual que ocurre con las variables anteriormente analizadas, es probable que el tamaño muestral de nuestro estudio no sea lo suficientemente grande para poder encontrar diferencias significativas en esta variable.

La población de Salamanca es mayoritariamente de raza blanca, como se puede observar en los resultados del estudio (86%). Si bien la raza afrocaribeña se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad hipertensiva del embarazo⁸⁷, en nuestro estudio no hay tamaño muestral suficiente para poder valorar la influencia de la etnia de las pacientes en el desarrollo de preeclampsia o retraso del crecimiento intrauterino fetal.

El estudio de la Tensión Arterial (TA) ha sido una de las variables clave en nuestro trabajo. La TA elevada forma parte de los criterios diagnósticos de la preeclampsia^{87,95} y además constituye un factor de riesgo aislado para presentar eventos perinatales adversos tanto maternos como fetales⁹⁵. Se estudió tanto la TA media como la TA diastólica y la TA sistólica en todos los grupos de estudio, y se obtuvieron diferencias significativas en todas las variables. La TA fue superior en el grupo de preeclampsia respecto a todos los demás grupos ($p < 0.05$). Además, se puede observar cómo la TA aumenta de forma gradual según aumenta la gravedad del cuadro: las cifras menores de TA se obtienen en los embarazos normales, los embarazos con fetos PEG tienen cifras de TA ligeramente superiores, los embarazos con fetos CIR presentan cifras de TA mayores y finalmente los embarazos de mujeres con preeclampsia presentan las cifras de TA más elevadas de todos los grupos. Estos resultados son concordantes con lo reflejado en la literatura, ya que múltiples estudios relacionan la hipertensión arterial en el embarazo con peores resultados perinatales^{96,97}.

La edad gestacional al fin de la gestación fue otro de los parámetros claves en el estudio. Uno de los principales problemas de la preeclampsia asociado al mal pronóstico perinatal es la prematuridad que puede conllevar esta patología. Si la preeclampsia alcanza criterios de gravedad o se vuelve incontrolable, es necesario finalizar la gestación para poder proteger la vida de la madre, teniendo como contrapartida una prematuridad fetal a veces extrema^{85,86,95}. En el caso de los trastornos del crecimiento intrauterino, la edad gestacional para poner fin a la gestación lo marcará no solo la disminución del crecimiento fetal, sino la aparición de modificaciones en el patrón vascular Doppler que indiquen la aparición de fenómenos de redistribución vascular fetal^{98,99}. La prematuridad es la principal causa de resultado perinatal adverso tanto en la preeclampsia como en el CIR. Teniendo en cuenta que en nuestro estudio la mayor parte de los fetos con retraso del crecimiento fueron CIR tipo I, la edad gestacional al fin de la gestación en este grupo fueron 37 semanas, que es el límite

establecido en los protocolos de control del CIR^{98,99}. Esta edad gestacional se considera una prematuridad tardía, que conlleva habitualmente pocas secuelas fetales ya que se considera que la madurez pulmonar se ha alcanzado, aunque están descritas mayores tasas de distress respiratorio fetal que en fetos a término^{100,101}. El grupo de estudio Preeclampsia fue el que presentó la menor edad gestacional al nacimiento, con una edad gestacional media de 35 semanas frente a >37 semanas en los otros grupos de estudio. De hecho, en el grupo preeclampsia está la prematuridad más extrema (25 semanas) asociada a elevada gravedad en el estado materno que obligó a finalizar la gestación. Es también llamativo el hecho de que la edad gestacional al nacimiento va disminuyendo a medida que va agravándose el cuadro clínico (mayor en los fetos normales, menor en la preeclampsia), lo que también es consistente con lo descrito en la literatura.

El tamaño y el peso de la placenta es un parámetro ampliamente estudiado en el contexto de la patología hipertensiva materna y los trastornos del crecimiento fetal asociados. Eskild et al. encuentran asociación entre bajo peso de la placenta y bajo peso fetal, especialmente cuando existe preeclampsia asociada¹⁰². Estos mismos hallazgos son corroborados por otros autores¹⁰³. En nuestro estudio también hemos encontrado hallazgos similares: el peso de la placenta fue mayor en el grupo control y fue disminuyendo de forma progresiva a medida que la enfermedad se fue agravando, siendo el menor peso placentario el del grupo preeclampsia. Sin embargo, a diferencia de otros autores, no hemos podido encontrar diferencias estadísticamente significativas, lo que podría atribuirse, nuevamente, al pequeño tamaño muestral.

El inicio del parto fue mayoritariamente inducido en todos los grupos excepto en el grupo control, y estas diferencias sí fueron significativas. Tanto en el grupo preeclampsia como en el CIR más del 80% de los partos fueron inducidos. Estos resultados son concordantes con la literatura, ya que uno de los criterios para finalizar la gestación en el caso de la preeclampsia es la propia patología (si esta se vuelve incontrolable o si la edad gestacional supera las 38 semanas)^{104,105} y en el protocolo de los trastornos del crecimiento, la edad gestacional indicada para la finalización de la gestación está definida en función del trastorno de crecimiento (37 semanas en el caso del CIR tipo I)^{98,106}, por lo que es esperable que las inducciones en estos grupos sean significativamente superiores.

La preeclampsia es una de las razones más frecuentes para la finalización del embarazo, ya que el parto constituye el único tratamiento definitivo del proceso evitando el empeoramiento de la condición materna y fetal. La mayoría de las directrices de las sociedades médicas^{107,108} recomiendan el parto vaginal debido a la alta probabilidad de éxito y las menores tasas de complicaciones. Sin

embargo, a veces es necesario realizar una cesárea. Clínicamente la cesárea se realiza ante alguna complicación o patología preexistente que amenace la vida de la gestante o la del feto. La preeclampsia precoz en el contexto de una prematuridad extrema es una de las situaciones que más se asocia a un parto por cesárea. Algunos investigadores ^{109,110} han confirmado que, en pacientes preeclámpticas, la tasa de fracaso de la inducción del parto es más de cuatro veces, y la tasa de cesáreas más del doble. Según la declaración de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre las tasas de cesárea, la “tasa ideal” de parto por cesárea se sitúa entre el 10% y el 15%¹¹¹. En nuestro estudio la mayor tasa de parto por cesárea dentro de nuestras pacientes estuvo en el grupo CIR (48%) seguido del grupo preeclampsia (44%) con resultados estadísticamente significativos. El motivo más frecuente de su realización fue por sospecha de pérdida de bienestar fetal, requiriendo la finalización del embarazo de forma más activa.

Las modificaciones del flujo placentario como marcador de preeclampsia y trastornos del crecimiento fetal han sido ampliamente estudiadas^{112,113}. Hay tanta evidencia de su relación con esta patología que el índice de pulsatilidad medio de las arterias uterinas forma parte del screening combinado del primer trimestre para la predicción de la preeclampsia en el embarazo^{114–116}. En nuestros resultados, el IP de las arterias uterinas medido en la semana 20 de la gestación no demostró tener una capacidad predictiva adecuada para la predicción de la aparición de preeclampsia o CIR: el IP de las arterias uterinas fue normal en el 72% de las pacientes que posteriormente desarrollaron preeclampsia y el 62% de las que desarrollaron un CIR. Es probable que estos resultados se deban al pequeño tamaño muestral de cada grupo. En la semana 24, el IP medio de las arterias uterinas sí mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, y fue más elevado en los grupos preeclampsia y CIR (figura 21, tabla.9). Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, no se puede considerar que el IP de las arterias uterinas de forma aislada constituya un buen marcador de estas patologías ya que hasta en un 75% de las ocasiones fue normal en estos grupos de estudio. Este hecho está descrito en la literatura; en los grandes estudios llevados a cabo para optimizar el cribado para la detección precoz de la preeclampsia, la tasa de detección utilizando el IP de las arterias uterinas de forma aislada se estima en un 58%^{117–119}. En nuestro estudio, esta tasa de detección es más baja (46%), pero próxima a lo descrito en la literatura. Es por este motivo que el IP de forma aislada no constituye un buen marcador de esta patología, pero sí cuando se combina con otros factores tanto físicos (la tensión arterial, el peso de la madre) como bioquímicos (el PlGF, la PAPP-A) en el screening combinado. Los factores clínicos juegan un papel muy importante en el desarrollo tanto de la preeclampsia como el CIR, aunque ninguno de ellos de forma aislada tiene capacidad

predictiva suficiente, la combinación de todos ellos proporciona tasas de detección superiores, lo que constituye la base del screening combinado que se utiliza en la actualidad. Nuestros resultados son concordantes con lo descrito en la literatura, si bien en algunos casos los porcentajes de detección son ligeramente inferiores, probablemente debido al pequeño tamaño muestral de nuestro estudio.

La placentación anormal, es una patología del embarazo de gran incidencia mundial y que supone un gran riesgo, tanto para la vida de la madre, como del feto, siendo el caso más grave la preeclampsia. Esta patología es secundaria a la disfunción endotelial sistémica materna causada por el desarrollo placentario anormal. Aunque los mecanismos específicos de esta alteración aún se desconocen, se han identificado factores de riesgo epidemiológicos y disfunciones inmunológicas que favorecen la placentación anormal. Además, se han propuesto numerosos factores placentarios, especialmente el papel del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor, la tirosina quinasa-1 similar al FMS (Flt-1), pero ninguno ha sido capaz de inducir un fenotipo típico real¹²⁰.

Con el fin de encontrar nuevos marcadores preventivos en el desarrollo de la placentación anormal, tratamos de relacionar la expresión de genes de interés en la patología placentaria con cada uno de los grupos de pacientes estudiados.

Existe un modelo de preeclampsia que define dos estados; el estado 1, que presenta alteraciones en la implantación placentaria y el estado 2, que conlleva cambios en torno a la función endotelial vascular alterando la permeabilidad de los vasos¹²¹. El gen *ENG* está implicado en todas estas funciones, es por ello conocido su papel en preeclampsia y otros trastornos relacionados con el embarazo. Principalmente los datos estudiados se refieren a la proteína soluble, pero respecto al estudio de la expresión génica, los estudios son menos abundantes¹²².

La mayoría de estos estudios^{123–125} observan que la expresión de este gen en placenta está significativamente elevada desde el primer trimestre de embarazo en las mujeres con PE. Al igual que nuestros datos, la expresión de *ENG* es elevada en las mujeres que desarrollan alguna patología. Nuestros resultados mostraron una mayor expresión por la elevación de la endoglina en las pacientes que desarrollan CIR y preeclampsia precoz, siendo éstos mismos, los grupos con mayor alteración placentaria.

Caniggia et al.¹²⁶ observaron que la sobreproducción de Eng podría causar la inhibición de la diferenciación e invasión de trofoblastos. Yinon et al.¹²⁷ especularon que, en condiciones patológicas de hipoxia, Eng se regula al alza de forma inapropiada, lo que conduce a una invasión anormal del

trofoblasto y a complicaciones como el desarrollo de la PE. Además, una producción excesiva de Eng provocaría un aumento de sEng en la circulación materna, lo que a su vez podría provocar una disfunción endotelial aumentando la permeabilidad vascular y desencadenando la PE.

Ninguno de todos estos trabajos ha estudiado la expresión de *ENG* en CIR donde sorprendentemente la expresión es similar a las mujeres que desarrollan PE precozmente y en nuestro estudio esta expresión presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a las otras patologías estudiadas. Lo que podría poner de manifiesto que las embarazadas con retraso uterino presentan ciertas características comunes con las PE precoces. Estas pacientes en la práctica clínica actual no acaban desarrollando preeclampsia debido a la supervisión minuciosa que se lleva a cabo desde los servicios de obstetricia y los tratamientos a los que son sometidas durante el control del embarazo.

Entre los síntomas más característicos de la preeclampsia, destaca el aumento de la presión arterial, el cual caracteriza a los trastornos de placentación. Los mecanismos que subyacen a su aparición no se conocen del todo bien. Una de las posibles causas para el establecimiento de la hipertensión es la elevación de los niveles plasmáticos de sEng sin que se conozca el mecanismo exacto por el cual se relaciona con la actividad hipertensa. Hasta la fecha, el efecto hipertenso de sEng se ha asociado a una reducción en la síntesis de NO (óxido nítrico), que es un potente vasodilatador, lo que contribuiría al incremento de la presión arterial¹²⁵.

Hasta la actualidad se conoce poco respecto a la expresión de BMP4 en mujeres preeclámpticas. Está descrito que BMP-4 es capaz de producir un incremento de la presión arterial, asociado a un incremento del estrés oxidativo y disfunción endotelial^{128,129}. La familia de proteínas morfogénicas óseas (BMP) desempeña múltiples funciones en todo el organismo. En el desarrollo embrionario, promueven la especificación endotelial y la posterior diferenciación venosa. La vía de las BMP también ejerce funciones importantes en el endotelio vascular adulto, promueve la angiogénesis y actúa como mediador del estrés oxidativo. La hipoxia es un inductor importante de la angiogénesis y la vía BMP media la respuesta endotelial a la falta de oxígeno. En respuesta a la hipoxia, pueden promover la proliferación endotelial y, por tanto, la angiogénesis. Las arterias que están expuestas a un flujo alterado muestran entonces una mayor expresión de BMP4. Su desregulación se ha relacionado con enfermedades vasculares, como la hipertensión pulmonar y la aterosclerosis. Por tanto, ésta debe estar estrictamente regulada para evitar estas condiciones patológicas^{129,130}.

Los resultados de nuestro estudio en cuanto a la expresión de genes de endoglin y BMP4 deberían ir a la par, ya que se ha demostrado que si la línea endotelial HUVEc (Human umbilical vein endothelial cells) es tratada con diferentes concentraciones de endoglin se observa un aumento en la expresión de BMP4. Sin embargo, cuando miden *ex vivo* los niveles séricos de BMP4 no encuentran diferencias entre las mujeres diagnosticadas de preeclampsia o sanas¹³⁰. Estos hallazgos están concordantes con nuestros estudios de la expresión de este gen en nuestras placentas, su expresión es apenas imperceptible y además no existen diferencias entre los diferentes grupos más severos.

En los últimos años, las consecuencias moleculares de la hipoxia celular se han revisado exhaustivamente y se ha demostrado la implicación de varios genes que modulan una respuesta adaptativa a este proceso. La familia de genes más estudiada y relacionada en dicha respuesta forma parte de un grupo de factores de transcripción denominados factores inducidos por hipoxia¹³¹.

HIF-1 α interviene principalmente durante el primer semestre en la formación de la placenta. Durante la gestación, HIF-1 α activa los mecanismos que responden a las alteraciones sobre la tensión de oxígeno, la liberación de citoquinas y los factores angiogénicos. Es un biomarcador clave para el correcto funcionamiento de la placenta y su vascularización durante la gestación¹³².

La familia de proteínas HIF son capaces de funcionar en todos los estadios de la diferenciación; el crecimiento y la función placentaria normal y anormal, durante el primer trimestre (oxígeno fisiológicamente bajo), durante la gestación media-tardía (donde hay un suministro adecuado de sangre y oxígeno a la placenta) y en embarazos patológicos complicados por hipoxia/isquemia placentaria. Fuita et al. sugieren una relación directa entre la expresión *ENG* y las condiciones de hipoxia, nosotros también quisimos estudiar esta relación y observamos que la expresión del gen *HIF-1 α* al igual que en el gen *ENG* era más alta en las pacientes CIR¹³³. Resultados semejantes obtuvieron el grupo de Nan Yu (Cell Cycle 2019)¹³⁴ donde vieron que la disminución tanto a nivel genómico como proteico de HIF-1 α , podría estar implicada en el desarrollo de la preeclampsia. La sobreexpresión de este gen promueve la invasión y la angiogénesis en el trofoblasto. Además, se ha visto que el incremento de HIF1 α únicamente ocurre en los momentos concretos hipóxicos ya que en momentos largos de hipoxia disminuye⁷. Este efecto podría explicar la diferente expresión que existe entre las embarazadas con preeclampsia precoces.

Se cree que el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) es el factor preliminar de las condiciones hipóxicas que prevalecen en la preeclampsia, lo que provoca un desequilibrio en la expresión de proteínas angiogénicas. La hipoxia induce la angiogénesis al regular las proteínas angiogénicas, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y el FLT-1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular). El cambio en la concentración de estas proteínas provoca un desequilibrio angiogénico que da lugar a daños endoteliales y a la aparición de preeclampsia¹³¹.

El proceso de neovascularización es iniciado por los factores angiogénicos, los cuales tienen un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de la placenta. El desarrollo de una compleja red vascular fetal y materna es esencial para el éxito del embarazo. Este proceso consta de tres fases: una fase inicial de vasculogénesis, posteriormente la angiogénesis o ramificación y, por último, la angiogénesis no ramificada. La vasculogénesis implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células progenitoras endoteliales de vasos preexistentes. Aunque el VEGF interviene en la fase inicial de la vasculogénesis y la angiogénesis, la ANG-1 y la ANG-2 son necesarias en la fase posterior de la angiogénesis¹³⁵. Además de lo explicado anteriormente, la hipoxia también puede regular la expresión de angiopoyetinas siendo principalmente mediadoras de la remodelación vascular y la supervivencia de las células endoteliales durante la formación de la compleja red vascular¹³⁶.

Las angiopoyetinas (angiopoyetina 1 y angiopoyetina 2) actúan durante las fases finales de la angiogénesis moldeando el desarrollo de la vasculatura sanguínea y linfática. La angiopoyetina (ANG)-1 tiene una actividad mitogénica débil, causa la maduración de células endoteliales y estabilización tisular de los vasos sanguíneos recién formados. La ANG-2 es el antagonista natural del ANG-1 en las células endoteliales, inhibe la estabilización y la maduración vascular, lo que permite mayor permeabilidad endotelial y mejor respuesta ante el estímulo del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), por lo tanto, promueve aún más la vasculogénesis y la angiogénesis, haciendo que los neovasos sigan siendo angiogénicos. La ANG-1 y ANG-2 se unen al mismo receptor 2 de cinasa de tirosina (Tie-2) específico de las células endoteliales y hematopoyéticas, el cual es activado por la ANG-1 y bloqueado por la ANG-2. La expresión de los genes VEGF-A y ANG2 está regulada positivamente por la hipoxia. La hipoxia, como en la preeclampsia, puede inducir una mayor expresión de VEGF-A y ANG-2. Por tanto, el grado de saturación de oxígeno en la sangre materna y fetal puede regular la vasculatura fetal, actuando a través del espacio intravelloso¹³⁶. Geva et al. demostraron que el análisis de las placentas de pacientes que sufrieron un

embarazo complicado por preeclampsia grave (con CIR) revelaron aumentos en la expresión de VEGF-A y ANG-2 en comparación con las placentas de mujeres normotensas¹³⁶.

Estos resultados podrían corroborar nuestro aumento de ANG-2 debido a que nuestras pacientes presentan alteraciones placentarias y este aumento puede estar relacionado con una baja tensión de oxígeno. Nuestros hallazgos son consistentes con la observación de que la hipoxia es un inductor de la expresión de varios factores angiogénicos como VEGF-A y ANG-2.

Los resultados de la investigación de Reyna-villasmil et al.¹³⁷ revelaron un aumento de las concentraciones de ANG-2 en el segundo trimestre de embarazo, lo que podría ser explicado por el aumento de las concentraciones del VEGF-A en las preeclámpticas.

Se ha demostrado que una reducción de pO₂ regula positivamente el ARNm de ANG-2 y VEGF, pero no la expresión de ANG-1 o del receptor Tie, lo que concuerda con nuestros hallazgos sobre niveles aumentados de ANG-2 y una disminución de la proporción ANG-1/ANG-2 en mujeres que desarrollan preeclampsia¹³⁸.

Hiroshi y col¹³⁹ estudiaron las concentraciones plasmáticas de Ang2 y la relación sFlt-1 / Ang-2 en embarazadas con preeclampsia. Concluyeron también que las concentraciones de Ang-2 eran significativamente más bajas en las embarazadas con preeclampsia. La cantidad de ARNm de ANG-2 en la placenta es notablemente superior a la de VEGF o ANG-1 durante todo el embarazo, disminuyendo con el avance de la edad gestacional. Estos datos señalan que el desarrollo de la disfunción vascular placentaria y la función vascular materna está asociado con un exceso de los factores anti angiogénicos en el desarrollo de la preeclampsia como se ha descrito previamente^{139,140}.

El control del crecimiento y la extensión de las ramificaciones vasculares dependen de la interacción entre los factores locales, que incluyen Ang-1, Ang-2, VEGF y la cinasa de tirosina soluble similar al FMS (sFLT-1), producidos por la placenta. Este balance puede ser alterado por condiciones patológicas, ya que en el tercer trimestre la expresión de ANG-2 placentaria disminuye en embarazadas con preeclampsia establecida debido a la ausencia de factores proangiogénicos¹³⁷.

Los datos de esta investigación corroboran los hallazgos de las investigaciones previas donde se observa un aumento de la concentración de ANG-2 en el grupo de pacientes con CIR y con Preeclampsia Precoz, en los que la condición hipóxica placentaria es más acusada, aumentando la ANG-2. Además, los datos se pueden confirmar con el estudio en pacientes PEG (sanas), en las que

no existe este desbalance de factores angiogénicos-anti angiogénicos. Este aumento de ANG-2 en CIR y en pacientes con Preeclampsia al compararlo con pacientes PEG, puede ser explicado por lo descrito anteriormente en la literatura al ser una molécula antagonista de ANG-1.

Cuando los estímulos angiogénicos son insuficientes, la Ang-2 provoca la regresión de los vasos mostrando así una disminución de ANG-2 en el tercer trimestre como se ha explicado previamente. En nuestro grupo de preeclampsia tardía, observamos el mismo descenso en cuanto a la expresión génica de la ANG-2. Sin embargo, en pacientes con preeclampsia severa se ha visto un aumento significativo tanto a nivel genómico como en las concentraciones plasmáticas sugiriendo que la Ang-2 podría ser un marcador predictivo de Preeclampsia¹⁴¹. Nuestro estudio confirma estos resultados asemejando las pacientes con Preeclampsia Precoz con las severas ya que el parto se adelantó.

Los hallazgos de esta investigación, al estar elevados los niveles de angiopoyetina-2 en la preeclampsia precoz y en CIR, se relacionan con otros datos que describen concentraciones elevadas de factores angiogénicos, antes de las manifestaciones clínicas de la preeclampsia¹⁴².

Descubrir los mecanismos de los factores angiogénicos alterados en la preeclampsia puede proporcionar ideas sobre nuevas opciones preventivas y terapéuticas. Las angiopoyetinas son necesarias para la vasculogénesis y la angiogénesis teniendo así el potencial, de ser uno de los marcadores para el desarrollo de preeclampsia debido a su gran importancia durante la implantación y desarrollo placentario¹⁴³.

La invasión de las arterias espirales, en el tejido uterino materno, por el citotrofoblasto estimula la síntesis de moléculas endoteliales como las cadherinas (VE-cadherina) e integrinas (alfa y beta 3 integrina), que permiten el cambio estructural de las células endoteliales y la formación de vellosidades coriales con vasos sanguíneos de alto flujo y baja resistencia, lo que permite aumento significativo en la tensión de oxígeno placentaria. Cuando estos mecanismos no se llevan a cabo de manera coordinada, la transformación de las arterias espirales y la desorganización de los vasos sanguíneos recién formados generan un ambiente vascular de bajo flujo sanguíneo, alta resistencia e hipoxia generalizada que consecuentemente genera un estado persistente de disfunción endotelial¹⁴⁴.

Las moléculas de adhesión (CAMs) son una serie de proteínas especializadas de membrana que median la adhesión célula-célula, así como la adhesión célula-matriz de una manera específica y distintiva. Esta adhesión entre células y entre célula-matriz no solo permite agrupar células y formar tejidos, sino que también permite la transmisión de información de manera bidireccional entre el

exterior y el interior celular. Dicha transferencia de información es importante para muchos procesos biológicos como la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y migración celular.

Su expresión se activa y desactiva durante el desarrollo, y estos cambios desempeñan un papel de control en la morfogénesis. Diversos estudios¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ han descubierto que los niveles de proteína E-cadherina suelen estar reducidos o ausentes en las células cancerosas, un hallazgo que también se asocia con una mayor invasividad y potencial metastásico. Durante las primeras fases del desarrollo placentario, las células trofoblásticas se adhieren, se desprenden, y finalmente se adhieren de nuevo a tejidos estromales más profundos de la pared uterina, compartiendo así muchas propiedades con las células cancerosas¹⁴⁸.

Las interacciones adhesivas intercelulares probablemente regulan el comportamiento invasivo de las células trofoblásticas y desempeñan un papel importante en la diferenciación de los trofoblastos y la remodelación placentaria. Dado que se sugiere que la cadherina E desempeña un papel clave en la regulación de la invasión trofoblástica, se deduce lógicamente que la expresión anormal de esta molécula de adhesión célula-célula puede estar asociada a diversas enfermedades relacionadas con el embarazo derivadas de la invasión trofoblástica. Ejemplos de estas enfermedades son la preeclampsia y el retraso del crecimiento fetal intrauterino, que son consecuencia de una invasión trofoblástica subóptima mientras en la placenta accreta y el coriocarcinoma, se asocian a una invasión trofoblástica excesiva^{149,150}.

E-cadherina se expresa en citotrofoblastos vellosos, pero se pierden cuando se diferencian, lo que resulta en la ausencia de expresión de E-cadherina en el sincitiotrofoblasto de placentas sanas de primer y segundo trimestre. La reducción de la expresión esta proteína se reporta desde el primer al tercer trimestre en placentas a término normal¹⁵⁰. Los estudios de XL-Li et al.¹⁵⁰ demostraron al igual que nosotros, que las mujeres con preeclampsia presentaban un aumento de la expresión de E-Cadherina, pero éste no estaba relacionado con la severidad, pero si están relacionados con la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, no deja de ser una afirmación controvertida ya que otros autores han visto que la expresión no cambia a lo largo del embarazo o se encuentra reducida^{151,152}.

Aunque la patogénesis de la preeclampsia es desconocida, las causas inmunológicas e inflamatorias a través de liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL6, potente activador del endotelio vascular, han sido propuestas como mediadoras de la disfunción endotelial en la preeclampsia. Las citoquinas proinflamatorias pueden inducir alteraciones estructurales y funcionales, incluyendo daño

oxidativo o interferencia en los mecanismos de contracción/relajación vascular llevando a alteraciones en la integridad y tono vascular y a la activación de los componentes de la coagulación¹⁵³.

Othman et al.¹⁵⁴ informaron de que no había diferencias significativas en los niveles medios de IL-6 en el suero materno o la placenta durante el embarazo entre mujeres preeclámplicas y normotensas al igual que en nuestro estudio, aunque nuestros resultados muestran como cabría esperar, una tendencia a mayor expresión de la IL-6 en las pacientes con preeclampsia precoz seguida de las pacientes que presentaron retraso uterino.¹⁵⁵ Lo que podría demostrar estar en concordancia con otros estudios, donde observaron que los niveles proteicos y genómicos de la IL-6 aumentaban significativamente en los tejidos placentarios preeclámplicos con respecto a las embarazadas sanas^{153,155}. Sin embargo, también ha habido estudios contradictorios sobre las concentraciones de IL-6¹⁵⁶. Quizás sea debido a que según en qué condiciones fisiológicas se encuentren las células, la IL-6 podría actuar con carácter proinflamatorio o anti inflamatorio debido a su efecto dual¹⁵⁴.

Debe de existir un equilibrio entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias con el fin de regular la inflamación a lo largo del embarazo. Cualquier modulación en su nivel puede afectar al funcionamiento de varias vías inmunológicas y apoptóticas que conducen a síndromes asociados al embarazo, como la preeclampsia¹⁵⁵.

Este trabajo que involucra a mujeres con variado espectro de severidad de la disfunción endotelial placentaria demuestra que los niveles séricos de sEng fueron significativamente más altos en pacientes con preeclampsia en comparación con aquellas con embarazo normal. Además, podemos constatar que las diferencias en los niveles plasmáticos de sEng eran más pronunciados a medida que aumentaba la gravedad de los distintos grupos estudiados lo que sugiere que los cambios en las concentraciones de sEng reflejan el alcance y la intensidad del daño al endotelio vascular sistémico^{16,125,157,158}.

La preeclampsia se caracteriza por un desequilibrio en los factores angiogénicos, incluida la sEng (endoglina soluble). Niveles de sEng presentes en el plasma de mujeres con preeclampsia, días antes de la aparición de los síntomas clínicos, contribuyen a cambios en las funciones básicas de los trofoblastos, que podrían dar lugar a defectos en la placentación. Esto favorecería la aparición de alteraciones patológicas observadas en esta enfermedad a nivel placentario: reducción de flujo

uterino, aumento de hipoxia placentaria, estrés oxidativo, aumento de citocinas inflamatorias, liberación de receptores solubles etc¹⁵⁹.

Los niveles plasmáticos de sEng también se han correlacionado con un peor pronóstico, siendo significativamente mayores en pacientes con eclampsia o síndrome de HELLP¹²⁵ y en preeclampsia precoz¹⁶, que se corresponden con las formas más graves de la enfermedad. Además, en diversos estudios in vitro también se ha observado un incremento en la liberación de sEng por parte de trofoblastos al ser sometidos a condiciones de hipoxia, estrés oxidativo o inflamación¹⁵⁹. Por tanto, alteraciones similares a las que ocurren en preeclampsia favorecen el aumento de sEng.

En nuestro caso, las elevaciones en sEng fueron más pronunciadas y, por lo tanto, potencialmente más útiles para la predicción de las pacientes que desarrollaron preeclampsia precoz y tuvieron un embarazo con crecimiento intrauterino restringido con resultados significativos.

Diversos estudios revelaron que los niveles séricos de sEng eran significativamente diferentes en las pacientes con preeclampsia que en las embarazadas sanas y en pacientes con preeclampsia con características graves que, en aquellas sin características graves, al igual que en nuestros resultados, que tuvo más concentración en las pacientes con preeclampsia precoz, que es más grave que la tardía con diferencias significativas entre los grupos¹⁶⁰.

Nuestros resultados son consistentes con los estudios previos y proporcionan mayor apoyo a la noción de que las alteraciones de este factor antiangiogénico en particular no sólo ocurren en mujeres con preeclampsia, sino también conforme aumenta la severidad de la enfermedad, particularmente cuando la preeclampsia ocurre pretérmino o se produce crecimiento intrauterino restringido^{157,160-162}.

Así pues, la sEng representa un biomarcador valioso para predecir con gran exactitud el desarrollo de resultados adversos en la preeclampsia, así como su gravedad.

El éxito del embarazo se asocia con una correcta placentación, esencial para el crecimiento y desarrollo del feto. El sincitiotrofoblasto en el embarazo normal produce y secreta una variedad de elementos necesarios para lograr este objetivo, entre ellos, los exosomas placentarios⁴⁰. Durante los últimos 10 a 15 años se ha reconocido que las vesículas extracelulares (VEs), entre los que se engloban exosomas y microvesículas, transmiten mensajes clave en la comunicación molecular entre las células. De hecho, estos vehículos tienen la capacidad de transportar proteínas, lípidos y ácidos

nucleicos, como el RNA, hacia células vecinas, lo que provoca una serie de cambios funcionales en estas células receptoras⁴⁹. Lo que supone que un aislamiento eficiente y una buena caracterización de las vesículas extracelulares de plasma es clave para su uso como biomarcadores no invasivos de diversas enfermedades. La placenta libera VEs en la sangre materna durante el embarazo como parte del recambio normal de la superficie placentaria¹⁶³.

Durante mucho tiempo se creyó que todas las VEs tenían una forma esférica y que tenían una distribución de tamaño muy particular y bastante limitada. Cuando se examinaban con tinción negativa mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), también se describían como con forma de copa sin información sobre su estructura interior. Más recientemente, las VEs también se examinaron mediante crioTEM, una técnica que no utiliza fijadores y permite así que las vesículas estudiadas conserven su estado natural. Se reveló que la morfología en forma de copa era un artefacto de los pasos de fijación incluidos en la técnica de tinción negativa y que la morfología de las VEs era mucho más diversa de lo que se creía⁴⁹. Como ha quedado reflejado en nuestro estudio se muestra la forma redonda y cóncava característica de los VEs además, se distingue con facilidad con los bordes más claros y el centro más oscuro.

Los estudios de Dragovic et al.¹⁶⁴ también utilizaron NTA para medir y cuantificar las VEs en el plasma durante el embarazo, demostrando que el número total de VEs en el plasma era significativamente elevado en las mujeres con preeclampsia precoz en comparación con los controles al igual que en nuestro estudio.

En nuestro estudio, observamos que la concentración de VEs aumentaba en el grupo de PE temprana, pero disminuía en el grupo de PE tardía. Este hecho podría deberse a una respuesta adaptativa a la hipoxia placentaria, que es una manifestación patológica de la PE. Por otra parte, la disminución de VEs en la PE tardía puede sugerir que la progresión de la PE de aparición tardía no se basa en una placenta hipoperfundida. Esto puede explicar las diferencias en la expresión clínica entre los grupos de EP. Estos hallazgos concuerdan con los de estudios previos como de los de¹⁶⁵.

La preeclampsia se asocia a una respuesta inflamatoria sistémica exacerbada, que activa las células intravasculares, haciendo que se desprendan más VEs. Las pacientes con embarazo normal y preeclampsia se asociaron a más VEs circulantes que las no embarazadas⁴⁰.

Las micropartículas de sincitiotrofoblasto (STBM) se liberan a la circulación materna en cantidades mayores en la preeclampsia en comparación con el embarazo normal posiblemente siendo el

estímulo de la respuesta inflamatoria sistémica y del daño de las células endoteliales que caracteriza el síndrome materno. Una patología placentaria similar ocurre en algunos casos de restricción del crecimiento intrauterino normotenso pero en ausencia de enfermedad materna definida únicamente por el peso al nacer para la edad gestacional no hay aumento en STBM circulante¹⁶⁶.

En cuanto al tamaño y presencia de tetrasparinas en las vesículas, se estima que tienen un diámetro entre 50-200nm y el marcador CD63 lo que concuerda con estudios previos realizados en exosomas¹⁶⁷.

Según los datos mencionados anteriormente, los microRNAs parecen estar implicados en el desarrollo placentario y, en consecuencia, en los trastornos relacionados con la placenta como los trastornos hipertensivos y del crecimiento. Varios estudios^{166,168} han sugerido que la expresión alterada de algunos microRNAs en el tejido placentario y en la circulación materna puede estar asociada con complicaciones del embarazo. Se supone que estos microRNAs desempeñan un papel crucial en diversos procesos celulares importantes para mantener un embarazo saludable, incluida la angiogénesis y la diferenciación de las células trofoblásticas. Estos procesos se interrumpen en la PE y trastornos del crecimiento, lo que sugiere que los microRNAs desempeñan un papel crucial en su patogénesis¹⁶⁹.

Se han descrito más de 1880 microRNAs en humanos y la mayoría de ellos se expresan en la placenta. Se ha demostrado una elevación significativa de los niveles de varios microRNAs extracelulares específicos de la placenta (miR-516-5p, miR-517, miR-518b, miR-520a, miR-520h, miR-525 y miR-526a) durante la gestación temprana en embarazos con inicio tardío de preeclampsia y/o retraso del crecimiento intrauterino. Según estos datos, una detección temprana de los niveles circulantes de microRNAs puede diferenciar entre mujeres con embarazos que progresaran normalmente y aquellas que podrían desarrollar posteriormente complicaciones relacionadas con la insuficiencia placentaria¹⁷⁰.

Nuestro estudio identificó microRNAs y genes desregulados en muestras placentarias en pacientes con complicaciones del embarazo, como trastornos del crecimiento y preeclampsia provocados por la insuficiencia placentaria. Al igual que Awalmen et al.¹⁷¹ vimos que varios microRNAs y genes se expresaban de manera diferencial en pacientes con PE y retraso del crecimiento intrauterino, en comparación con controles de la misma edad gestacional.

Como hemos ido estudiando a lo largo de este trabajo, la angiogénesis desempeña un papel fundamental en la fisiopatología de la preeclampsia y está regulada por varios microRNAs, entre ellos mir29c¹⁷². Estudios recientes han sugerido que miR-29 tiene funciones complejas en diversas enfermedades, demostrándose fuertes efectos antifibróticos en corazón, riñón y otros órganos¹⁷³.

La preeclampsia altera negativamente la expresión de varios miRNAs, incluido miR-29c-3p, en las células endoteliales fetales, lo que puede perjudicar la migración de las células endoteliales fetales al alterar la vía PI3K-AKT1 estimulada por FGF2. Se desconoce el mecanismo subyacente a esta disminución. Sin embargo, es posible que múltiples factores, incluyendo la desregulación de factores de crecimiento y citocinas, así como la hipoxia, puedan estar involucrados, ya que están asociados con el desarrollo de la preeclampsia. Además, dado que los microRNAs funcionan principalmente como reguladores postranscripcionales negativos de sus genes diana, la regulación a la baja de estos miRNAs podría aumentar la expresión de sus genes diana directos y potencialmente conducir a la disfunción endotelial fetal en la PE¹⁷⁴.

Nuestro estudio reveló un nivel de expresión significativamente disminuido del microRNA-136 en VEs de plasma de pacientes con PE en comparación con embarazos normales. Previamente había sido descrito que este, es uno de los micro-RNA que podría regular al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ya que se ha descrito como un gen diana del micro-RNAs 136¹⁷⁵. Su sobreexpresión ha deteriorado las células endoteliales humanas en la vena umbilical vena umbilical (HUVEC), la formación capilar y la invasión trofoblástica por supresión VEGF. Por lo tanto, este micro-RNA podría estar involucrado en la patogénesis de la PE. Nuestros hallazgos coinciden con los resultados de Zhao et al. quienes realizaron un estudio sobre cinco pacientes con PE grave y cinco mujeres embarazadas sanas. Su estudio reveló que los nueve microRNAs más desregulados fueron (miR-136, miR-495, miR-384 494, miR-16, miR-29b, miR-140-5p, miR-30a, miR-100 y miR-221)¹⁷⁶.

El microRNA-138 sobreexpresado en las pacientes con PE y CIR también promueve acciones fisiológicas como la angiogénesis, la migración celular y el establecimiento de la placenta, lo que sugiere que el mal funcionamiento de estas acciones fisiológicas contribuye a la implantación anormal del embrión y el embarazo. Se ha identificado GPR124 como un objetivo potencial de miR-138. Se ha establecido el papel fisiológico de GPR124 en la angiogénesis y la aterosclerosis potencialmente asociadas con la implantación del embrión¹⁷⁷.

El microRNA-34a es un mediador central de la función de p53 (gen supresor de tumores), actúa sobre genes diana directos y conservados de p53 que presumiblemente median la inducción de la apoptosis, la detención del ciclo y la senescencia celular¹⁷⁸. La mayoría de los estudios demuestran una infraexpresión del microRNA-34a en diferentes cánceres humano. Como la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis son mecanismos supresores de tumores, la inactivación de los miembros de la familia miR-34, que inducen estas respuestas celulares, puede ser una ventaja selectiva para las células cancerosas¹⁷⁹. Los resultados de los estudios informan principalmente sobre problemas placentarios o de cáncer, ya que existen muchos paralelismos entre el desarrollo placentario y tumoral. En la placenta, estas son funciones importantes desarrolladas por las células del trofoblasto; el deterioro de estas funciones en dichas células puede provocar un mal desarrollo e insuficiencia placentaria. Por ejemplo, las células citotrofoblásticas intermedias deben migrar y diferenciarse en células trofoblásticas extravelosas para luego invadir y remodelar las arterias espirales maternas para establecer el flujo sanguíneo materno. Este es un proceso complejo y, cuando se altera, se cree que contribuye a la etiología de la PE y el retraso de crecimiento intrauterino¹⁷¹.

Se ha visto que el microRNA-455 sobreexpresado en nuestras muestras con alteraciones del crecimiento CIR está relacionado con la inhibición del crecimiento celular y la migración de células HTR-8/SVneo a través de la modulación del eje miR-455/RUNX2¹⁸⁰.

Los estudios que evalúan la expresión global de microRNAs en placenta de embarazos con CIR son escasos, posiblemente debido a la heterogeneidad de las etiologías subyacentes a esta condición¹⁷¹.

Dado que los procesos patológicos preceden a los signos y síntomas clínicos de PE o RCIU, es posible que los miRNAs identificados en este estudio puedan alterarse en la circulación materna al principio del embarazo y puedan servir como posibles biomarcadores predictores de PE o RCIU.

El estudio de los microRNAs en el embarazo y sus complicaciones asociadas, como la preeclampsia (PE), la restricción del crecimiento fetal (FGR) y el parto prematuro es aún desconocido. Durante la última década, el conocimiento de los microRNAs relacionados con el embarazo ha aumentado y están surgiendo los mecanismos moleculares por los que los microRNAs regulan el embarazo o sus complicaciones asociadas. El embarazo es una condición fisiológica alterada regulada por factores genéticos (p. ej., genes heredados maternos), ambientales (p. ej., nutrición) y fisiológicos (p. ej., inflamación, hipoxia). Muchos estudios sugieren que la expresión de microRNA se altera debido a la respuesta a estos cambios.

Además de controlar la expresión de diferentes factores relacionados con la angiogénesis, como VEGFA, MMP2 y TIMP2, los miARN contribuyen a la regulación del sistema renina-angiotensina placentario controlando la expresión de factores antiangiogénicos, como sFlt-1 y sEng, asociado a la resistencia vascular. Además, ciertos microRNAs regulan la producción placentaria de NO y están relacionados con la presión arterial materna. Dado que los microRNAs pueden provocar la aparición y el desarrollo de la PEa través de diferentes vías, la inhibición de la expresión de éstos y el bloqueo de estas vías pueden ser eficaces para el tratamiento de la PE. Además, los distintos niveles de expresión de los microRNAs pueden estar asociada con el desarrollo y el pronóstico de la PE, aumentando la precisión de la predicción de la progresión de la PE y los resultados clínicos. Teniendo en cuenta la sobreexpresión y de los microRNAs y sus productos de expresión, los futuros tratamientos de la PE podrían dirigirse a estos microRNAs y a las vías de señalización específicas y PTEN/PI3K/AKT¹⁸¹.

Por lo tanto, investigar la expresión diferencial de microRNAs circulantes puede ayudarnos a comprender el mecanismo molecular de la interacción materno-fetal en la preeclampsia.

7.- CONCLUSIONES

- **En relación con las características generales y la identificación de riesgos clínicos que puedan estar relacionados con la aparición de enfermedad en el embarazo:**
 1. La preeclampsia y los trastornos del crecimiento intrauterino condicionan un aumento significativo de inducciones del parto y cesáreas.
 2. La preeclampsia y los trastornos del crecimiento intrauterino se asociaron con recién nacidos de menor peso y placentas de menor tamaño respecto al grupo control.
 3. La edad gestacional al nacimiento fue menor en todos los grupos de estudio respecto al grupo control.
 4. En nuestra población de estudio, el IMC materno elevado se relacionó con una mayor incidencia de preeclampsia y CIR.
 5. El mantenimiento de un índice de pulsatilidad elevado en la semana 24 se asoció a un mayor riesgo de presentar preeclampsia y retraso del crecimiento intrauterino.
- **En relación con la búsqueda de potenciales biomarcadores genéticos en sangre periférica para el diagnóstico y pronóstico de patologías asociadas al embarazo:**
 1. Los genes endoglina, factor inducible por hipoxia y angiopoyetina implicados en la disfunción endotelial y en la hipoxia, podrían ser utilizados como marcadores que puedan predecir y/o detectar diversas patologías como Preeclampsia y CIR.
 2. Las pacientes que tienen un embarazo con alteración presentaron mayores concentraciones de sEng en plasma que las embarazadas sanas debido a la disfunción endotelial que presentan incluso antes de las manifestaciones clínicas.

- **En relación a la caracterización y cuantificación de las Vesículas extracelulares y su relación con las patología materno-fetal, trastornos de crecimiento y preeclampsia:**
 1. Las VEs procedentes de los distintos grupos de estudio presentan características descritas por la sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares con una morfología redondeada un tamaño inferior a 200 nm, y presencia de la proteína de membrana CD63.
 2. El número de VEs secretadas está directamente relacionado con la severidad de la enfermedad.

- **En cuanto al contenido en microRNAs de las Ves plasmáticas:**
 1. Los niveles de algunos microRNAs se ven alterados en las diferentes complicaciones relacionadas con el embarazo como los trastornos del crecimiento y trastornos hipertensivos,
 2. El microRNA 29c infraexpresado en todas las patologías estudiadas, podría ser utilizado como biomarcador indicativo de alteración gestacional.

8.- BIBLIOGRAFIA

1. Rana S, Lemoine E, Granger J, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*. 2019 Mar 29;124(7):1094–112.
2. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*. 2018 Jul 1;13:291–310.
3. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2019;145(S1):1–33.
4. Ghulmiyyah L, Sibai B. Maternal Mortality From Preeclampsia/Eclampsia. *Semin Perinatol*. 2012;36(1):56–9.
5. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785–99.
6. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2011;66(8):497–506.
7. Lacunza Paredes RO, Pacheco Romero J. Preeclampsia de inicio temprano y tar díó: una antigua enfermedad, nuevas ideas. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2015;60(4):351–61.
8. Sociedad Española de Ginegología y Obstetrícia. Guía de Asistencia Práctica en los trastornos hipertensivos en la gestación. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2020;63:244–72.
9. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL, Ray JG, Risk H. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy : systematic review and meta-analysis of large cohort studies.
10. Gilbert JS, Ryan MJ, Lamarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: Linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(2):718–22.
11. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: Recent insights. *Hypertension*. 2005;46(6):1243–9.
12. Kim JY, Kim YM. Acute atherosclerosis of the uterine spiral arteries: Clinicopathologic implications. *J Pathol Transl Med*. 2015;49(6):462–71.
13. LaMarca B, Cornelius D, Wallace K. Elucidating immune mechanisms causing hypertension during pregnancy. *Physiology*. 2013;28(4):225–33.

14. Cemgil Arikan D, Aral M, Coskun A, Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- γ and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012;25(9):1569–73.
15. Roberts JM. Pathophysiology of ischemic placental disease. *Semin Perinatol*. 2014;38(3):139–45.
16. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(5):649–58.
17. Gaiser R. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *Survey of Anesthesiology*. 2005;49(1):14–5.
18. Steegers EAP, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *The Lancet*. 2010;376(9741):631–44.
19. Anderson D. New predictive and diagnostic biomarkers for preeclampsia. 2015.
20. Nicolás Sáez O, Jorge Carvajal C. Tamizaje y prevención de guiado por Doppler de arterias uterinas : revisión sistemática de la literatura. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2012;77(3):235–42.
21. Kasdaglis T, Aberdeen G, Turan O, Kopelman J, Atlas R, Jenkins C, et al. Placental growth factor in the first trimester: Relationship with maternal factors and placental Doppler studies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2010 Mar;35(3):280–5.
22. Chappell LC, Duckworth S, Seed PT, Griffin M, Myers J, Simpson N, et al. Diagnostic Accuracy of Placental Growth Factor in Women. 2014;
23. Tidwell SC, Ho HN, Chiu WH, Torry RJ, Torry DS. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(6):1267–72.
24. Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY, Armstrong DM, Wang W. Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(1):255–9.
25. Knudsen UB, Kronborg CS, Von Dadelszen P, Kupfer K, Lee SW, Vittinghus E, et al. A single rapid point-of-care placental growth factor determination as an aid in the diagnosis of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2012;2(1):8–15.
26. Luewan S, Teja-Intr M, Sirichotiyakul S, Tongsong T. Low maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A as a risk factor of preeclampsia. *Singapore Med J*. 2018 Jan 1;59(1):55–9.
27. Goetzinger KR, Singla A, Gerkowicz S, Dicke JM, Gray DL, Odibo AO. Predicting the risk of pre-eclampsia between 11 and 13 weeks' gestation by combining maternal characteristics and serum analytes, PAPP-A and free β -hCG. *Prenat Diagn*. 2010 Dec;30(12–13):1138–42.

28. Poon LCY, Stratieva V, Piras S, Piri S, Nicolaides KH. Hypertensive disorders in pregnancy: Combined screening by uterine artery Doppler, blood pressure and serum PAPP-A at 11-13 weeks. *Prenat Diagn.* 2010 Mar;30(3):216–23.
29. Schoedl M, Ph D, Hund M, Ph D, Verlohren S, Ph D. *new england journal.* 2016;
30. Rana S, Burke SD, Karumanchi SA. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;1:1–16.
31. Chang KJ, Seow KM, Chen KH. Preeclampsia: Recent Advances in Predicting, Preventing, and Managing the Maternal and Fetal Life-Threatening Condition. Vol. 20, *International Journal of Environmental Research and Public Health.* MDPI; 2023.
32. Chaemsaitong P, Sahota DS, Poon LC. First trimester preeclampsia screening and prediction. Vol. 226, *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* Elsevier Inc.; 2022. p. S1071-S1097.e2.
33. Atallah A, Lecarpentier E, Goffinet F, Doret-Dion M, Gaucherand P, Tsatsaris V. Aspirin for Prevention of Preeclampsia. *Drugs.* 2017 Nov 1;77(17):1819–31.
34. Rahnemaei FA, Fashami MA, Abdi F, Abbasi M. Factors effective in the prevention of Preeclampsia:A systematic review. Vol. 59, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* Elsevier Ltd; 2020. p. 173–82.
35. Rolnik DL, Nicolaides KH, Poon LC. Prevention of preeclampsia with aspirin. Vol. 226, *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* Elsevier Inc.; 2022. p. S1108–19.
36. Shennan A, Duhig K, Vandermolen B. Recent advances in the diagnosis and management of preeclampsia. Vol. 7, *F1000Research.* Faculty of 1000 Ltd; 2018.
37. Oficial P. Índice Tema 8 . Crecimiento Intrauterino Restringido : Hemodinámica Materno-Placentaria-Fetal. :1–23.
38. McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med.* 1999;340(16):1234–8.
39. Carrera JM, Figueras F, Antolín E. Hemodinamia fetal: estudio mediante Doppler. *Clin Invest Ginecol Obstet.* 2003;30(8):242–69.
40. Reyna-Villasmil E, Mayner-Tresol G, Herrera-Moya P. Exosomas placentarios y preeclampsia. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia.* 2017;63(2):219–25.
41. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255–89.
42. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology.* 2013;200(4):373–83.

43. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*. 2018;28(8):R435–44.
44. Novoa-Herrán S. Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia. *Biomédica*. 2021;41(3):555–89.
45. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med*. 2014;12(1):1–19.
46. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8).
47. Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016;164(6):1226–32.
48. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev*. 2013;27(1):31–9.
49. Lässer C, Jang SC, Lötvall J. Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential. Vol. 60, *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd; 2018. p. 1–14.
50. Miranda J, Paules C, Nair S, Lai A, Palma C, Scholz-Romero K, et al. Placental exosomes profile in maternal and fetal circulation in intrauterine growth restriction - Liquid biopsies to monitoring fetal growth. *Placenta*. 2018;64(2018):34–43.
51. Elfeky O, Longo S, Lai A, Rice GE, Salomon C. Influence of maternal BMI on the exosomal profile during gestation and their role on maternal systemic inflammation. *Placenta*. 2017;50:60–9.
52. Gonzalo-calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, lorente-Cortés V. Biomarcadores epigenéticos y enfermedad cardiovascular: los microARN circulantes. 2017;(x).
53. Zhang C. MicroRNomics: A newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics*. 2008;33(2):139–47.
54. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(6):703–11.
55. Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5 SPEC. ISS.):563–8.
56. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Donald M, Cullen BR. NIH Public Access. 2009;454(7205):780–3.
57. Albíztegui RE, Albíztegui O, González Balboa P, González Lozada LE, Aidé S, Chávez G, et al. www.medigraphic.org.mx El papel de los microRNAs (miRNAs) en el cáncer de mama. *Colonia Las Américas*. 2014;59(116):267–70.

58. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
59. LI Q, LONG A, JIANG L, CAI L, XIE L, GU J, et al. Quantification of preeclampsia-related microRNAs in maternal serum. *Biomed Rep*. 2015 Nov;3(6):792–6.
60. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*. 2009 Sep 1;15(17):5473–7.
61. Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, Weiss RH. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark Med*. 2013 Aug;7(4):623–31.
62. Hornakova A, Kolkova Z, Holubekova V, Loderer D, Lasabova Z, Biringer K, et al. Diagnostic Potential of MicroRNAs as Biomarkers in the Detection of Preeclampsia. Vol. 24, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. Mary Ann Liebert Inc.; 2020. p. 321–7.
63. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. 2006;103(24).
64. Michiel Pegtel D, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes.
65. Bounds KR, Chiasson VL, Pan LJ, Gupta S, Chatterjee P. MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4(September).
66. Fasoulakis Z, Kolialexi A, Mavreli D, Theodora M. MicroRnas in preeclampsia. Vol. 23, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Taylor and Francis Ltd.; 2023. p. 1053–5.
67. Sabapatha A, Gercel-taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2006 Nov;56(5–6):345–55.
68. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*. 2016 Oct 1;46:18–25.
69. Pillay P, Moodley K, Moodley J, Mackraj I. Placenta-derived exosomes: Potential biomarkers of preeclampsia. Vol. 12, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd.; 2017. p. 8009–23.
70. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(3):261.e1-261.e6.

71. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: Potential role of exosomal microRNAs across gestation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017 Sep 1;102(9):3182–94.
72. Chiofalo B, Laganà AS, Vaiarelli A, La Rosa VL, Rossetti D, Palmara V, et al. Do miRNAs play a role in fetal growth restriction? A fresh look to a busy corner. Vol. 2017, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2017.
73. Timofeeva A V., Gusar VA, Kan NE, Prozorovskaya KN, Karapetyan AO, Bayev OR, et al. Identification of potential early biomarkers of preeclampsia. *Placenta*. 2018 Jan 1;61:61–71.
74. Yoffe L, Gilam A, Yaron O, Polsky A, Farberov L, Syngelaki A, et al. Early Detection of Preeclampsia Using Circulating Small non-coding RNA. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
75. García-rodríguez AM, Sánchez-gonzález CM, Díaz NF, Flores-herrera H. Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno Expression of microRNAs associated with the development of. 2018;86(3):174–85.
76. Ramírez-Ordóñez O, Olvera-Valencia M, de la Jara-Díaz JF, Osorio-Caballero M, Flores-Herrera H. Expression profile of four miRNAs in the serum of patients with endometriosis development. *Ginecol Obstet Mex*. 2021;89(3):194–203.
77. Soares M, Arantes G, Maciel R. Evaluation of circulating microRNA profiles in Brazilian women with polycystic ovary syndrome : A preliminary study. 2022;1–18.
78. Guías prácticas ISUOG: diagnóstico y manejo del feto pequeño para la edad gestacional y restricción del crecimiento fetal. Comité de Estándares Clínicos. 2020.
79. Declaración de Helsinki de la AMM. Principios éticos para las investigaciones en seres humanos. 2024;
80. Chomczynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. 1987;159:156–9.
81. Pak William L.; Grossfield JAKS. Gel de policrilamida. Nature Publishing Group. 1970;1970:726–34.
82. Lötval J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Vizio D Di, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. Vol. 3, *Journal of Extracellular Vesicles*. Co-Action Publishing; 2014.
83. Khalil A, Syngelaki A, Maiz N, Zinevich Y, Nicolaides KH. Maternal age and adverse pregnancy outcome: a cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;42(6):634–43.

84. Leader J, Bajwa A, Lanes A, Hua X, Rennicks White R, Rybak N, et al. The Effect of Very Advanced Maternal Age on Maternal and Neonatal Outcomes: A Systematic Review. *J Obstet Gynaecol Can.* 2018;40(9):1208–18.
85. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 222. *Obstetrics and gynecology.* 2020;135(6):1492–5.
86. National Institute for Health and Care Excellence NICE. Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. NICE guidelines (NG133). 2019;1–57.
87. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2019;145(S1):1–33.
88. Poon LCY, Kametas NA, Chelemen T, Leal A, Nicolaides KH. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *J Hum Hypertens.* 2010;24(2):104–10.
89. Radulescu L, Munteanu O, Popa F, Cirstoiu M. The implications and consequences of maternal obesity on fetal intrauterine growth restriction. *J Med Life.* 2013 Sep;6(3):292.
90. Villalbí JR. El control del tabaquismo en España: situación actual y prioridades. *Rev Esp Salud Pública.* 2019;93(5):15.
91. Isolina Santiago-Pérez M, Pérez-Ríos MM, Malvar Pintos A, Hervada Vidal X. Consumo de tabaco en el embarazo: prevalencia y factores asociados al mantenimiento del consumo. *Rev Esp Salud Pública.* 2019;93:15–6.
92. Doz Mora JF, Gasulla Pascual G, Cárcelos Jurado S, Guerrero Bartolín I, Tintó Padró A, Prat Asensio C, et al. Evolución del hábito tabáquico durante el embarazo y el posparto. *Aten Primaria.* 2004;34(9):465–71.
93. Abraham M, Alramadhan S, Iniguez C, Duijts L, Jaddoe VWV, Dekker HTD, et al. A systematic review of maternal smoking during pregnancy and fetal measurements with meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(2).
94. Tarasi B, Cornuz J, Clair C, Baud D. Cigarette smoking during pregnancy and adverse perinatal outcomes: a cross-sectional study over 10 years. *BMC Public Health.* 2022;22(1).
95. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.* 2018;13:291–310.

96. Greenberg VR, Silasi M, Lundsberg LS, Culhane JF, Reddy UM, Partridge C, et al. Perinatal outcomes in women with elevated blood pressure and stage 1 hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(5):521.e1-521.e11.
97. Wu DD, Gao L, Huang O, Ullah K, Guo MX, Liu Y, et al. Increased Adverse Pregnancy Outcomes Associated With Stage 1 Hypertension in a Low-Risk Cohort: Evidence From 47 874 Cases. *Hypertension.* 2020;75(3):772–80.
98. Lees C, Stampalija T, Baschat AA, da Silva Costa F, Ferrazzi E, Figueras F, et al. ISUOG Practice Guidelines: diagnosis and management of small-for-gestational-age fetus and fetal growth restriction. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 2020;56:298–312.
99. Figueras F, Gratacos E. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2014 Jul 1;34(7):655–9.
100. Condò V, Cipriani S, Colnaghi M, Bellù R, Zanini R, Bulfoni C, et al. Neonatal respiratory distress syndrome: are risk factors the same in preterm and term infants? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(11):1267–72.
101. Ghartey K, Coletta J, Lizarraga L, Murphy E, Ananth C V., Gyamfi-Bannerman C. Neonatal respiratory morbidity in the early term delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(4):292.e1-292.e4.
102. Eskild A, Romundstad PR, Vatten LJ. Placental weight and birthweight: does the association differ between pregnancies with and without preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201(6):595.e1-595.e5.
103. Heinonen S, Taipale P, Saarikoski S. Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta.* 2001;22(5):399–404.
104. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.* 2018 Jul 1;13:291–310.
105. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 222. *Obstetrics and gynecology.* 2020 Jun 1;135(6):1492–5.
106. Figueras F, Gratacos E. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2014 Jul 1;34(7):655–9.
107. ACOG Committee on Obstetric Practice 2002. Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia. 2002.
108. Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P, Audibert F, et al. Diagnosis, Evaluation, and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy: Executive Summary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada.* 2014;36(5):416–38.

109. M-J XENAIUS E, Piper JM, Field N, Conway D, Langer O. Preeclampsia: Is Induction of Labor More Successful?
110. Kim LH, Cheng YW, Delaney S, Jelin AC, Caughey AB. Is preeclampsia associated with an increased risk of cesarean delivery if labor is induced? *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2010 May;23(5):383–8.
111. Declaración de la OMS sobre tasas de cesárea. Who.int; World Health Organization. 2015;
112. Dash SS, Jena P, Khuntia S, Pathak M, Rath SK. First- and second-trimester uterine artery pulsatility index as a combination factor in predictive diagnosis of pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynaecol Obstet*. 2021 Sep 1;154(3):431–5.
113. Gómez O, Figueras F, Martínez JM, Del Río M, Palacio M, Eixarch E, et al. Sequential changes in uterine artery blood flow pattern between the first and second trimesters of gestation in relation to pregnancy outcome. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2006 Nov;28(6):802–8.
114. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2019 May 1;145(S1):1–33.
115. Poon LCY, Kametas NA, Chelemen T, Leal A, Nicolaides KH. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *J Hum Hypertens*. 2010 Feb;24(2):104–10.
116. Roubalová L, Vojtěch J, Feyereisl J, Krofta L, Skřivánek A, Marková I, et al. First-trimester screening for preeclampsia. *Ceska Gynekol [Internet]*. 2019 [cited 2023 May 6];84(5):361–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31826634/>
117. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2019 May 1;145(S1):1–33.
118. Poon LCY, Kametas NA, Chelemen T, Leal A, Nicolaides KH. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *J Hum Hypertens*. 2010 Feb;24(2):104–10.
119. Serra B, Mendoza M, Scazzocchio E, Meler E, Nolla M, Sabrià E, et al. A new model for screening for early-onset preeclampsia. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2020;222:608.e1-608.e18.
120. Nadar SK, Karalis I, Yemeni E Al, Blann AD, Lip GYH. Plasma markers of angiogenesis in pregnancy induced hypertension. 2005;

121. Roberts JM, Hubel CA. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta*. 2009 Mar;30(SUPPL.):32–7.
122. Bell MJ, Conley YP. A Systematic Review of Endoglin Gene Expression in Preeclampsia. Vol. 15, *Biological Research for Nursing*. SAGE Publications Inc.; 2013. p. 129–36.
123. Farina A, Sekizawa A, De Sanctis P, Purwosunu Y, Okai T, Dong HC, et al. Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks' gestation from women destined to develop preeclampsia. *Prenat Diagn*. 2008 Oct;28(10):956–61.
124. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Udagawa Y. Microarray Analysis of Differentially Expressed Fetal Genes in Placental Tissue Derived from Early and Late Onset Severe Pre-eclampsia. *Placenta*. 2007 May;28(5–6):487–97.
125. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J ichi, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. 2006;12(6):642–50.
126. Caniggia I, Taylor C V, Ritchie JWK, Lye SJ, Letarte M. Mount Sinai Hospital; Departments of Obstetrics and [Internet]. Pediatrics. 1997. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/138/11/4977/2991344>
127. Yinon Y, Nevo O, Xu J, Many A, Rolfo A, Todros T, et al. Severe intrauterine growth restriction pregnancies have increased placental endoglin levels: Hypoxic regulation via transforming growth factor- β 3. *American Journal of Pathology*. 2008;172(1):77–85.
128. Miriyala S, Nieto MCG, Mingone C, Smith D, Dikalov S, Harrison DG, et al. Bone Morphogenic Protein-4 Induces Hypertension in Mice Role of Noggin , Vascular NADPH Oxidases , and Impaired Vasorelaxation. 2006;2818–25.
129. Dyer LA, Pi X, Patterson C. The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014;25(9):472–80.
130. Gallardo-Vara E, Gamella-Pozuelo L, Perez-Roque L, Bartha JL, Garcia-Palmero I, Casal JJ, et al. Potential Role of Circulating Endoglin in Hypertension via the Upregulated Expression of BMP4. *Cells*. 2020 Apr 16;9(4).
131. Ernesto Valdivia-Silva J, González-Altamirano JC, López-Molina K, Lazo-Velásquez JC, García-Zepeda E. Relationship between hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGF-R1)/sFlt-1: Role in the physiopathology of preeclampsia. *Clin Invest Ginecol Obstet*. 2008;35(1):11–23.
132. Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT. Beyond oxygen: Complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. Vol. 16, *Human Reproduction Update*. 2009. p. 415–31.

133. Fujita D, Tanabe A, Sekijima T, Soen H, Narahara K, Yamashita Y, et al. Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line. *Journal of Endocrinology*. 2010 Jul;206(1):131–40.
134. Yu N, Wu JL, Xiao J, Fan L, Chen SH, Li W. HIF-1 α regulates angiogenesis via Notch1/STAT3/ETBR pathway in trophoblastic cells. *Cell Cycle*. 2019 Dec 17;18(24):3502–12.
135. Seval Y, Sati L, Celik-ozenci C, Taskin O, Demir R. The Distribution of Angiopoietin-1 , Angiopoietin-2 and Their Receptors Tie-1 and Tie-2 in the Very Early Human Placenta. 2008;29:809–15.
136. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002 Sep;87(9):4213–24.
137. Reyna-villasmil E, Mejía-montilla J, Santos-bolívar J. ARTÍCULO ORIGINAL Plasma angiopoietin-2 in the second trimester as a predictor of the development of preeclampsia. 2017;63(1):11–7.
138. Bolin M, Wiberg-Itzel E, Wikström AK, Goop M, Larsson A, Olovsson M, et al. Angiopoietin-1/Angiopoietin-2 ratio for prediction of preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2009 Aug;22(8):891–5.
139. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Increase of serum angiopoietin-2 during pregnancy is suppressed in women with preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2005 Sep;18(9):1181–8.
140. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia. *Nephron Clin Pract*. 2007 May;106(1).
141. Han SY, Jun JK, Lee CH, Park JS, Syn HC. Angiopoietin-2: A promising indicator for the occurrence of severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2012 Feb;31(1):189–99.
142. Lim JH, Kim SY, Park SY, Yang JH. Effective Prediction of Preeclampsia by a Combined Ratio of Angiogenesis-Related. 2008;111(6):1403–9.
143. Leinonen E, Wathe K anneli. Early Pregnancy Ending in Preeclampsia or. 2015;95(September):126–33.
144. Cirujano M, Carrillo Esper R, Carrillo-Esper R, de Jesús Sánchez-Zúñiga M. Bases moleculares de la preeclampsia-eclampsia. Vol. 20, *Rev Invest Med Sur Mex*. 2013.
145. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Vol. 1198, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994.
146. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. Vol. 83, *British Journal of Surge*. 1996.

147. Li HW, Cheung ANY, Tsao SW, Cheung ALM. Expression of E-Cadherin and Beta-Catenin in Trophoblastic Tissue in Normal and Pathological Pregnancies. 2002;
148. Floridon C, Nielsen O, Hølund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, et al. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. Vol. 6, Molecular Human Reproduction. 2000.
149. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia Is Associated with Failure of Human Cytotrophoblasts to Mimic a Vascular Adhesion Phenotype One Cause of Defective Endovascular Invasion in This Syndrome? placenta • endothelium • vascular • uterus • cadherins • integrins. Vol. 99, J. Clin. Invest. 1997.
150. Li XL, Dong X, Xue Y, Li CF, Gou WL, Chen Q. Increased expression levels of E-cadherin, cytokeratin 18 and 19 observed in preeclampsia were not correlated with disease severity. Placenta. 2014;35(8):625–31.
151. Blechschmidt K, Kremmer E, Hollweck R, Mylonas I, Hoffler H, Kremer JM, et al. The E-cadherin Repressor Snail Plays a Role in Tumor Progression of Endometrioid Adenocarcinomas [Internet]. 2007. Available from: <http://www.molecularpathology>.
152. Xu B, Nakhla S, Makris A, Hennessy A. TNF- α inhibits trophoblast integration into endothelial cellular networks. Placenta. 2011 Mar;32(3):241–6.
153. Reyna E, Mejia J, Reyna N, Torres D, Santos J, Perozo J. Concentraciones de interleucina-6 en preeclámpticas y embarazadas normotensas sanas. Clin Invest Ginecol Obstet. 2012;39(4):159–63.
154. Al-Othman S, Omu AE, Diejomaoh FME, Al-Yatama M, Al-Qattan F. Differential Levels of Interleukin 6 in Maternal and Cord Sera and Placenta in Women with Pre-Eclampsia. 2001.
155. Aggarwal R, Jain AK, Mittal P, Kohli M, Jawanjal P, Rath G. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. J Clin Lab Anal. 2019 May 1;33(4).
156. Casart YC, Tarrazzi K. Serum levels of interleukin-6 , interleukin-1 b and human chorionic gonadotropin in pre-eclamptic and normal pregnancy. 2007;23(May):300–3.
157. Levine RJ, Lam C. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. N Engl J Med. 2006;355(10):992–1005.
158. López-Novoa JM. Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. Nephrology Dialysis Transplantation. 2007 Mar;22(3):712–4.
159. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, María Gonzalez-Nuñez B, Llano E, et al. Oxysterol-Induced Soluble Endoglin Release and Its Involvement in Hypertension. 2012;
160. Leños-Miranda A, Navarro-Romero CS, Sillas-Pardo LJ, Ramírez-Valenzuela KL, Isordia-Salas I, Jiménez-Trejo LM. Soluble Endoglin As a Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Outcomes. Hypertension. 2019 Oct 1;74(4):991–7.

161. Leañós-Miranda A, Campos-Galicia I, Ramírez-Valenzuela KL, Chinolla-Arellano ZL, Isordia-Salas I. Circulating angiogenic factors and urinary prolactin as predictors of adverse outcomes in women with preeclampsia. *Hypertension*. 2013 May;61(5):1118–25.
162. Perucci LO, Gomes KB, Freitas LG, Godoi LC, Alpoim PN, Pinheiro MB, et al. Soluble endoglin, transforming growth factor-beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. *PLoS One*. 2014 May 22;9(5).
163. Orozco-Romero, María de Jesús, Borja-Urby R, Ponce-Castañeda, Martha Verónica, Durán-Figueroa, et al. Aislamiento y caracterización celular de exosomas de plasma para su uso como biomarcadores de diagnóstico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol 50, núm 4, 2016, pp 783-790. 2016;50 número 4:783–90.
164. Dragovic RA, Southcombe JH, Tannetta DS, Redman CWG, Sargent IL. Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biol Reprod*. 2013;89(6).
165. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*. 2016 Oct 1;46:18–25.
166. Matsubara K, Matsubara Y, Uchikura Y, Sugiyama T. Pathophysiology of preeclampsia: The role of exosomes. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1–14.
167. Avenel I, Clémence N, Sanz Rubio D, Vera Solsona E. Exosomas de la vía aérea: Nueva herramienta para el manejo del asma severo. Zaragoza; 2021.
168. Rao A, Shinde U, Das DK, Balasinar N, Madan T. Early prediction of pre-eclampsia using circulating placental exosomes: Newer insights. Vol. 158, *Indian Journal of Medical Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2023. p. 385–96.
169. Ntsethe A, Mackraj I. An Investigation of Exosome Concentration and Exosomal microRNA (miR-155 and miR-222) Expression in Pregnant Women with Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Int J Womens Health*. 2022;14:1681–9.
170. Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. Absolute and relative quantification of placenta-specific microRNAs in maternal circulation with placental insufficiency - Related complications. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2012 Mar;14(2):160–7.
171. Awamleh Z, Gloor GB, Han VKM. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: Potential impact on gene expression and pathophysiology. *BMC Med Genomics*. 2019 Jun 27;12(1).
172. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013;2013.

173. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics*. 2012;44:237–44.
174. Zhou C, Zou QY, Li H, Wang RF, Liu AX, Magness RR, et al. Preeclampsia downregulates MicroRNAs in fetal endothelial cells: Roles of miR-29a/c-3p in endothelial function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017 Sep 1;102(9):3470–9.
175. Motawi TM k., Sabry D, Maurice NW, Rizk SM. Role of mesenchymal stem cells exosomes derived microRNAs; miR-136, miR-494 and miR-495 in pre-eclampsia diagnosis and evaluation. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Dec 1;659:13–21.
176. Zhao G, Zhou X, Chen S, Miao H, Fan H, Wang Z, et al. Differential expression of microRNAs in decidua-derived mesenchymal stem cells from patients with pre-eclampsia. *J Biomed Sci*. 2014 Aug 19;21(1).
177. Hermeking H. p53 Enters the MicroRNA World. Vol. 12, *Cancer Cell*. Cell Press; 2007. p. 414–8.
178. Kalfert D, Ludvikova M, Pesta M, Ludvik J, Dostalova L, Kholová I. Multifunctional roles of miR-34a in cancer: A review with the emphasis on head and neck squamous cell carcinoma and thyroid cancer with clinical implications. Vol. 10, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020.
179. Wu HM, Chen LH, Chiu WJ, Tsai CL. LIF–STAT signaling in decidual cells: a possible role in embryo implantation and early pregnancy. *J Mol Endocrinol*. 2024 Aug 1;73(2).
180. Xu X, Zhang Y, Li J, Mao B. Urothelial cancer associated 1 (UCA1) regulates trophoblast viability, proliferation, and migration via modulating the UCA1/miR-455/RUNX2 signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020 Oct 1;52(10):1120–30.
181. Shan Y, Hou B, Wang J, Chen A, Liu S. Exploring the role of exosomal MicroRNAs as potential biomarkers in preeclampsia. Vol. 15, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2024.

ANEXOS

*ANEXO 1 - Hoja de información para la paciente y
Consentimiento Informado*

Hoja de información para la paciente:

Proyecto de investigación: Estudio de biomarcadores en la preeclampsia y el retraso de crecimiento uterino (CIR)

La investigación es una de las principales maneras de mejorar el conocimiento en medicina. A través de este documento, le invitamos a participar en un estudio de investigación que estamos llevando a cabo en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, para tratar de detectar marcadores biológicos y moleculares de preeclampsia y retraso de crecimiento intrauterino.

Antes de decidir tomar parte o no en este estudio, es importante que conozca por qué estamos llevando a cabo esta investigación y qué implicará en el futuro. Por favor, tómese su tiempo para leer con detenimiento la información que le aportamos. Si tiene alguna duda adicional, no dude en consultarla con las personas que coordinarán el estudio en el Hospital Universitario de Salamanca.

Este estudio de investigación ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Salamanca.

¿Qué es la preeclampsia?

La preeclampsia es una complicación grave del embarazo, cuyos síntomas clásicos son hipertensión, edemas y excreción de proteínas en orina. Sin embargo, el espectro clínico de esta enfermedad es muy amplio y puede que algunos de estos síntomas no estén presentes o bien haya otros diferentes. La preeclampsia es una enfermedad multisistémica, que puede afectar al hígado, los riñones e incluso al cerebro, dando lugar a un cuadro convulsivo denominado eclampsia.

El origen de la preeclampsia parece ser multifactorial, y está relacionado con alteraciones de la placenta, el sistema inmune y los vasos sanguíneos, entre otros. Aunque en la actualidad existen pruebas para tratar de identificar las pacientes con un aumento de riesgo para desarrollarla e instaurar un tratamiento preventivo, estas pruebas no son completamente eficaces.

En el momento actual, no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad: sólo es posible tratarla mediante la finalización de la gestación. Este aspecto es especialmente importante cuando la

preeclampsia aparece en edades gestacionales tempranas, ya que aumenta la prematuridad y empeora la supervivencia del feto.

¿Qué es la restricción del crecimiento intrauterino?

El crecimiento uterino retardado o restringido (CIR) consiste en una disminución del ritmo de crecimiento del feto mientras se desarrolla dentro del útero, que tiene como consecuencia que el bebé no consiga alcanzar el tamaño esperado para su edad gestacional y que, por lo tanto, tenga más riesgo de padecer complicaciones perinatales, entre ellas la prematuridad. Entre los factores que condicionan la aparición de un CIR están las alteraciones placentarias, genéticas y las infecciones.

¿Cuál es el propósito de este estudio?

La finalidad de este estudio es mejorar el conocimiento de los factores que intervienen en la instauración de la preeclampsia y la aparición de la restricción del crecimiento intrauterino, mediante el estudio de marcadores biológicos y moleculares, para tratar de conseguir en un futuro herramientas terapéuticas que nos ayuden a mejorar los resultados perinatales disminuyendo los riesgos de la preeclampsia y la prematuridad.

¿Estoy obligada a participar en el estudio?

La decisión de participar en este estudio es totalmente personal y voluntaria. Si decide participar en el mismo, se le pedirá que firme un consentimiento informado para que quede constancia de su decisión. En cualquier momento usted

podrá revocar ese consentimiento y dejar de formar parte del estudio, sin tener que argumentar ninguna razón. Su participación en este estudio no afectará al resto de cuidados y controles que forman parte de la atención habitual a la embarazada en nuestro centro.

Si cambiara de opinión en relación con sus muestras o sus datos, tiene derecho a solicitar su destrucción o anonimización, a través de los responsables del proyecto. No obstante, debe saber que los datos que se hayan obtenido en los análisis realizados hasta ese momento podrán ser utilizados para los fines solicitados y podrán conservarse en cumplimiento de las obligaciones legales correspondientes.

¿Qué pasará si participo en el estudio?

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten. Al firmar este documento, usted acepta que se utilicen sus muestras para los fines de este estudio de investigación.

Si está de acuerdo en participar en el estudio, le pediremos permiso para extraer una muestra sanguínea (50 cc) para su análisis en el laboratorio.

Tras el parto, también solicitaremos guardar una muestra de la placenta. La obtención de esta muestra no afectará al recién nacido, ya que el cordón se clampa tras el nacimiento y la placenta habitualmente se desecha. Todas las muestras estarán codificadas para garantizar la confidencialidad de sus datos.

Las muestras se archivarán y quedarán custodiadas conforme a la normativa vigente, por un periodo máximo de 20 años, en el laboratorio de Biología Molecular del CAUSA. Pasado ese tiempo, se procederá a su destrucción.

¿Cuáles son los posibles problemas o riesgos de formar parte de este estudio?

La extracción de sangre periférica puede provocar dolor en el lugar de la punción, o la posibilidad de aparición de equimosis en la zona del pinchazo, etc, siendo en general problemas leves.

¿Cuáles son los beneficios de participar en el estudio?

Con su participación desinteresada en este proyecto usted estará ayudando a la investigación y la búsqueda de tratamientos para una enfermedad grave y que conlleva un alto riesgo tanto materno como fetal.

¿Se garantiza la confidencialidad de mis datos?

Toda la información sobre sus resultados se tratará de manera estrictamente confidencial. Sus datos estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo el equipo investigador podrá relacionar dichos datos con usted. El equipo investigador asume la responsabilidad en la protección de datos de carácter personal. Tanto sus muestras como sus datos se mantendrán bajo las condiciones de seguridad adecuadas y se garantiza que los sujetos no podrán ser identificados a través de medios considerados razonables por personas distintas a las autorizadas. Si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los participantes en esta investigación. Sus datos personales estarán protegidos de acuerdo con lo establecido en Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento

européo y del Consejo de 27 abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD, teniendo derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos, , y puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero los datos que Ud. ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio cuyos datos se especifican al final de este documento. Asimismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

¿Qué ocurrirá con los resultados obtenidos en este estudio?

Cuando se tengan datos suficientes para decir que el estudio está completo, los datos se publicarán en revistas médicas, para poder compartir las conclusiones del estudio con el resto de la comunidad científica. Como se ha indicado previamente, en ningún caso usted podrá ser identificada ni se mostrarán sus datos personales en dichas publicaciones.

¿Quién está organizando este estudio?

Este estudio se está llevando a cabo en el Complejo Asistencial de Salamanca, como un proyecto colaborativo entre los Servicios de Obstetricia y Ginecología, Hematología y el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras biológicas y de los datos asociados para futuras investigaciones en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI ☐ NO

Consiento en el uso futuro de los datos o las muestras que se han recogido en el presente estudio de investigación para realizar otras investigaciones relacionadas con la especialidad médica o el área de investigación del presente estudio

SI ☐ NO

Consiento en que en el futuro se acceda de nuevo a mi historia clínica para recoger datos que se consideren importantes para realizar otras investigaciones relacionadas con la especialidad médica o el área de investigación del presente estudio

SI ☐ NO

¿A quién debo preguntar mis dudas sobre este estudio?

A las personas responsables de la parte clínica de este proyecto:

Nombre: Dra. Leire Ochoa de Eribe, Dra. Verónica Alarcón

Nombre: Dra. Ana Cubo Nava

Teléfono: 923291100 – ext. 55967

Teléfono: 923291100 – ext. 55381

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Proyecto de investigación: Estudio de biomarcadores en la preeclampsia y el retraso de crecimiento uterino (CIR)

Yo (Nombre y Apellidos) _____

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He hablado con el/la Investigador/a _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que tenga ninguna repercusión negativa

Acepto voluntariamente participar en el Proyecto y autorizo el uso de toda la información obtenida.

Entiendo que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado

Nombre de la paciente

.....

Nombre del investigador/a

.....

Firma:

Firma:

Fecha:

Fecha:

ANEXO 2 - Hoja de recogida de datos

NHC:

APELLIDOS:

NOMBRE:

Nº

PATOLOGÍA GRUPO:

- ☐ Control ☐ PEG
☐ CIR I ☐ PREECLAMPSIA
☐ CIR II
☐ CIR III
☐ CIR IV

Extracción de sangre (fecha):

FUR: SEMANAS: DIAS:

EDAD: PESO: TALLA: TAS: TAD:

G....P....A....C.... A TÉRMINO: PRETÉRMINO: VIVOS: MFI:

RAZA: FUMADORA: Nº CIGARRILLOS: AAS 1T: DOSIS:mg

IPM AA UTERINAS S. 20: IPM AA UTERINAS >P95 S 20? ☐ SI ☐ NO

IPM AA UTERINAS S. 24: IPM AA UTERINAS >P95 S 20? ☐ SI ☐ NO

DIABETES GESTACIONAL: ☐ 1T ☐ 2T ☐ 3T ☐ NO

FACTORES DE RIESGO PARA PREECLAMPSIA (marcar si presente):

OTROS (marcar si presente y nº):

MAYORES	MENORES
PE previa	Edad ≥ 40 años
HTA crónica	Nulípara
Enferm. renal crónica	>10 años del último parto
DM pregestacional	IMC>35
Trombofilia/LES/SAF	PE en familiar 1er grado
Ovodonación	

NO TIENE FACTORES DE RIESGO PARA PE

CIR previo
Feto muerto anteparto previo
Abortos de repetición
Enfermedad Autoinmune
Señale cuál:

No presenta otros factores

PLACENTA	
Fecha de recogida	
Peso (g)	
Espesor (cm)	
Diámetro mayor (cm)	
Diámetro menor (cm)	

CORDÓN	
Patología	☐ No ☐ Circular ☐ Bandolera ☐ Otras
Inserción	☐ Central

☐	Marginal
☐	Velamentosa

DATOS AL DIAGNÓSTICO	
Edad gestacional (semanas)	
Percentil PFE	
IPAU	
IPAU>p95	
IPACM	
IPACM<p5	
ICP	
ICP<p5	
IPM AA UTERINAS	
IPM AA UTERINAS >p95	
DV	
DV>p95	

DATOS FIN DE GESTACIÓN	
Edad gestacional (semanas)	
Percentil PFE	
IPAU	
IPAU>p95	
IPACM	
IPACM<p5	
ICP	
ICP<p5	
IPM AA UTERINAS	
IPM AA UTERINAS >p95	
Inducción de parto (SI/NO)	
Tipo de parto	
Motivo cesárea	
Sexo fetal	
Peso fetal (g)	
Peso fetal (percentil)	

ANEXO 3 - Instrucciones para la recogida de muestras

- **INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS.**

- **PROYECTO BIOMARCADORES EN PREECLAMPSIA**

-

- 1) En el momento de ingreso en el paritorio se **solicitará la participación** en el estudio a las pacientes que cumplan los criterios de inclusión (pacientes **con preeclampsia, CIR, PEG o HTA**).
- 2) Se entregará el **Consentimiento Informado**. Si la paciente acepta, lo firmará y se guardará en el archivador la última hoja firmada por la paciente.
- 3) Se rellenará la **hoja de datos**, indicando la fecha de extracción de sangre. Esta hoja se almacenará con el CI en el archivador.
- 4) Se obtendrá una muestra de sangre periférica que será recogida de la siguiente forma a **CASOS Y CONTROLES**:

- o **3 tubos de 10 cc con EDTA (tapón morado)**
- o **2 tubos de 10 cc con heparina (tapón blanco, están en la nevera de muestras)**
- o **1 tubo de 10 cc con gelosa (tapón rojo)**

- Todos los tubos serán correctamente **identificados y enviados a los laboratorios**.
- Si no es posible enviarlos en el momento, se guardarán en **nevera**.
- Se enviarán de esta forma (hay sobres preparados para ello):

1. LABORATORIO DE **BIOLOGÍA MOLECULAR**. DR. FRANCISCO BOIX, EXT. 55338.
 - a. **1 tubo 10 CC EDTA (tapón morado)**
 - b. **1 tubo 10 cc gelosa (tapón rojo)**
 2. UNIDAD DE **TERAPIA CELULAR**, DRA. SANDRA MUNTIÓN, EXT 55750.
 - a. **2 tubos 10 cc EDTA (tapón morado)**
 - b. **2 tubos 10 cc heparina (tapón blanco)**
- 5) **Señalar en la historia** de la paciente **que participa en el estudio**, para poder recoger la muestra de placenta tras el parto.
 - 6) Tras el parto, a los **CASOS** será necesario:
 - a. **Medir placenta (diámetro mayor x diámetro menor)**
 - b. **Pesar placenta.**
 - c. **Medir grosor de placenta.**
 - d. **Extraer cotiledón, dejarlo en un frasco en PBS y enviar a LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR (Dr. Franciso Boix) o, si no es posible, guardar en NEVERA a 4°C y enviar al día siguiente.**

-

- 7) Si se puede, enviar el mismo día sangre y placenta a los laboratorios citados. Si no es posible, enviar al día siguiente y **MANTENER LA MUESTRA EN NEVERA** mientras tanto.
- 8) Registrar con nombre y DNI cada profesional que participe en el estudio y la función que ha realizado (pueden ser más de uno).
- 9) Al terminar, dejar esta hoja con los datos recogidos en la carpeta que está situada en el mostrador encima de la nevera de muestras.

PEGATINA IDENTIFICATIVA DE LA
PACIENTE

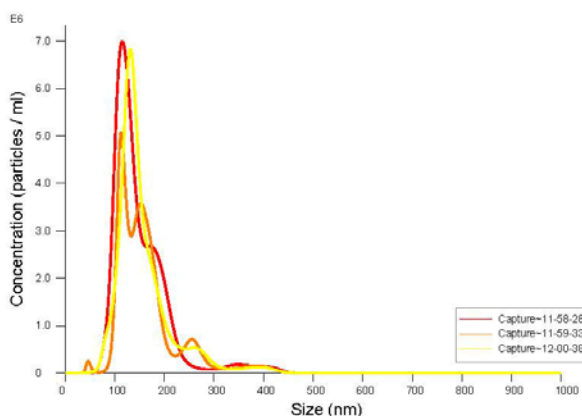
FECHA DEL PARTO / CESÁREA			
DIÁMETRO MAYOR PLACENTA			
DIÁMETRO MENOR			
PESO (g)			
GROSOR (mm)			
PATOLOGÍA CORDON	☐ NO ☐ Circular ☐ Arteria umbilical única ☐ Nudo verdadero ☐ Otras		
INSERCIÓN CORDÓN	☐ Central ☐ Marginal ☐ Velamentosa		
PERSONAL QUE HA PARTICIPADO EN EL ESTUDIO			
TAREA	NOMBRE Y APELLIDOS	DNI	PROFESIONAL
Información a la paciente y recogida de datos			
Extracción de sangre			
Recogida de muestra de placenta			

ANEXO 4 - TaqMan Human MicroRNA Array A

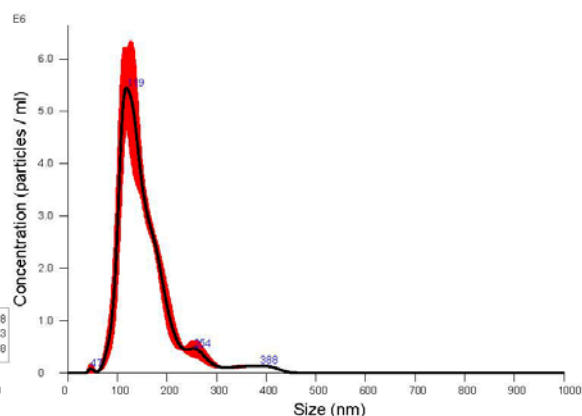
TaqMan® Human MicroRNA Array A

A	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-miR-1	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	Mamm U6	Mamm U6	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22
B	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	Mamm U6	Mamm U6	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-32	hsa-miR-33b	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-92a	hsa-miR-93
C	hsa-miR-95	hsa-miR-96	hsa-miR-98	hsa-miR-99a	hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-106b	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-129-5p
D	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-147b
E	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	RNU48	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-194
F	hsa-miR-195	hsa-miR-196b	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-208b	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-216a	hsa-miR-216b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-221
G	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	ath-miR-159a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-331-5p
H	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-155	hsa-miR-7b	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-345	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374a
I	hsa-miR-374b	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449a	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p
J	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-496
K	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516b	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c
L	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-519a	hsa-miR-519d	hsa-miR-519e	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-520g	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-526b	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532-5p
M	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548d-3p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-579	hsa-miR-582-3p
N	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-652	hsa-miR-653	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p
O	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-888	hsa-miR-889	hsa-miR-890	hsa-miR-891a	hsa-miR-891b	hsa-miR-892a	hsa-miR-147
P	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-220	hsa-miR-220b	hsa-miR-220c	hsa-miR-298	hsa-miR-325	hsa-miR-346	hsa-miR-376c	hsa-miR-384	hsa-miR-412	hsa-miR-448	hsa-miR-492	hsa-miR-506	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-517b	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-520b	hsa-miR-520e	hsa-miR-520f
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

ANEXO 5 - Ejemplo de captura de NTA (NANOSIGHT)

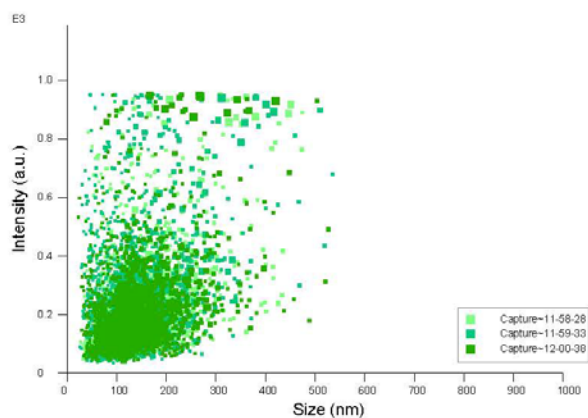


FTLA Concentration / Size graph for Experiment:
Capture 2022-03-10 11-57-10



Averaged FTLA Concentration / Size for Experiment:
Capture 2022-03-10 11-57-10
Error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

Included Files Capture 2022-03-10 11-58-28 Capture 2022-03-10 11-59-33 Capture 2022-03-10 12-00-38 Details NTA Version: NTA 3.4 Build 3.4.003 Script Used: SOP Standard Measurement 11-57-10AM 10- Time Captured: 11:57:10 10/03/2022 Operator: Sara Pre-treatment: Sample Name: 124-20 SMO. CIR (Retraso uterino) Diluent: PBS 1X pH 7.6 1:100 Remarks: 124-20 SMO. CIR (Retraso uterino) 1:100 PBS 1X pH 7.6 3 capturas 60 seg dilution SG 11.2 CL9 Capture Settings Camera Type: sCMOS Laser Type: Blue488 Camera Level: 9 Slider Shutter: 607 Slider Gain: 15 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 25.0 - 25.0 °C Viscosity: 1.0 cP Dilution factor: Dilution not recorded Syringe Pump Speed: 100 Analysis Settings Detect Threshold: 2 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 12.8 - 13.8 pix	Results Stats: Merged Data Mean: 156.1 nm Mode: 118.3 nm SD: 59.3 nm D10: 104.4 nm D50: 140.5 nm D90: 223.6 nm Stats: Mean +/- Standard Error Mean: 156.7 +/- 3.5 nm Mode: 120.1 +/- 5.9 nm SD: 59.2 +/- 1.5 nm D10: 105.3 +/- 2.4 nm D50: 141.2 +/- 4.4 nm D90: 229.5 +/- 11.9 nm Concentration (Upgrade): 4.53e+08 +/- 4.14e+07 particles/ml 45.0 +/- 2.3 particles/frame 62.0 +/- 1.6 centres/frame Concentration measurements may be unreliable See summary file for more info
--	--



Intensity / Size graph for Experiment:
Capture 2022-03-10 11-57-10

Script Used: (Full Text):

SOP Standard Measurement 11-57-10AM 10Mar2022.txt

