

**ANALISIS DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ANGIOGÉNESIS
PLACENTARIA REVELA UN MECANISMO DE ADECUACIÓN
HOMEOSTÁTICA EN MUJERES CON VASODILATACIÓN REDUCIDA**

LAURA MARIA RODRIGUEZ SANTA



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

SANTIAGO DE CALI

2015

**ANALISIS DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ANGIOGÉNESIS
PLACENTARIA REVELA UN MECANISMO DE ADECUACIÓN
HOMEOSTÁTICA EN MUJERES CON VASODILATACIÓN REDUCIDA**

LAURA MARIA RODRIGUEZ SANTA

Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Doctor en
Ciencias Biomédicas

DIRECTOR

ANDRES ORLANDO CASTILLO

CO-DIRECTOR

ADALBERTO SANCHEZ



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

SANTIAGO DE CALI

2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres, por su amor incondicional, entendimiento, soporte y colaboración durante estos años.

Mis más sinceros agradecimientos a los Doctores Ana Cecilia Aguilar de Plata y Andres Orlando Castillo por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación; su colaboración, apoyo y soporte académico han sido fundamentales para el desarrollo de este proceso.

Por la amistad, apoyo y ayuda durante este proceso quiero dar mi gratitud a mis compañeros del grupo de Nutrición y a aquellos que compartieron conmigo este proceso de formación.

A las entidades financiadoras que hicieron posible el planteamiento y ejecución de este trabajo, el Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología (Colciencias), la Fundación FES y la Universidad del Valle.

Y sin lugar a dudas a todas las madres que hicieron parte de este estudio y dieron su consentimiento para continuar estos procesos investigativos.

TABLA DE CONTENIDO

	AGRADECIMIENTOS	1
	LISTA DE ABREVIATURAS	6
	LISTA DE FIGURAS	9
	LISTA DE TABLAS	11
1.	RESUMEN	12
2.	INTRODUCCIÓN	15
3.	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	19
3.1	Cambios en la hemodinámica durante el embarazo	19
3.2	Placentación	21
3.3	La angiogénesis en el desarrollo vascular de la placenta	22
3.4	La vasodilatación mediada por flujo, una medición no invasiva de función endotelial	25
4.	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo General	29
3.2	Objetivos específicos	29
5.	HIPÓTESIS	29
	CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE MUESTRAS DE PLACENTA PERTENECIENTES A MUJERES CON ΔVMF POSITIVO VS. NEGATIVO.	
1.1	INTRODUCCIÓN	30
1.2	MATERIALES Y MÉTODOS	32
1.2.1	Población y Muestra	32
1.2.2	Selección de muestras	33
1.2.3	Extracción y cuantificación de ARN a partir de tejido de placenta	34
1.2.4	Análisis transcripcional	34
1.2.4.1	Enriquecimiento de un subgrupo de ARNs a partir de ARN total	36
	Fragmentación del ARN total	36

1.2.4.2		
1.2.4.3	Conversión a ADN copia (ADNc)	36
1.2.4.4	Ligación con adaptadores y amplificación por PCR	36
1.2.4.5	Selección del tamaño	37
1.2.4.6	Secuenciación	37
1.2.4.7	Inspección de la calidad de las secuencias	38
1.2.4.8	Alineamiento y mapeo de las secuencias usando Bowtie2	39
1.2.4.9	Cuantificación de transcritos usando GFOLD	39
1.2.4.10	Visualización de los resultados	41
1.2.4.11	Análisis de enriquecimiento a partir de sets de genes	41
1.3	RESULTADOS	43
1.3.1	Mapeamiento y cuantificación de las secuencias obtenidas por RNA-seq	43
1.3.1.2	Análisis de genes diferencialmente expresados, involucrados en vías angiogénicas	44
1.4	DISCUSIÓN	47
1.4.1	La magnitud de cambio de la VMF (Δ VMF) en el embarazo	47
1.4.2	Variaciones negativas en el Δ VMF evidencian cambios en la expresión génica de placenta comprometiendo vías de señalización angiogénica	49
1.4.2.1	IGFBP1 y sus bajos niveles de expresión en placenta	52
1.4.2.2	Leptina una hormona pleiotrópica con actividades vasodilatadoras y pro-angiogénicas	54
1.4.2.3	Sobreexpresión de PGF en tejido de placenta a término	56
 CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ANGIOGÉNESIS PLACENTARIA DE MUJERES CON CAMBIOS EN LA ΔVMF.		
2.1	INTRODUCCIÓN	58
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS	60

2.2.1	Población y Muestra	60
2.2.2	Selección de muestras	61
2.2.3	Extracción y cuantificación de ADN y ARN a partir de tejido de placenta	61
2.2.4	Arreglos de PCR para metilación de ADN	62
2.2.5	Arreglos de PCR para miRNAs	63
2.2.6	Determinación de posibles blancos de regulación por parte de miRNAs	64
2.2.7	Análisis de enriquecimiento a partir de sets de genes	65
2.2.8	Identificación y cuantificación de la proteína IGFBP1 por la técnica de Western Blot	66
2.2.8.1	Preparación de la muestra	66
2.2.8.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	67
2.2.8.3	Electro transferencia	67
2.2.8.4	Inmuno Blot	68
2.2.8.5	Revelado	68
2.2.9	Análisis de datos	69
2.3	RESULTADOS	70
2.3.1	Análisis epigenético a nivel pre-transcripcional mediante la metilación de las regiones promotoras de genes involucrados en angiogénesis	70
2.3.2	Análisis epigenético post-transcripcional mediante los perfiles de expresión diferencial de angiomiRs en placentas con Δ VMF negativo	71
2.3.3	Relación entre el perfil de expresión de hsa-miR-92a, hsa-miR-132 e <i>igfbp1</i> a nivel de mensajero y proteína	73
2.4	DISCUSIÓN	75
2.4.1	Regulación epigenética a nivel transcripcional por parte de la metilación de la región promotora de leptina	75
2.4.2	Regulación post-transcripcional mediante la expresión diferencial de angiomiRs en tejido de placenta	76
2.4.3	Relación entre los mecanismos epigenéticos y los genes diferencialmente expresados a la baja	79

2.4.3.1	Regulación pre y post-transcripcional de la expresión de leptina en placentas de mujeres que presentaron Δ VMF negativo	79
2.4.3.2	Regulación post-transcripcional de <i>igfbp1</i> en placentas de mujeres que presentaron Δ VMF negativo	80
6	CONCLUSIONES	82
7	PERSPECTIVAS	84
8	REFERENCIAS	85
	ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Copia del ácido desoxirribonucleico
AGO	Proteína Argonauta
angiomir	miRNA que regula angiogénesis
ARNm	Mensajero del ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CT	Ciclo que pasa el umbral de amplificación
DICER	Endoribonucleasa tipo III
DG	Diabetes gestacional
DROSHA	Ribonucleasa tipo III
EC	Célula endotelial
ER	Enzima de restricción
ES	Score de enriquecimiento
FASTQ	Formato basado en texto para almacenar una secuencia biológica y su puntaje de calidad
FDR	Tasa de falsos positivos
GFOLD	Herramienta bioinformática para la cuantificación y análisis de expresión diferencial de transcritos
GSEA	Análisis de enriquecimiento de grupos de genes
HIF1 α	Factor inducido por hipoxia 1 alfa

IGF1	Factor de crecimiento similar a insulina 1
IGFBP1	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 1
IGFR1	Rector del factor de crecimiento similar a insulina 1
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Daltons
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 oncogen homólogo del sarcoma viral felino
LEP	Leptina
miRNA	Micro ácido ribonucleico
NES	Score de enriquecimiento normalizado
NO	Óxido nítrico
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Preeclampsia
PGF	Factor de crecimiento de placenta
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
Q-PCR	PCR cuantitativa
RCIU	Restricción del crecimiento intrauterino
Read	Lectura de una secuencia
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNasa	Enzima que degrada el ARN

RNA-seq	Secuenciación de moléculas de ARN
RT-PCR	PCR de retrotranscripción
SAM	Formato de texto para almacenar datos de secuencias en una serie de fichas delimitadas por columnas
SDS- PAGE	Dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida
TBST	Buffer Tris NaCl – Tween
TRBP	Proteína Tar HIV-1 de unión al ARN de doble cadena
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VMF	Vasodilatación mediada por flujo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CAMBIOS HEMODINÁMICOS DURANTE EL EMBARAZO	20
FIGURA 2	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR	24
FIGURA 3	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS EMPRESAS SOCIALES DEL ESTADO (E.S.E.) EN LA CIUDAD DE SANTIAGO DE CALI	33
FIGURA 4	TÍPICO EXPERIMENTO DE RNA-SEQ	35
FIGURA 5	DISTRIBUCIÓN DE LAS SECUENCIAS	38
FIGURA 6	EJEMPLO DE RANKINGS DE GENES POR GFOLD, FOLD CHANGE Y P-VALOR	40
FIGURA 7	CUANTIFICACIÓN POR MEDIO DEL GFOLD SCORE PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DIFERENCIAL DE TRANSCRIPTOS EN EL GRUPO Δ VMF NEGATIVO RESPECTO AL POSITIVO	44
FIGURA 8	PORCENTAJES DE METILACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS DE GENES INVOLUCRADOS EN ANGIOGÉNESIS	70

FIGURA ANGIOMIRS CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN 72
9 PLACENTA DE MUJERES CON Δ VMF

FIGURA SOBREEXPRESIÓN DE HAS-MIR-92A Y HSA-MIR-132 74
10 ESTARÍA DISMINUYENDO LOS NIVELES DE EXPRESIÓN
DE IGFBP1 A NIVEL DE ARNM Y PROTEÍNA EN EL GRUPO
 Δ VMF(-)

FIGURA MECANISMO HOMEOSTÁTICO EN LA ANGIOGÉNESIS DE 83
11 LA PLACENTA DE MUJERES CON Δ VMF NEGATIVA

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	PORCENTAJES DE READS MAPEADAS RESPECTO AL GENOMA DE REFERENCIA (HG19)	43
Tabla 2	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ANGIOGÉNICAS SEGÚN LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL GRUPO Δ VMF NEGATIVO	45
Tabla 3	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL GRUPO Δ VMF NEGATIVO RESPECTO AL GRUPO POSITIVO	46
Tabla 4	REGIONES PROMOTORAS DE GENES INVOLUCRADOS EN ANGIOGÉNESIS	63
Tabla 5	LISTA DE ANGIOMIRS EVALUADOS	65
Tabla 6	DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	66
Tabla 7	PORCENTAJE DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE LEPTINA Y KIT EN MUESTRAS QUE PRESENTARON Δ VMF POSITIVOS Y NEGATIVOS	71
Tabla 8	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CON POTENCIAL ANGIOGÉNICO DE GENES QUE PRESENTARON UNA BAJA EXPRESIÓN POR POSIBLE REGULACIÓN DE ANGIOMIRS	72
Tabla 9	ANGIOMIRS QUE PODRÍAN ESTAR REGULANDO LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN VÍAS ANGIOGÉNICAS	73

1. RESUMEN

El embarazo requiere de una adecuada función endotelial que permita responder fisiológicamente frente a los grandes cambios hemodinámicos que se presentan. La vasodilatación mediada por flujo (VMF) es una técnica no invasiva usada para medir la respuesta vasodilatadora del endotelio en respuesta al estrés por fricción, que en el embarazo se debe, principalmente, al incremento en el flujo sanguíneo de la madre hacia la placenta en formación, dado que en el endotelio se producen factores de crecimiento y moléculas claves para la angiogénesis, este último, un proceso fundamental para el desarrollo vascular de la placenta. Para lo cual, se puso en consideración, un posible vínculo entre el impacto que la función vasodilatadora del endotelio podría generar sobre la angiogénesis de la placenta, trayendo consecuencias a nivel de la regulación de la angiogénesis placentaria en las mujeres que presentaran cambios negativos en la VMF.

Para evaluar esta hipótesis, se escogieron mujeres primigestantes, entre los 21 y 27 años de edad, que habían hecho parte de un estudio de seguimiento a lo largo del embarazo hasta el momento del parto. Estas hacían parte del grupo control que no fue complementado con micronutrientes ni sometido a ninguna rutina de ejercicio físico, de las cuales se tomaron muestras de placenta a término, e información de la magnitud de cambio de la variable VMF, que fue establecida mediante la diferencia entre la VMF de la semana 32 menos la VMF de la semana 20 de la gestación (Δ VMF). Separando dos grupos de mujeres entre aquellas que presentaron valores altamente positivos (seis mujeres) frente a otras con valores altamente negativos (cinco mujeres) para Δ VMF. Ambos grupos se

consideraron embarazos sanos, al no haber reportado ningún tipo de patología durante el período gestacional. Sin embargo, estos cambios podrían estar generando modificaciones a nivel molecular. Para ello, se realizó un análisis transcripcional en estos dos grupos, usando la técnica RNA-seq, a partir de dos muestras de tejido de placenta por grupo; las edades de estas mujeres fueron 21 y 27 años en cada grupo. Los niveles de expresión diferencial fueron caracterizados usando el algoritmo GFOLD para la cuantificación de los transcritos. Adicionalmente, se evaluaron mecanismos epigenéticos en las mismas muestras de placenta, como la metilación del ADN, en regiones promotoras de genes involucrados en la angiogénesis, y miRNAs en seis muestras del grupo Δ VMF positivo y cinco del grupo Δ VMF negativo (en ambos grupos las edades de las madres fueron homogéneas), con funciones regulatorias sobre la angiogénesis. En ambos casos se utilizaron arreglos de PCR como metodología de detección y cuantificación.

El análisis transcripcional permitió identificar, en el grupo Δ VMF negativo, dos genes con significativa baja expresión, la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*igfbp1*) con un GFOLD score = -1.164, y a leptina (*lep*), con un GFOLD score = -0.079; así como un gen sobreexpresado, el factor de crecimiento placentario (*pgf*), con un GFOLD score = 0.181. Por otra parte, el análisis de los mecanismos epigenéticos mostró, a nivel de la regulación pre-transcripcional, que en los porcentajes de metilación de las regiones promotoras de los genes involucrados en angiogénesis, solo los perfiles de *kit* (V-kit Hardy-Zuckerman 4 oncogen homólogo del sarcoma viral felino) y *lep*, presentaron altos porcentajes de metilación en el grupo Δ VMF negativo; para *kit* estos fueron 66.8% – 52.9%;

mientras que para *lep* fueron de 58.4% – 76.2%. Por otra parte, los perfiles de expresión de los miRNAs, mostraron ocho de estos sobreexpresados en el grupo de mujeres con Δ VMF negativo, estos fueron, has-miR-16,-17,-23a,-27a,-92a,-132,-145,-378 con p-valores = 0,0446, 0.017, 0.0285, 0.0106, 0.0446, 0.0446, 0.0441, 0.0441, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos se pudo establecer una conexión entre los mecanismos de regulación epigenética y los genes que presentaron una baja expresión. El gen *igfbp1* es un blanco predictivo de hsa-miR-92a y hsa-miR-132, los cuales podrían estar regulando negativamente la expresión de este ARNm; mientras que la baja expresión de *lep* podría explicarse por los porcentajes de metilación en su región promotora, así como por la posible regulación negativa a nivel post-transcripcional de hsa-miR-17 y hsa-miR-27a. Tanto *igfbp1* como *lep* se expresan en placenta y participan en las vías de señalización angiogénicas, que tienen en común la vía de señalización de los sustratos 1/2 del receptor de insulina (IRS1/2).

Con base en estos resultados se propone un mecanismo de adecuación homeostático, mediante el cual, vías de señalización pro-angiogénica pueden ser activadas en búsqueda de atenuar las señales anti-angiogénicas disparadas por una reducida vasodilatación. Sin embargo, cabe resaltar, que el efecto en la dinámica celular al verse sometida a estos cambios podría marcar tanto a las madres como a sus futuros hijos a la predisposición a desarrollar enfermedades vasculares como la diabetes en la etapa adulta, para los niños, y en unos próximos años para las madres.

2. INTRODUCCIÓN

Cada año, aproximadamente 210,000,000 de mujeres en todo el mundo quedan en embarazo [1]; aunque la mayoría son capaces de sobreponerse con éxito a la gran cantidad de modificaciones circulatorias requeridas durante el mismo, no obstante, una parte considerable de los embarazos no siempre siguen un curso normal; se estima que un 5% de estos experimentan desórdenes hipertensivos, como es el caso de la preeclampsia (PE) [2]; 9.6% presentan parto prematuro [3]; 9.5% parto con bajo peso al nacer para el neonato, este se define como un peso menor a 2,500 g cuando se superan las 37 semanas de gestación [4]; y un 7% diabetes gestacional (DG), en este caso el rango de prevalencia varía entre un 1 - 14% dependiendo de la población estudiada y de la prueba diagnóstica empleada [5]. Estas patologías del embarazo están asociadas con morbi-mortalidad materna, fetal y neonatal, y con consecuencias adversas después del parto para la salud tanto de la madre como de su descendencia [6-8]. Esta situación es de particular interés en nuestro país, de acuerdo con cifras del Ministerio de Salud y de la Protección Social, en Colombia la razón de mortalidad materna en el 2011 se estimó en 69.3 por 100,000 nacidos vivos [9]. Cabe resaltar que este informe, reporta un incremento del 30.3%, entre 1998 y 2011, en las muertes maternas debido a afecciones obstétricas no clasificadas, que incluyen a las enfermedades del sistema circulatorio que complican el embarazo, el parto y el puerperio [9].

Actualmente, un hecho que llama considerablemente la atención es que, a nivel mundial, el número de mujeres que presentan una enfermedad cardiovascular pre-existente o desarrollan problemas cardíacos durante el embarazo está incrementando, y las enfermedades cardiovasculares son la causa líder de mortalidad no-obstétrica durante el embarazo [10,11].

Normalmente, los cambios fisiológicos que ocurren durante la gestación y en el período peri-parto representan un reto para el sistema cardiovascular de todas las mujeres y especialmente para aquellas con condiciones cardiovasculares previas.

Dentro de los mayores retos que enfrenta el sistema cardiovascular en el embarazo están el incremento en el gasto cardíaco y la disminución de la resistencia vascular periférica, todo esto debido a un aumento en la actividad vasodilatadora del endotelio [12]. Este último, es crítico en la fisiología cardiovascular del embarazo, ya que regula la producción de varios factores responsables de la vasodilatación, como son la prostaciclina y el óxido nítrico (NO) [13]. Alteraciones en la función vasodilatadora materna, como es el incremento en la resistencia vascular y la subsecuente reducción en el flujo de sangre uterino al inicio de la gestación, han sido usados como predictores de embarazos de alto riesgo, asociados con el retraso en el crecimiento fetal, preeclampsia (PE) y restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) [14,15,16]. Su principal molécula vasodilatadora, NO, está involucrada en los procesos de implantación, invasión del trofoblasto y regulación del tono vascular de la placenta [17]. Por lo tanto, es factible pensar que problemas en la vasodilatación podrían tener un impacto en el desarrollo de la red vascular de la placenta. Esto significa, que podrían incidir sobre los procesos de vasculogénesis y angiogénesis; siendo este último de gran importancia para la ramificación y mantenimiento de la red vascular útero-placentaria [18,19].

Varios estudios han mostrado evidencia que sugiere una asociación entre enfermedades vasculares propias del embarazo, principalmente la preeclampsia, y un desbalance en el proceso angiogénico. En algunos casos estas asociaciones han mostrado graves consecuencias no solo para el feto sino también para la madre [20-24]. Aunque se conocen las principales vías de señalización implicadas en la angiogénesis, aún se

desconocen muchos de los mecanismos regulatorios que podrían verse alterados y tener un impacto sobre este proceso. Esto debido a que alteraciones de tipo sistémico, como es el caso de una deficiente vasodilatación, podrían influenciar cambios en la dinámica celular con repercusiones en la regulación de procesos como la angiogénesis.

Lo anterior lleva a plantearse acerca de la existencia de una posible conexión entre una presión sistémica, como es una insuficiente vasodilatación a lo largo del embarazo y las alteraciones a nivel molecular a las que debe responder la red vascular de la placenta, específicamente a nivel de angiogénesis, ya que es un proceso que persiste hasta el final del embarazo y que debe afrontar en mayor medida los retos que implican problemas en la regulación del tono vascular. Es en este punto, donde la epigenética, ciencia que estudia los cambios en la expresión de la actividad génica que no son causados por modificaciones en la secuencia del ADN, se presenta como una nueva forma de abordar y dilucidar los interrogantes que la genética clásica no ha permitido responder; abriendo la posibilidad de explorar esta posible conexión y evaluar el efecto sobre la expresión de genes involucrados en angiogénesis. Dentro de los principales mecanismos epigenéticos se encuentran: la metilación del ADN a nivel de sus regiones promotoras, que consiste en regular la expresión de los genes en un ambiente en particular, lo que repercute en el grado de expresión de los mismos y por tanto, conlleva a alterar el fenotipo final. Otro mecanismo son los microRNAs (miRNAs), pequeños ARNs no codificantes, cuya regulación en la expresión génica es de tipo post-transcripcional sobre una gran cantidad de posibles ARNm blancos por cada miRNA, por lo que evaluar sus perfiles de expresión se hace tan interesante a la hora de identificar cambios en la regulación de procesos biológicos.

En este orden de ideas, el enfoque experimental para este trabajo pretende evaluar si una medición, como es la vasodilatación mediada por flujo,

podría ser un indicador indirecto de posibles cambios en el nivel de expresión de genes involucrados en angiogénesis de placenta, y de esta manera, determinar si estos cambios se deben a alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs, específicamente aquellos asociados a angiogénesis, y/o a los niveles de metilación de las regiones promotoras de estos genes. Para alcanzar estos objetivos se propuso hacer un estudio en placentas extraídas en el momento del parto, de mujeres primigestantes que presentasen alteración en su capacidad vasodilatadora a lo largo de la gestación, e investigar la influencia de los mecanismos de regulación epigenética previamente descritos a través de técnicas sofisticadas de biología molecular, como son la secuenciación de alto rendimiento de ARN o RNA-seq (por sus siglas en inglés), para el análisis de la expresión diferencial en transcriptomas de placenta; adicionalmente, arreglos de PCR para evaluar porcentajes de metilación de regiones promotoras en genes de interés, al igual que para la expresión diferencial de miRNAs.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE:

3.1 Cambios en la hemodinámica durante el embarazo

El embarazo es un estado fisiológico, que en la madre, se caracteriza por grandes cambios hemodinámicos, tales como aumento de la frecuencia cardíaca en reposo, volumen sanguíneo circulante, y disminución de la resistencia vascular periférica [25]. Según Poston & Williams (2000): "Durante el embarazo, la circulación periférica de la madre exhibe una vasodilatación importante. El gasto cardíaco aumenta en un 50% respecto a la disminución en la resistencia vascular periférica. Combinados con un aumento en el volumen sanguíneo circulante, estos cambios están orientados a aumentar el flujo sanguíneo al feto. El aporte sanguíneo a varios órganos maternos también aumenta dramáticamente durante el embarazo. Por ejemplo, en riñón aumenta un 80%, en piel de manos y pies más del 200% y en arterias uterinas 1,000%" [26]. Además estos cambios son consistentes y reproducibles en todas las mujeres embarazadas [27] (figura 1).

Incremento en la vasodilatación periférica, reducción en la resistencia vascular y disminución de la presión arterial, son elementos claves para responder a los cambios vasculares, descritos anteriormente, en el embarazo. La evidencia reportada hasta la fecha, indica que para que estos cambios ocurran satisfactoriamente, debe haber un incremento de la función endotelial, principalmente, de su función vasodilatadora dependiente de NO [28,29]. Esta función está encargada de responder a nivel estructural, promoviendo un incremento en el diámetro de los vasos, mediante el aumento en la producción de moléculas vasodilatadoras frente a las vasoconstrictoras, un balance controlado principalmente por, el sistema renina-angiotensina, los metabolitos araquidónicos (tromboxano y prostaciclina), endotelina y sus receptores, así como el NO; ocurriendo

tanto a nivel sistémico como local (placenta) [30], siendo estimulado por el incremento en las demandas de flujo sanguíneo por parte de la placenta y el feto en formación.

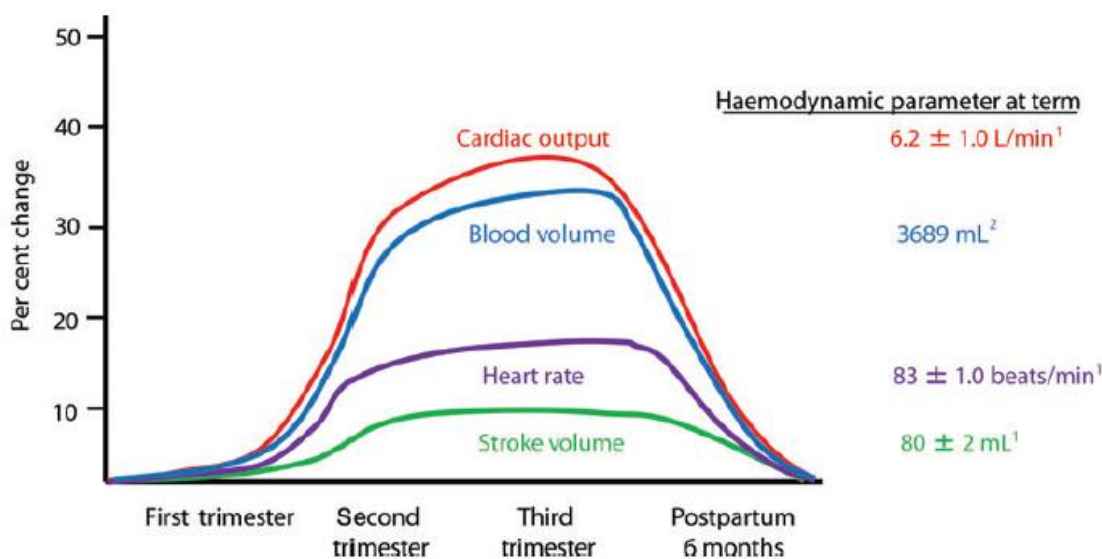


Figura 1. Cambios hemodinámicos durante el embarazo. Gasto cardíaco, frecuencia cardíaca, volumen sistólico y volumen sanguíneo, aumentan las 5 y 8 semanas de la gestación, con un pico en el segundo trimestre y se mantiene hasta el final del embarazo. Estos parámetros son reversados después de los 6 meses postparto [27].

Diferentes estudios han asociado un desbalance en la regulación de la resistencia vascular (disfunción endotelial) como una causa intrínseca de las enfermedades vasculares propias del embarazo [30-33]. Normalmente, al estimularse el endotelio se induce la producción y liberación de moléculas vaso-activas, sin embargo bajo condiciones patológicas como la hipertensión, la función endotelial sufre un desajuste y el endotelio presenta rápidos cambios estructurales y funcionales, que finalmente resultan en un desbalance en la vasodilatación, estrés oxidativo y un incremento en la adhesión de glóbulos rojos [34].

3.2 Placentación

La placenta es un órgano que se origina a partir de la capa externa de la mórula, llamada trofoblasto, el cual prolifera después de la implantación, invade la decidua y se diferencia entre citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, formando el villi primario. La placentación, formación, tipo o disposición placentaria, se caracteriza por una invasión trofoblástica y la modificación de vasos uterinos [35]. Las arterias del endometrio son invadidas por el trofoblasto, lo que conduce a cambios fisiológicos sustanciales para que haya un flujo sanguíneo apropiado a la placenta en desarrollo [36]; durante este proceso, se presenta un incremento en la función endotelial y una progresiva reducción en la resistencia de los vasos uterinos [35]. Esto puede entenderse en parte porque la regulación del tono vascular de la placenta depende de la liberación local de vasoconstrictores y vasodilatadores liberados por las células endoteliales (ECs, por sus siglas en inglés), en respuesta a estímulos mecánicos y químicos disparados por los requerimientos en el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo [37,38]. En la circulación placentaria y sistémica, el principal estímulo, además del control de la resistencia vascular y el flujo sanguíneo, está relacionado con el incremento en el estrés de fricción, debido a la alta perfusión placentaria a través del embarazo. La respuesta vascular de la circulación placentaria al estrés de fricción depende de varios factores que involucran al trofoblasto y la decidua materna: liberación local de moléculas vaso-activas, señalización endocrina, estrés oxidativo en el remodelamiento vascular, entre otros. El mantenimiento del tono vascular y el suministro sanguíneo a la circulación de la placenta es un factor clave para una adecuada placentación y el desarrollo fetal [39].

Modificaciones en el flujo sanguíneo inducen cambios en los patrones de crecimiento de los lechos vasculares en placenta, conduciendo a la disminución del diámetro de los capilares y de la angiogénesis en áreas en

las que el flujo sanguíneo es bajo [40]. Se sabe que en la circulación placentaria, la vía VEGF/angiogénesis es relevante en la vascularización temprana de la placenta y deficiencias en esta señal están relacionadas con patologías placentarias tales como RCIU y PE [41].

3.3 La angiogénesis en el desarrollo vascular de la placenta

Un embarazo saludable, precisa de la formación de una red vascular que establezca la conexión entre el sistema circulatorio de la madre y el feto. Esta conexión es llevada a cabo por la placenta, cuyo desarrollo vascular es liderado por los procesos de vasculogénesis, formación *de novo* de vasos sanguíneos a partir de precursores celulares, y angiogénesis, formación de vasos a partir de vasos pre-existentes, siendo este último esencial para el establecimiento y mantenimiento de la red vascular en la placenta.

La transición de vasculogénesis a angiogénesis, inicia al interior del villi, alrededor del día 32 después de la concepción [42]. Esta última se divide en dos tipos: el primero es un proceso ramificador, que básicamente significa la ramificación lateral de tubos pre-existentes, para la formación de una red capilar [43]. Durante este proceso, varios cambios ocurren, como por ejemplo, un incremento de la permeabilidad vascular, degradación de la membrana basal, aumento en la proliferación y migración de células endoteliales, formación de tubos celulares endoteliales y reclutamiento de pericitos al exterior del capilar para formar un vaso estable [44]. Después de la sexta semana de gestación, los capilares se arreglan en un patrón similar a una red. A partir de la semana 15 en adelante, el villi intermedio gradualmente se convierte en villi madre, similar a un núcleo fibroso formado por la fusión de grandes vasos. En este último, el diámetro de los vasos llega hasta los 100 μ m, y son rodeados por células de músculo liso

expresando actina α y γ , vimentina y desmina, y finalmente exhibiendo el espectro total de antígenos del citoesqueleto [45]. Después de la semana 24 de la gestación, toma lugar el segundo proceso, la angiogénesis no-ramificadora, la cual, involucra la formación del villi intermedio maduro, especializado en el intercambio gaseoso entre la circulación materna y fetal. Durante este proceso hay una disminución en la proliferación celular del trofoblasto y un incremento en la proliferación celular endotelial, cambiando los perfiles de expresión de los principales factores angiogénicos [46-48].

Para la placenta, la angiogénesis es un proceso indispensable, ya que repercute tanto a nivel estructural como funcional. A nivel estructural, porque el desarrollo vascular es necesario para un adecuado crecimiento de la placenta, y a nivel funcional, porque se requiere de una red vascular que permita el envío de nutrientes y gases de la madre al feto; por lo que, para la placenta, la angiogénesis se considera el componente principal del incremento del flujo sanguíneo durante la gestación [49-54].

La placenta humana es una rica fuente de sustancias angiogénicas y estas juegan un papel importante en la regulación de la formación de la vascularización placentaria, así como también, en la adaptación vascular materna al embarazo [55-57]. Un amplio espectro de factores con un papel importante en la angiogénesis ha sido identificado, y es precisamente, este cambio en el equilibrio local entre factores angiogénicos y sus inhibidores, lo que regula el proceso. Dentro de sus principales reguladores se encuentran, las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang 1 y 2), los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF -A, -B, -C y -D), y los factores de crecimiento de fibroblasto alfa y beta (aFGF, bFGF). Otros factores de reconocida importancia son, el factor de crecimiento de placenta (PGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), isoleucina-8 (IL-8), los factores de crecimiento similar a la insulina 1 y 2 (IGF-1 y -2), los factores

La familia más estudiada ha sido la VEGF, incluido PGF [58-61] (figura 2). Estos factores de crecimiento son conocidos por inducir la transducción de señales mediante la unión a sus receptores transmembranales específicos, dentro de los que se encuentran VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR), y VEGFR-3 (flt-4) [59-62]. VEGF-A se une tanto a VEGFR-1 y VEGFR-2, mientras que PlGF solo se une al receptor VEGFR-1 [63]. La familia de proteínas VEGF también se une a los receptores neuropilin 1 y 2 (NP-1 y NP-2), cuya principal función es promover la movilidad celular y la migración quimiotáctica [64].

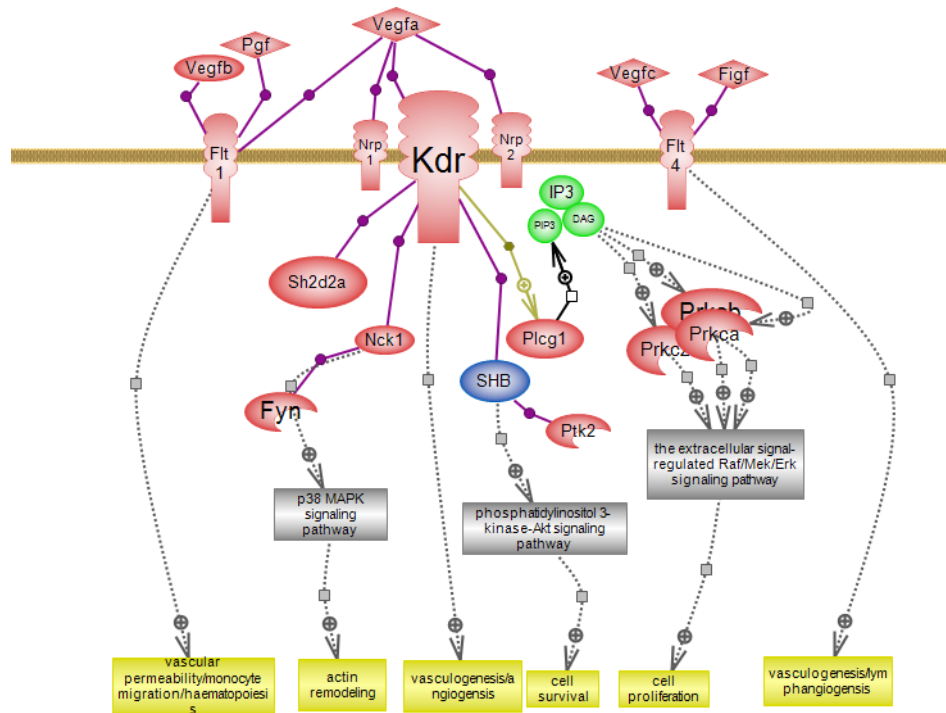


Figura 2. Vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular. Tomada de: http://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc_id=PW:0000243

Diferentes estudios han mostrado una asociación entre alteraciones en los niveles de expresión de los factores de crecimiento con características angiogénicas, y la presencia de patologías vasculares propias del embarazo; algunos de ellos, son los reportados por Sharkey y colaboradores (1996), donde encontraron niveles de VEGF incrementados en el plasma de mujeres con PE y especularon que VEGF podría estar involucrado en la disfunción endotelial materna que está asociada con esta condición [65]. Otros estudios reportaron resultados contradictorios, ya que encontraron una disminución significativa en los niveles proteicos de VEGF y PIGF en suero de mujeres PE [66,67]. Por otra parte, un estudio encontró un incremento significativo en la expresión del receptor Tie (receptor de las angiopoyetinas) en mujeres sanas comparado con mujeres PE a término [68].

Cabe resaltar que los patrones de angiogénesis placentaria coinciden con el gran incremento del flujo sanguíneo reportado en la circulación uterina y umbilical [49,69,70]. Para que este incremento en el flujo sanguíneo ocurra, debe estar sustentado por una respuesta vasodilatadora previa por parte del endotelio.

3.4 La vasodilatación mediada por flujo, una medición no invasiva de función endotelial.

El endotelio vascular normalmente, es capaz de soportar la función cardiovascular y el aumento en sus demandas, como es en el caso del embarazo, debido principalmente al incremento y promoción de su función vasodilatadora, entre otras funciones. Cuando esto no ocurre, se habla de disfunción endotelial, que como se ha mencionado anteriormente, favorece la agregación plaquetaria y disminuye la biodisponibilidad de las principales moléculas vasodilatadoras del endotelio, como es el caso del NO. Problemas en la vasodilatación dependiente del endotelio ha sido propuesto

como un factor de riesgo para enfermedades coronarias [71,72], así como para el desarrollo de complicaciones vasculares en el embarazo [9,73].

La función endotelial puede ser evaluada por medio de diferentes enfoques, entre ellos están mediciones con características mecánicas y morfológicas, determinación de marcadores endoteliales solubles, y medición de la regulación dependiente del endotelio del tono vascular en sitios precisos de la circulación [74]. Esta última, debido a su naturaleza no-invasiva, ha sido ampliamente utilizada, especialmente en grupos de individuos donde metodologías invasivas no son muy viables para su condición, como es el caso de las mujeres embarazadas. Una de las mediciones que cumple con los requisitos de este enfoque es la vasodilatación mediada por flujo (VMF).

La VMF es un método que fue introducido por Celermajer y colaboradores en 1992, el cual consiste en la medición, por medio de ultrasonido, de la modificación porcentual del diámetro de la arteria braquial mediante hiperemia reactiva, observada por medio de transductores de alta resolución generalmente a partir de 7 MHz (25). Y su medición sigue los siguientes pasos: en primer lugar, los procedimientos con el ultrasonido se realizan con el sujeto en reposo en posición supina por al menos 10 minutos, y segundo, todas las mediciones se toman al final de la diástole, observada por electrocardiograma. Lo primero que se hace es ubicar la arteria braquial derecha en una sección transversal para ser escaneada sobre una sección longitudinal de 5 a 10 cm proximales al codo derecho. El diámetro de la arteria braquial es medido desde la interfase anterior a la posterior de la íntima media a una distancia fija. Cuatro ciclos cardíacos son analizados en cada medición, para así calcular un promedio. Posteriormente, un torniquete neumático puesto alrededor del antebrazo derecho es inflado hasta por lo menos 50 mm Hg por encima de la presión sanguínea sistólica por 5 minutos. Una liberación repentina induce un incremento en el flujo sanguíneo en la arteria braquial localizada cerca al torniquete. Durante la hiperemia reactiva, habrá un incremento en el estrés

de fricción, causando vasodilatación dependiente del endotelio, principalmente debido a la liberación de óxido nítrico [75]. Esta dilatación secundaria intensifica y prolonga la fase de hiperemia reactiva. La VMF de la arteria braquial es medida a los 45-60 segundos después de la liberación de la presión. El cambio en el diámetro causado por el incremento en el flujo es calculado como el porcentaje de cambio relativo a la medición de la línea de base (%VMF). La respuesta dilatadora de la arteria braquial debido a estrés de fricción ha mostrado tener una buena confiabilidad y reproducibilidad [76,77]. Por último, las imágenes son grabadas para las subsecuentes mediciones por parte de dos observadores, finalmente ambas mediciones se promedian.

Un estudio de seguimiento en mujeres embarazadas sanas reportado por Ramírez *et al.*, 2011, fue uno de los primeros estudios con los que el grupo de Nutrición de la Universidad del Valle evidenció su interés por evaluar variables como la VMF [78].

A partir del protocolo anteriormente descrito para la medición de la VMF, se encontraron resultados que indicaban que esta variable podría ser un buen indicador de la función endotelial materna. Esto se evidenció en un estudio publicado por Echeverri *et al.*, 2015, que encontró, en un grupo de primigestantes, disminución significativa en la VMF del tercer trimestre comparada con el segundo trimestre del embarazo, además de una correlación positiva entre la VMF materna del segundo trimestre con los valores de malonaldehído (MDA) (un indicador de estrés oxidativo) de los recién nacidos; y una correlación positiva y significativa, de la Δ VMF, entre el segundo y el tercer trimestre, con los niveles de óxido nítrico (NO) de los recién nacidos [79]. A parte de los resultados obtenidos en este estudio, cabe resaltar que los autores no solo utilizaron las mediciones de la VMF, sino también la Δ VMF, lo que estaría aportando mayor información acerca de la respuesta del endotelio en el transcurso del embarazo. Nótese que ellos encuentran una disminución significativa en la VMF del tercer

trimestre, respecto al segundo trimestre, pero cuando evalúan la magnitud de cambio, no se encuentran diferencias significativas.

De igual manera, varios estudios han mostrado una asociación entre cambios negativos en la VMF con problemas o patologías vasculares propias del embarazo, como es el caso de la PE [20,80-82].

4. OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la magnitud de cambio de la VMF, entre el tercer y segundo trimestre del embarazo, puede ser un indicador indirecto de los procesos regulatorios en la angiogénesis de la placenta.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar el transcriptoma de placentas de mujeres que presentaron un Δ VMF negativo vs. positivo.
2. Relacionar el porcentaje de metilación en regiones promotoras de genes asociados a angiogénesis con su expresión en muestras de placenta de mujeres que presentaron Δ VMF negativo vs. positivo.
3. Relacionar los perfiles de expresión de los miRNAs con cambios en la expresión de genes asociados a angiogénesis en muestras de placenta de mujeres que presentaron Δ VMF negativo vs. positivo.
4. Relacionar la expresión de los angiomiRs-92a y -132 con la expresión de la proteína IGFBP1 en muestras de placenta de mujeres que presentaron un Δ VMF negativo.

5. HIPÓTESIS

H₀: No existen diferencias significativas en la expresión de genes involucrados en la vía angiogénica entre el grupo Δ VMF positivo vs. el grupo Δ VMF negativo.

H₀: No hay alteración de mecanismos regulatorios epigenéticos en placenta de mujeres con Δ VMF negativo.

CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE MUESTRAS DE PLACENTA PERTENECIENTES A MUJERES CON Δ VMF POSITIVO VS. NEGATIVO.

1.1 INTRODUCCIÓN

El concepto de transcriptoma representa el grupo total de transcriptos en una célula, donde su cuantificación dependerá del estadio del desarrollo, la condición fisiológica o el tejido u órgano del cual provengan; para ello, varias tecnologías han sido desarrolladas. Actualmente, los nuevos métodos de secuenciación de ADN de alto rendimiento, han permitido el desarrollo de una técnica con la cual se puede, al mismo tiempo, mapear y cuantificar los transcriptomas. Esta técnica se conoce como RNA-seq (secuenciación de ARN), dentro de sus ventajas están: primera, que la detección de transcriptos no está limitada a una secuencia genómica pre-existente, lo que la hace atractiva a la hora de determinar variantes de secuencias genómicas aún no determinadas [83]. Segunda, puede revelar la localización precisa de límites de transcripción, con una resolución de una sola base. Tercera, se puede obtener información acerca de la conectividad entre múltiples exones. Cuarta, la casi inexistente señal de fondo, ya que las secuencias de ADN pueden ser mapeadas sin ambigüedad a regiones únicas del genoma. Quinta, no tiene un límite superior de cuantificación, el cual se correlaciona con el número de secuencias obtenidas, por lo que tiene un amplio rango dinámico de los niveles de expresión sobre el cual los transcriptos pueden ser detectados. Sexta, altamente adecuado para cuantificar niveles de expresión [84,85]. Séptima, los resultados muestran altos niveles de reproducibilidad, para replicados técnicos y biológicos [83,84]. Y octava, requiere de menos cantidad de muestra de ARN, ya que no utiliza pasos de clonación en su metodología.

Lo anterior muestra la utilidad de RNA-seq para el estudio de transcriptomas complejos. Sin embargo, dentro de los retos para su uso, resaltan la preparación de las bibliotecas y las habilidades bioinformáticas para el procesamiento de la información.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Población y Muestra

En este estudio se utilizó un banco de muestras de placenta, provenientes de mujeres primigestantes que participaron en el estudio financiado por Colciencias/Universidad del Valle/FES (Cód. 11064592), "Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con micronutrientes sobre factores maternos y placentarios asociados a la programación fetal de enfermedades crónicas no transmisibles". En dicho proyecto las gestantes fueron captadas entre las semanas 16 y 20 de gestación, con un rango de edad oscilando entre los 19 a no mayores de 30 años.

Como criterios de inclusión, estas mujeres debían estar afiliadas al sistema de salud pública y ser atendidas en la Empresa Social del Estado ubicada en la zona de ladera de la ciudad de Santiago de Cali – Valle del Cauca, Colombia (E.S.E. ladera) (figura 3). Respecto a los criterios de exclusión, se siguió el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2003 [165]. Todas las participantes firmaron un consentimiento en el cual autorizaban, para fines investigativos, el uso de un banco de muestras, así como de la información suministrada durante el seguimiento del embarazo. Este consentimiento fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad del Valle (Acta N° 017-08).

Las muestras de placenta se preservaron a -70°C, y la identidad de las mujeres estuvo protegida mediante un sistema de codificación, así como la información recopilada hasta el momento del parto.



C

Figura 3. Distribución geográfica de las empresas sociales del estado (E.S.E.) en la ciudad de Santiago de Cali. Las primigestantes participantes del estudio de las cuales se obtuvieron las muestras de placenta, provenían de la ESE ladera (amarillo), ubicada en el sur-occidente de la ciudad de Santiago de Cali (figura tomada de internet: <http://calisaludable.cali.gov.co/redServicios/inicio.php>)

1.2.2 Selección de muestras.

A partir del grupo control del estudio anteriormente mencionado, se analizaron 191 datos correspondientes a la variable ΔVMF , identificándose un patrón de distribución de valores extremos, que al evaluar su significancia mediante una prueba t-student, se encontró un p-valor=0,04. Con base en ello, se seleccionaron las muestras que estaban en los extremos de esta distribución y que contaban con muestra de placenta. Adicionalmente, dichas muestras no debían haber presentado ninguna complicación durante el embarazo, haber dado a luz a término y su neonato no haber presentado ninguna complicación antes y durante el parto. Teniendo en cuenta estos criterios, se seleccionaron 11 muestras, de las cuales seis provenían del grupo con ΔVMF positivo, y cinco del grupo con

Δ VMF negativo, la variable edad no mostró diferencias significativas entre los grupos (p -valor = 0.537), mediante la prueba U-Mann - Withney.

1.2.3 Extracción y cuantificación de ARN a partir de tejido de placenta

A partir de 4 muestras de la cara materna de la placenta (cada grupo con dos muestras de 21 y 27 años), congeladas a -70°C , se tomaron 30 mg para extraer ARN total, utilizando el miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Mediante el uso de un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), se realizó el análisis espectrofotométrico de la cuantificación y evaluación de la pureza de los ácidos nucleicos, a partir de 1ul de muestra.

Adicionalmente, se realizaron electroforesis con geles de agarosa al 1,2%, usando formamida y aplicando calor para desnaturalizar las muestras de ARN, siguiendo el protocolo de Masek *et.al.*, 2005 [86], y así determinar la calidad del ARN extraído, de acuerdo a la presencia de las bandas para ARN ribosomal, 28s y 18s, con un peso aproximado de 5 kb y 2 kb, respectivamente. Y con una razón 28s:18S de 2:1, lo que garantiza una integridad total del ARN.

1.2.4 Análisis transcripcional

Se tomaron las dos muestras de ARN total para el grupo Δ VMF positivo y las otras dos muestras procedentes del grupo Δ VMF negativo, y se procedió a utilizar la técnica RNA-seq [87], una tecnología de secuenciación de última generación, que permite obtener una aproximación del perfil transcriptómico más preciso e informativo que mediante el uso de microarreglos (figura 4). Por ello, se utilizó la plataforma de secuenciación de Illumina (Hiseq) [88], cuyo protocolo involucra los siguientes pasos:

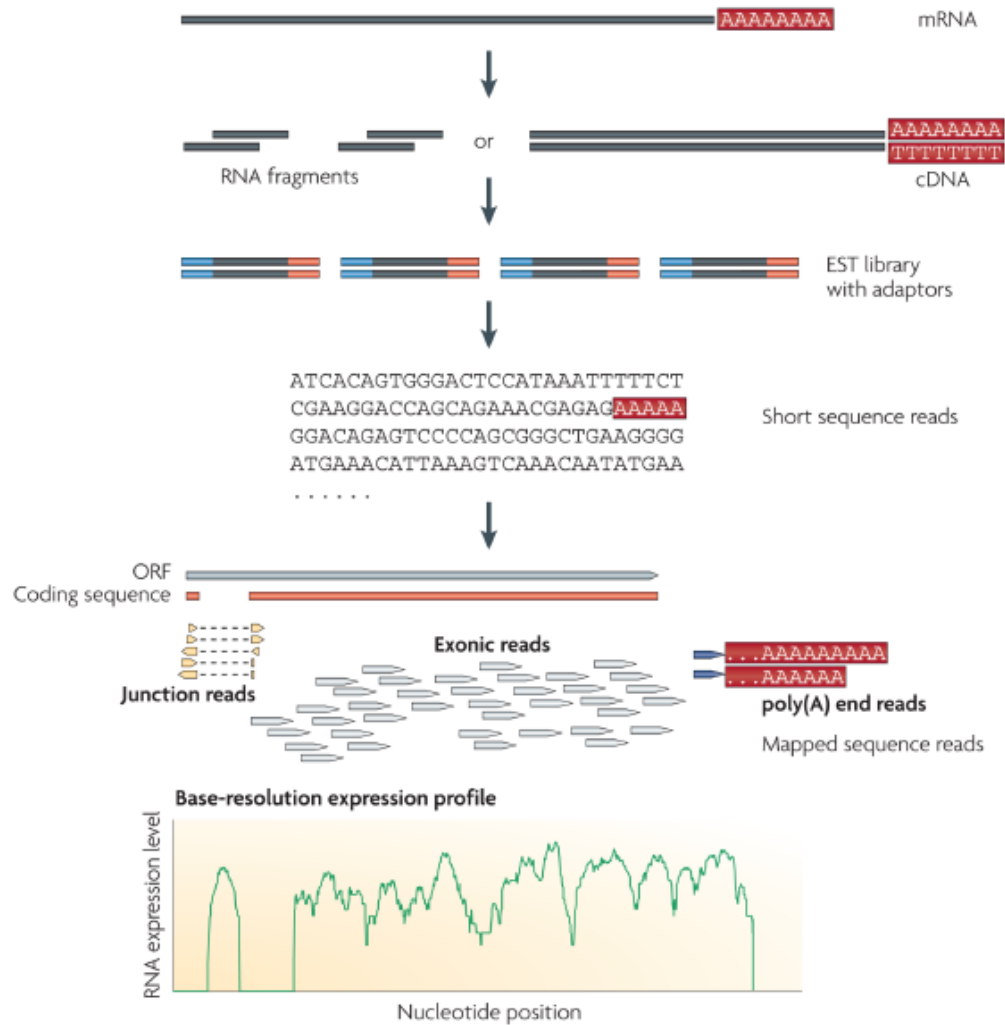


Figura 4. Típico experimento de RNA-seq. RNAs largos son convertidos a una biblioteca de fragmentos de cDNA mediante la fragmentación ya sea de RNA o cDNA. Los adaptadores de secuenciación (en azul) son subsecuentemente adicionados a cada fragmento de cDNA y se obtiene una secuencia corta de cada cDNA usando la tecnología de secuenciación de alta densidad. Las lecturas de secuenciación resultantes (reads) con el genoma o transcriptoma de referencia, son clasificadas en tres tipos: lecturas exónicas (exonic reads), lecturas de unión (junction reads) y extremos de lectura poly(A) (poly(A) end-reads). Estos tres tipos de lecturas son usadas para generar un perfil de expresión con una resolución por base para cada gen, como se ilustra en la parte inferior; este ejemplo muestra un marco de lectura abierta (ORF) de levadura con un intrón [87].

1.2.4.1 Enriquecimiento de un subgrupo de ARNs a partir de ARN total:

Para asegurar una fuerte señal de las poblaciones de ARN de interés, se procedió a su enriquecimiento, mediante el protocolo RNA capture seq [89], que consistió en el diseño de sondas para la captura de toda la población de ARNm, con la eliminación de las secuencias de ARNr (ARN ribosomal), siendo esta última la población de ARN más abundante, y que para fines prácticos no se consideraba analizar. De esta manera se elimina ruido para la secuenciación y posterior análisis bioinformático.

1.2.4.2 Fragmentación del ARN total:

EL tamaño de los fragmentos deseados fue 100pb; para su selección, se realizó una fragmentación por hidrólisis de las moléculas de ARN generando fragmentos de este tamaño.

1.2.4.3 Conversión a ADN copia (ADNc):

Se utilizaron cebadores de secuencias cortas (oligos deoxi-timina o dT) para hibridar las secuencias de ARN. Una vez la transcripción reversa se completó, el ARN molde es removido, ya que el ADNc de una sola cadena presenta una horquilla en el extremo 3' que sirve como cebador para sintetizar la cadena complementaria.

1.2.4.4 Ligación con adaptadores y amplificación por PCR:

Las cadenas son tratadas para generar extremos cohesivos y los adaptadores son ligados en ambos extremos. El siguiente paso es la amplificación de todas las moléculas por PCR.

1.2.4.5 Selección del tamaño:

Este paso asegura que el tamaño de los fragmentos sea el esperado, para lo cual, se realizó una electroforesis en la cual el rango de tamaño deseado es purificado a partir de un gel de extracción.

1.2.4.6 Secuenciación:

Los fragmentos se secuenciaron a partir de sus dos extremos (Paired-End sequencing ó PE). Las moléculas son desnaturalizadas y luego pasan a través de un flujo celular con secuencias de oligos complementarios a los adaptadores inmovilizados en su superficie. Los fragmentos se unen a estos oligos y cada uno es amplificado en puente, en ese espacio, para crear un grupo de moléculas idénticas que sirven como moldes para la formación de cadenas complementarias. Los cebadores de secuenciación se adicionan a cada molécula, y los millones de moléculas en los grupos o clúster comienzan la complementación reversa de forma simultánea. En cada paso de secuenciación, los nucleótidos de terminación reversa marcados fluorescentemente compiten por unirse a las cadenas molde, y solo un nucleótido es adicionado en cada una de las cadenas complementarias en crecimiento. Cada nuevo nucleótido está marcado con un colorante y el láser es usado para identificar dónde y qué nucleótido fue incorporado en cada clúster. La fluorescencia cae y los grupos terminales son removidos de los nuevos nucleótidos y el proceso se repite el número de veces que se desea.

Al final se obtuvo una secuencia de imágenes, una por cada paso de secuenciación, donde cada punto iluminado corresponde a un clúster y el color de cada clúster representa un tipo de base diferente. La herramienta de análisis se basa en el llamado de bases (Base callers) [90]. Al final los archivos de secuenciación que se obtuvieron estaban en formato FASTQ, que incluye para cada clúster o lectura

(read): un id único, la secuencia de nucleótidos y el Phred quality score por base, este último está definido como $Q = -10\log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad de que el llamado de base sea incorrecto [90]. Como el formato secuenciación usado fue Paired-End, las reads son divididas en dos archivos ordenados, una con el primer extremo y la otra con el segundo.

1.2.4.7 Inspección de la calidad de las secuencias:

Utilizando el programa FASTQC, desarrollado por Babraham Bioinformatics Institute, como una herramienta de acceso abierto para inspeccionar la calidad de las reads (figura 5), fue posible visualizar la calidad por base, por secuencia, el contenido de bases, de GC y de bases N, la distribución de la longitud de las secuencias, los niveles de duplicación, las secuencias sobreexpresadas y el contenido de Kmer.

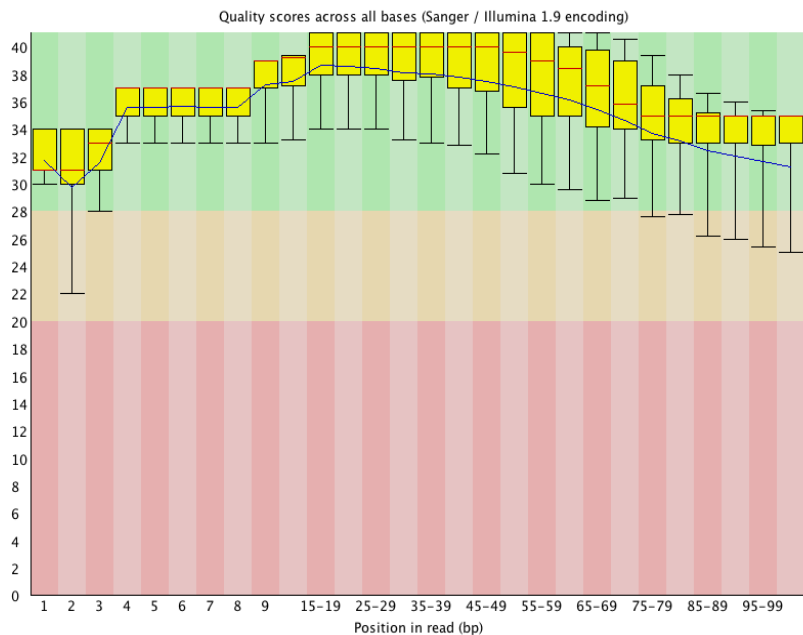


Figura 5. Distribución de las secuencias. El eje y representa el Phred Score, donde a mayor Phred score (zona verde) significa una óptima calidad de las secuencias; la zona abana indica una calidad media, y la roja una muy baja calidad. El eje x muestra la posición en la read por pares de bases.

Una vez se confirmó que el análisis de la calidad de las secuencias obtenidas es satisfactorio, se procedió a realizar su alineamiento.

1.2.4.8 Alineamiento y mapeo de las secuencias usando Bowtie2:

Bowtie2 es una herramienta ultra rápida y eficiente para alinear reads a grandes secuencias de referencia de libre acceso; para ello, utiliza el formato SAM, siendo compatible con un gran número de herramientas. La sintaxis utilizada para el uso del programa fue la siguiente:

```
bowtie2 -x hg19 -1 sample_R1.fastq -2 sample_R2.fastq -S output.sam
```

donde: '-x hg19', hace referencia a la carpeta que contiene los archivos indexados de la versión 37 del genoma de referencia, para que el programa la reconozca; '-1' para indicar que el archivo que se está ingresando es el del primer extremo y, '-2' para indicar que es el segundo extremo; '-S' para el nombre del archivo de salida que debe ser en formato '.SAM', es decir, el producto del alineamiento y mapeo al genoma de referencia.

1.2.4.9 Cuantificación de transcritos usando GFOLD:

Debido al número limitado de muestras por grupo y a la ausencia de réplicas, se procedió a utilizar una herramienta diseñada para este tipo de casos, GFOLD score. Su aproximación matemática se basa en las veces de cambio del $\log_2$ ($\log_2$ fold-change) teniendo en cuenta la distribución posterior del mismo, es decir, es la medida intermedia entre el p-valor, que es lo más usado en la mayoría de herramientas de cuantificación, pero que en los casos de tamaño de muestra pequeño va a tender a negar las posibles diferencias entre los grupos, ya que su poder de discriminación, que es la varianza, recae sobre el promedio de las muestras, por lo que a menor número

de muestras mayor es la posibilidad de negar cualquier tipo de variación significativa; y el log2 fold-change, que tiende a exaltar y aceptar cualquier gran cambio sin tener en cuenta la varianza [91] (figura 6).

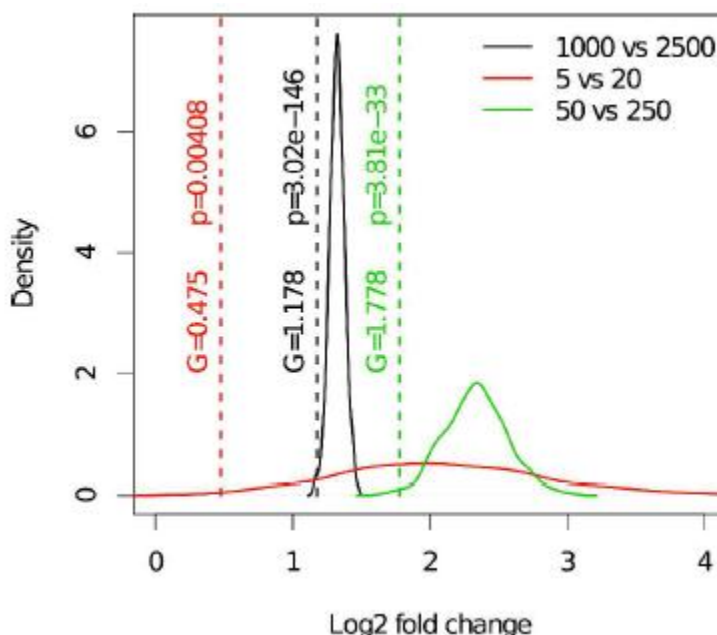


Figura 6. Ejemplo de rankings de genes por GFOLD, fold change y p-valor. La figura ilustra el principio de GFOLD, comparando el ordenamiento de los genes definidos por GFOLD (0.01), fold change y p-valor en tres genes de ejemplo. El conteo de reads de los genes negros, rojos y verdes son (1000, 2500), (5, 20), y (50, 250), bajo dos condiciones biológicas con el mismo tipo de secuenciación, respectivamente. Las tres curvas son las correspondientes distribuciones posteriores del log fold change. G = valor de GFOLD y p = p-valor calculado usando el test de poisson [91].

Los comandos utilizados para correr este programa fueron los siguientes:

```
samtools view sample1.bam | ./gfold count -ann ensGene.gtf -tag stdin -o sample1.read_cnt && samtools view sample2.bam | ./gfold count -ann ensGene.gtf -tag stdin -o sample2.read_cnt && samtools view sample3.bam | ./gfold count -ann ensGene.gtf -tag stdin -o sample3.read_cnt && samtools view sample4.bam | ./gfold count -
```

```
ann ensGene.gtf -tag stdin -o sample4.read_cnt && ./gfold diff -s1
sample1,sample2 -s2 sample3,sample4 -suf.read_cnt -o gfold.diff
```

Donde: 'samtools view', es una herramienta del paquete de samtools del cual el programa hace uso para visualizar los archivos que están en formato .sam o .bam. La información es especificada muestra por muestra con base en el archivo del ensemble gene (ensGene.gtf), por lo que 'count -ann' especifica q ese es el ensemble gene y el conteo que se va a realizar. Mientras que '-tag stdin' especifica la muestra. Por otra parte, 'gfold diff' va a cuantificar las diferencias entre los grupos. '-s1' agrupa las muestras del primer grupo y '-s2' las del grupo dos. '-suf.read_cnt' le dice cuál es el sufijo que se está utilizando para el conteo y '-o' es para nombrar el archivo de salida que en este caso fue 'gfold.diff'.

1.2.4.10 Visualización de los resultados:

Usando el paquete gráfico GgPlot por medio del lenguaje de programación R, se procedió a visualizar la distribución de los resultados.

1.2.4.11 Análisis de enriquecimiento a partir de sets de genes:

La herramienta Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), fue usada para identificar las vías de señalización comprometidas, según la lista de genes diferencialmente expresados (GFOLD score diferente de cero) [92], un método cuyo poder se basa en el enfoque de grupos de genes, es decir, grupos que comparten una función biológica, una localización cromosomal o regulación en común. Hay tres elementos claves en los que se basa este método:

1- Cálculo de un Score de enriquecimiento (pequeña explicación entre paréntesis): este score o enrichment score (ES) refleja el grado en el que un grupo de genes de interés (S) está sobrerrepresentado en los extremos (superior o inferior) de una lista

de genes (L) completa y ordenada. El score es calculado por el barrido de la lista (L), donde la estadística de la sumatoria se incrementa cuando un gen en el set S es encontrado, y disminuye cuando este no se encuentra. La magnitud del incremento depende de la correlación del gen con el fenotipo. El ES es la desviación máxima partiendo de cero, encontrada en un recorrido aleatorio, esto corresponde al ponderado estadístico similar a Kolmogorov–Smirnov.

2- Estimación del nivel de significancia de ES: Por medio del test de permutación basada en el fenotipo empírico, el cual conserva la estructura de correlación compleja de los datos de expresión génica. Específicamente, se permutan las etiquetas del fenotipo y son computados los ES del set de genes para los datos permutados, generando una distribución nula para el ES. El p-valor empírico – nominal del ES observado, es calculado según esta distribución nula. Lo importante, es que la permutación de las etiquetas de clase conserva las correlaciones gen-gen y, por lo tanto, proporciona una evaluación biológica más adecuada de la significancia, que la que se obtendría por la permutación de genes.

3- Ajuste para la comprobación de hipótesis nula: Se normaliza el ES para cada set de genes teniendo en cuenta el tamaño del set, generando un score de enriquecimiento normalizado (NES). Lo siguiente es el control de los falsos positivos, calculando la FDR (tasa de falsos positivos) correspondiente a cada NES. La FDR es la probabilidad estimada que un set con un NES dado presente un falso positivo, esta es computada mediante la comparación de las colas de las distribuciones observadas y nulas para el NES.

Con base en este análisis, se determinaron las vías biológicas de mayor relevancia, así como los genes de interés que presentaron una correlación significativa para pertenecer a estas vías.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Mapeamiento y cuantificación de las secuencias obtenidas por RNA-seq.

El análisis transcripcional mediante la técnica RNA-seq generó por cada muestra dos lecturas apareadas (pair-end reads) con una longitud por lectura (read) de 100 pb, obteniéndose entre 15-26 millones de reads por muestra en cada par de lecturas. Al mapearse las secuencias de cada muestra respecto a la secuencia del genoma humano (hg19 Versión 37), se obtuvo una alta tasa de reads mapeadas, la cual estuvo entre el 69-79% (tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de reads mapeadas respecto al genoma de referencia (hg19)

Reads mapeadas	ΔVMF positivo	ΔVMF positivo	ΔVMF negativo	ΔVMF negativo
Promedio	79.12%	69.83%	79.41%	69.90%
Izquierda	80.14	70.99%	70.99%	73.21%
Derecha	78.11%	68.66%	80.30%	66.59%

A partir de las secuencias mapeadas se cuantificaron los transcriptos, tomando al grupo Δ VMF positivo como control, se identificaron 1,612 transcriptos diferencialmente expresados en el grupo Δ VMF negativo, de los cuales 356 presentaron una baja expresión y 1256 se encontraban sobre-expresados (figura 7).

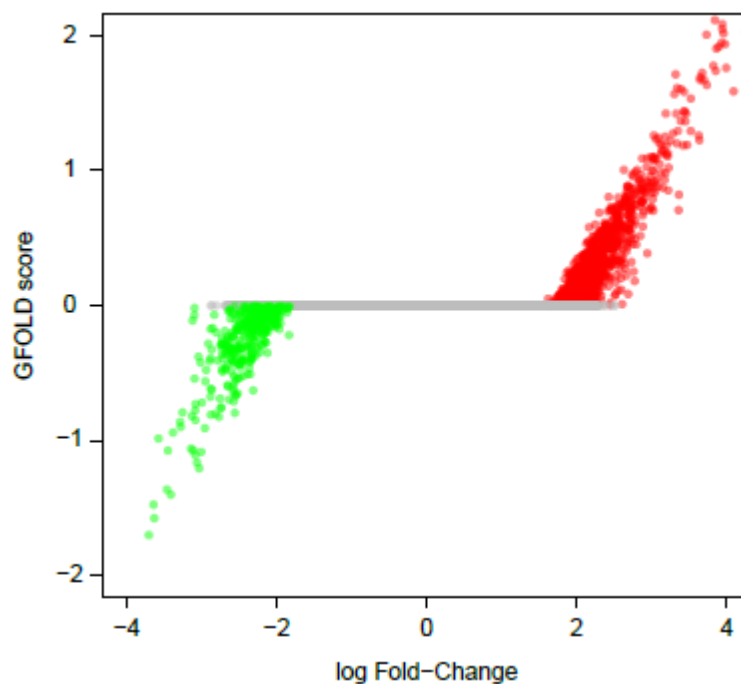


Figura 7. Cuantificación por medio del GFOLD Score para la identificación y cuantificación diferencial de transcritos en el grupo Δ VMF negativo respecto al positivo. Distribución de los genes expresados de forma diferencial. En el extremo superior derecho (rojo) se presentan los transcritos sobre-expresados y en el extremo inferior izquierdo (verde) los que presentaron una baja expresión en el grupo con Δ VMF negativo respecto al positivo.

1.3.1.2 Análisis de genes diferencialmente expresados, involucrados en vías angiogénicas

A partir de los transcritos diferencialmente expresados, se evaluaron los dos listados correspondientes a aquellos con baja y alta expresión. Para lo cual, se utilizó la opción de investigar grupos de genes por medio de la herramienta GSEA, teniendo en cuenta las siguientes bibliotecas: CP: vías canónicas, con 1330 sets de genes; CP:Biocarta, grupos de genes BioCarta con 217 sets de genes; y CP:KEGG, grupos de genes en la enciclopedia de Kioto de Genes y genomas con 186 sets de genes. Mostrando el top 50 de los sets de genes organizados por significancia con un FDR q-valor < 0.05.

De este resultado, se identificaron cuatro vías de señalización involucradas en angiogénesis (tabla 2).

Tabla 2. Vías de señalización angiogénicas según los genes diferencialmente expresados en el grupo Δ VMF negativo.

Nombre del set de genes [# genes (K)]	Descripción	# de genes sobre-expresados	P-valor	FDR q-valor
KEGG vías de señalización en cáncer [328]	Vías de señalización en Cáncer	13	2.37×10^{-6}	1.36×10^{-4}
PID vía de señalización VEGFR1 [26]	VEGFR1 señales específicas	4	4.83×10^{-5}	1.56×10^{-3}
BIOCARTA P53 vía de hipoxia [23]	Hipoxia y P53 en el sistema cardiovascular	4	2.91×10^{-5}	1.07×10^{-3}
Nombre del set de genes [# genes (K)]	Descripción	# de genes con baja expresión	P-valor	FDR q-valor
PID vía del factor de transcripción HIF-1 [66]	Red del factor de transcripción HIF-1 alfa	4	1.51×10^{-4}	1.53×10^{-2}

De los genes identificados en las vías promotoras de la angiogénesis fueron seleccionados 4 de ellos. El criterio de selección usado fue, estar directamente involucrados con los más reconocidos e importantes factores de crecimiento, promotores de angiogénesis, o ser uno de estos factores (tabla 3). De estos transcritos, se resaltan los genes IGFBP1 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 1), LEP (leptina), y PGF (factor de crecimiento placentario), por presentar transcritos codificantes para proteína.

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en el grupo Δ VMF negativo respecto al grupo positivo

Gen	Transcripto	GFOLD	log2fc	Estatus	Evaluación
IGFBP1	ENST00000457280	-1.109	-3.085	Baja expresión	Codificante
IGFBP1	ENST00000275525	-1.164	-3.060	Baja expresión	Codificante
IGFBP1	ENST00000468955	-1.074	-3.111	Baja expresión	Codificante
LEP	ENST00000308868	-0,079	-2,110	Baja expresión	Codificante
PGF	ENST00000553716	0.181	1.931	Sobreexpresión	Codificante
NRP2	ENST00000468256	0.078	2.042	Sobreexpresión	No codificante

1.4 DISCUSIÓN

1.4.1 La magnitud de cambio de la VMF (Δ VMF) en el embarazo

Dentro de los grandes cambios hemodinámicos en el embarazo se encuentra la vasodilatación periférica y la disminución en la resistencia vascular. Aunque no son completamente claros los mecanismos que conducen a estos cambios, existe evidencia que señala a la función endotelial y a la actividad del óxido nítrico como factores que contribuyen a ellos [28,29]. Problemas en la función endotelial (disfunción endotelial), han demostrado estar asociados a complicaciones con compromiso vascular durante el embarazo [93].

Una consecuencia funcional de la disfunción endotelial es la incapacidad para liberar óxido nítrico [94]. Varios métodos, la mayoría de ellos, experimentos *in vitro* aislando células endoteliales o vasos de tejido materno o fetal, han sido usados para estudiar la función endotelial [28]. Por más de dos décadas, mediante el uso de sustancias vasoactivas como la acetilcolina y la nitroglicerina, se ha caracterizado la función endotelial motora [95,96]. Sin embargo, en mujeres embarazadas estos métodos no son adecuados debido a su naturaleza invasiva. Es por ello, que la VMF, un indicador no invasivo de la función endotelial, específicamente para problemas en la regulación del tono vascular, es uno de los métodos más usados para evaluar esta función durante el embarazo. Niveles negativos o muy bajos en esta medición podrían predecir resultados vasculares adversos [20,82,97]. En un embarazo saludable, normalmente se produce un incremento en la VMF, debido al aumento en el flujo sanguíneo de la madre

al feto, por lo que se espera que la VMF incremente a lo largo de la gestación [28,98].

Es importante destacar, que la mayoría de estos estudios que han evaluado la VMF en los tres trimestres del embarazo, lo han hecho con diferentes grupos de mujeres que en un momento determinado se encontraban en uno de los trimestres, sin hacer el seguimiento de la medición al mismo grupo de mujeres. Sin embargo, en este estudio, los datos de VMF analizados provenían de un estudio longitudinal, lo que permitió contar con las mediciones de los dos últimos trimestres pertenecientes al mismo grupo de mujeres.

Teniendo en cuenta que en el embarazo la fisiología vascular cambia conforme este avanza, se decidió trabajar con el valor de cambio de la VMF (Δ VMF) entre el segundo y tercer trimestre. Considerando que las mediciones únicas pueden ser poco informativas, porque no muestran como el endotelio ha respondido a los eventos fisiológicos y moleculares que se presentan durante la gestación. Con base en lo anterior, se espera que la diferencia o cambio sea positivo o por lo menos nulo, entre el segundo y tercer trimestre [99]. Sin embargo, al analizar los dos grupos con Δ VMF positivo y negativo, se encontró que ninguna de estas mujeres desarrolló alguna complicación durante el embarazo.

Pese a que el grupo Δ VMF negativo presentó un embarazo a término y sin complicaciones, este mostró cambios a nivel de la expresión génica en vías de señalización que involucran a la angiogénesis.

1.4.2 Variaciones negativas en el Δ VMF evidencian cambios en la expresión génica de placenta comprometiendo vías de señalización angiogénica

El endotelio produce moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras, las cuales regulan el tono vascular, que a su vez presentan propiedades pro y anti-angiogénicas. Entre ellas, se encuentran vasoconstrictores con actividad anti-angiogénica como son Ang2, endotelina-1 y tromboxano-A2. Mientras que en las pro-angiogénicas con respuesta vasodilatadora están: IGF, TGF, VEGF y PlGF junto con sus receptores, IL-8, bFGF y PDGF [100-102]. Esto evidencia la estrecha relación entre la función endotelial vasomotora y el proceso angiogénico.

Considerando esta relación entre el endotelio y la angiogénesis, nos enfocamos en analizar los posibles cambios moleculares, con base en una medida indirecta de la función endotelial como es la VMF, que podrían presentarse en la regulación del proceso angiogénico en tejido de placenta. Las muestras analizadas provenían de la cara materna de la placenta, la cual contiene células de la microvasculatura responsables de la vascularización de los cotiledones. Por lo tanto, los resultados obtenidos provienen exclusivamente del estudio del ambiente microvascular de la placenta. Estas células son de gran importancia, ya que muchos desórdenes placentarios, como RCIU y PE, involucran cambios estructurales y vasculares que ocurren durante la microvascularización de las vellosidades coriónicas e impactan el intercambio de gases materno-fetal [103,104].

El análisis transcripcional de las muestras de placenta de los dos grupos identificó 4 vías de señalización involucradas en angiogénesis, que comprometían genes diferencialmente expresados en el grupo Δ VMF negativo.

Una de estas vías de señalización es la del factor transcripcional HIF1 α , la cual durante el desarrollo placentario se encuentra regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, ya que bajo condiciones no hipóxicas, la expresión de HIF1 α es inducida por factores de crecimiento en el que se involucran receptores tirosina-quinasa [105,106], involucrando a las vías PI3K y MAPK [107,108], lo que contribuye a la vascularización o ramificación vascular en la placenta. Sin embargo, los genes que hacen parte de esta vía se identificaron con una baja expresión, por lo que se espera, esté ocurriendo una disminución en la ramificación de los vasos.

Sin embargo, las siguientes tres vías de señalización estimuladas debido a la sobre-expresión de sus genes (tabla 2). La primera de estas involucra genes identificados en vías que conducen al desarrollo del cáncer. Los genes encontrados en esta lista responden a un fenotipo proliferativo, una característica angiogénica. Por lo tanto, se espera que en el grupo Δ VMF negativo se haya presentado un aumento en la proliferación de las células endoteliales de placenta. Otra de las vías que estaría siendo intensificada es la señalización por VEGFR1, este receptor con dominio tirosina-quinasa es estimulado por HIF1 α , su señal normalmente desencadena permeabilidad vascular y migración en células endoteliales [109], datos reportados indican que este receptor juega un papel importante en el mantenimiento de la angiogénesis [110], lo que se espera

encontrar en placentas a término como las analizadas, lo que lleva a pensar en la necesidad de mantener hasta última instancia una angiogénesis de sostenimiento debido a las dificultades en la vasodilatación. Por último, la vía que involucra hipoxia y P53, ha sido reportada en células trofoblásticas humanas [111], donde se presenta un aumento en la apoptosis de estas células por el incremento en la expresión de P53. Esto mismo fue evaluado en placentas de embarazos con restricción de crecimiento fetal, en las que se ha encontrado como las condiciones hipóxicas incrementan la expresión y acumulación de P53 en estas placentas, llevando a un aumento en la apoptosis celular [112].

En resumen, pese a que tres de las cuatro vías de señalización involucradas en angiogénesis estarían siendo sobre-expresadas, una de ellas, la de hipoxia que intensifica la expresión de P53 estaría controlando el aumento en la proliferación de la señal proliferativa de los genes encontrados en angiogénesis tumoral. Aunque la señal de VEGFR1 incrementa la permeabilidad vascular y mantiene la angiogénesis activa, esta puede verse afectada negativamente por la disminución en la vía de señalización HIF1 α , siendo este último uno de sus principales estimulantes para inducir su expresión.

Al analizar en conjunto las cuatro vías (tabla 2), se puede pensar en un mecanismo homeostático que conduce a la alteración de la dinámica celular mediante cambios en la expresión génica, de tal manera que la disminución en la vasodilatación arterial, podría verse compensada por la

alteración en la expresión de estos genes, evitando cambios estructurales grandes en la red vascular de la placenta.

1.4.2.1 IGFBP1 y sus bajos niveles de expresión en placenta

Todas los ARNm de las proteínas de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFBPs) han sido identificadas en el endometrio decidualizado materno, desde la sexta semana de la gestación hasta el término del embarazo [207]. Dentro de ellas, la IGFBP1 es una de las más importantes en el embarazo, siendo la principal proteína de unión en el líquido amniótico y de la decidua materna [113], además con una significativa importancia en el suero materno y fetal [114,115].

Alteraciones en la expresión de IGFBP1 pueden modular la biodisponibilidad de IGF1 (factor de crecimiento similar a insulina 1) [116-118]. IGFBP1 compite con IGFR-1 (receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1) por IGF-1, el cual, es el ligando de IGFR-1. En esta competencia IGF-1 tiene una mayor afinidad por IGFBP1 que por el receptor, por lo tanto, a mayor disponibilidad de la proteína de unión, IGF-1 va a tender a unirse a esta, disminuyendo las posibilidades de unirse a su receptor [119-121]. Adicionalmente, IGFBP1 también presenta acciones independientes de IGF-1, tales como inhibición del crecimiento celular y estimulación de la apoptosis [122,123].

La vía de señalización IGFR-1 activada por IGF-1, tiene acciones mitogénicas y diferenciarias en un amplio rango de tejidos tanto fetales como placentarios [124]. Este receptor está compuesto por dos subunidades extracelulares alfa, que contienen sitios de unión a la hormona, y dos subunidades beta que atraviesan la membrana, codificando una tirosina quinasa intracelular. El sitio de unión a la hormona activa al receptor quinasa, llevando a su autofosforilación y a la fosforilación de la tirosina de múltiples sustratos, incluido el sustrato del receptor de insulina (IRS) y las proteínas Shc [125]. A través de estas reacciones iniciales de fosforilación de la tirosina, las señales de IGF-I son transducidas a una compleja red de lípidos intracelulares y quinasas serina/treonina, que al final son las responsables de la proliferación celular, modulación de la diferenciación del tejido y protección contra la apoptosis [125,126].

El ARNm de IGF-1 está confinado a las glándulas uterinas en las regiones intercotiledones de la placenta [127]. Por lo que, altas concentraciones de IGFBP1 disminuirán la disponibilidad de IGF-1 perturbando la señalización de la vía IGFR-1, promotora de la angiogénesis en placenta. Sin embargo, tal y como lo muestran los resultados obtenidos, al presentarse niveles bajos en la expresión de *igfbp1*, conduciría a una disminución en sus niveles proteicos, permitiendo que IGF-1 al estar libre se una a su receptor y estimule las vías promotoras de la angiogénesis. En este caso, al compararse con el grupo Δ VMF positivo, se puede pensar que en el grupo Δ VMF negativo se hizo

necesario disminuir la expresión de este gen, como consecuencia de los problemas que presentaron este grupo de mujeres con la función vasomotora, evitando un impacto negativo en la angiogénesis placentaria.

1.4.2.2 Leptina una hormona pleiotrópica con actividades vasodilatadoras y pro-angiogénicas

Continuando con los genes que mostraron una disminución significativa en el grupo Δ VMF negativo, se encontró la leptina, una hormona ampliamente conocida por regular los depósitos de grasa en tejido adiposo. Aunque por muchos años, solamente se le atribuyó esta función, su identificación en otros órganos que la expresaban, además de ejecutar acciones adicionales, ha incrementado el interés y el conocimiento acerca de la funcionalidad de esta hormona en las últimas dos décadas. Uno de los órganos que presenta esta autonomía para la expresión de leptina es la placenta humana. En esta última, una de las acciones que se han identificado es la de promover angiogénesis, por medio de los receptores largos de leptina Ob(RL), expresados en el endotelio. Estos receptores carecen de dominios tirosina-quinasa intracelulares, por lo que deben unirse a quinasas citoplasmáticas, principalmente la Janus tirosina-quinasa 2 (JAK2). Una vez activada una proteína JAK, esto desencadena una transfosforilación de otras proteínas JAKs, así como la de otros residuos de tirosina (Tyr985, Tyr1138, y Tyr 1077) pertenecientes al receptor [128,129]. Lo anterior provee

de sitios de acoplamiento para moléculas corriente abajo, tales como los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs). La vía de señalización conocida como JAKs-STAT [130], conduce a la activación de dos importantes vías promotoras de angiogénesis, la MAPK/ERK1/2 (proliferación y diferenciación celular) [131] y la PI3K/AKT1 (proliferación, adhesión, migración, invasión y supervivencia celular) [132-134]. Al analizar los resultados obtenidos, se espera que una menor expresión de leptina en placenta, podría conducir a una disminución en la señal pro-angiogénica en este grupo de mujeres. Adicionalmente, esta misma vía de señalización, mediante la activación de PI3K/AKT1, ha sido propuesta para explicar el efecto vasodilatador dependiente de la activación de la vía de síntesis de NO [135].

En humanos, se ha encontrado que en células endoteliales la leptina ejecuta un efecto vasodilatador [136]. Algunos reportes han señalado a leptina como una molécula vasodilatadora cuyo efecto es independiente de la liberación de NO [137,138]. Mientras que otro estudio, resalta que su efecto vasodilatador se debe a la inducción de la síntesis del NO [135]. De acuerdo con esto, es factible pensar en que la disminución en los niveles de expresión de leptina (ARNm), podría ser una de las causas intrínsecas que condujo a la diferencia encontrada en la variable ΔVMF , con potencial influencia en la regulación del tono vascular en estas mujeres, y a su

vez, con un posible impacto sobre la vasculatura placentaria.

1.4.2.3 Sobreexpresión de PGF en tejido de placenta a término

El factor de crecimiento de placenta (PGF), es uno de los miembros de la familia VEGF [57-61]. Su único receptor es VEGFR-1, y se considera que amplifica las funciones conducidas por VEGF, como son la angiogénesis y la activación de células endoteliales vasculares [139,140].

Al final de la gestación se espera que los niveles de PGF sean más altos que al inicio del embarazo [141]. En los resultados encontrados se observa un incremento en los niveles de su ARNm superior al del grupo Δ VMF positivo. Esta sobreexpresión puede tener varias repercusiones. La primera, hace alusión a la evidencia que reporta la sobreexpresión de PGF como un marcador predictivo para el desarrollo de diabetes [142]. La segunda repercusión, debido al no desarrollo inmediato de la patología anteriormente mencionada, puede ser una respuesta a los mecanismos homeostáticos debido a los problemas de vasodilatación. Esto último es factible debido a la evidencia que señala que el aumento en las concentraciones de PGF intensifica la permeabilidad vascular y la respuesta inflamatoria [143,144], necesaria en la angiogénesis.

Al unir estos resultados con la disminución en la expresión de IGFBP1, se podría pensar que una de las consecuencias del incremento en la vía IGFR-1, podría llevar al aumento en la expresión de PGF, dada la relación de la vía de señalización VEGF con la de AKT [145].

CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ANGIOGÉNESIS PLACENTARIA DE MUJERES CON CAMBIOS EN LA Δ VMF.

2.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los mecanismos epigenético más estudiado ha sido la metilación del ADN [146]. Esta es llevada a cabo por una variedad de enzimas ADN metiltransferasas, responsables de adicionar un grupo metilo a los residuos de citosinas, principalmente, en regiones ricas en citosina/guanina, conocidas como islas CpG. Una regla general, que usualmente se cumple, es que, cuando una gran cantidad de citosinas en una isla o islas CpG localizadas en la región promotora de un gen se encuentran metiladas, el gen será silenciado por metilación. Esto significa que el gen se encuentra hipermetilado, y lo contrario ocurre cuando el porcentaje de citosinas metiladas es muy bajo, es decir, el gen se encuentra hipometilado, y por lo tanto hay expresión [147].

Un desarrollo placentario saludable involucra patrones de expresión génica espacio-temporalmente programados, y cualquier alteración en este proceso puede comprometer la función placentaria [148-150]. Subóptimas condiciones en el ambiente uterino, pueden conducir a alteraciones en los perfiles de metilación del ADN, generando cambios en la expresión de los genes comprometidos y previniendo un adecuado crecimiento y función placentario [151].

Otro mecanismo epigenético de gran potencial son los miRNAs, pequeños ARNs no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de cadena sencilla. La biogénesis canónica de estas moléculas está liderada por las enzimas RNAsas tipo III [152]. Un transcrito primario

(pri-miRNA), usualmente producido por la ARN polimerasa II, el cual es procesado por un heterodímero nuclear conformado por la enzima Drosha y por su ribonucleoproteína DGCR8, la cual reconoce 10 pb de la horquilla del pri-miRNA, posicionando los sitios catalíticos de la enzima Drosha [153], liberando una horquilla precursora de miRNA (pre-miRNA) de aproximadamente 55-70 nucleótidos. Los casi 2 nucleótidos en el extremo 3' de la horquilla pre-miRNA son reconocidos por exportina 5 y su socio Ran-GTP, permitiendo su salida del núcleo. En el citoplasma la enzima Dicer junto con sus ribonucleoproteínas de doble cadena TRBP y PACT, lo procesan dando como resultado pequeños dúplex de RNA de doble cadena de aproximadamente 22 nucleótidos [154-156]. Las dos cadenas son separadas y una de ellas es transportada por una proteína argonauta (AGO), la cual posicionará la cadena líder en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC o miRISC), sirviendo de guía para represar los ARNms blancos [157].

Actualmente la regulación epigenética por parte de los miRNAs, ha permitido identificar nuevos actores que ejercen un papel importante en procesos como la angiogénesis [158-160]. Diversos estudios han identificado miRNAs asociados a angiogénesis, actualmente conocidos como angiomiRs [161-163], y muchos otros han catalogado estos angiomiRs, según los ARNms blanco que regulan, como pro-angiogénicos [23,159,162,164-182], o anti-angiogénicos [170,174,183-190].

La identificación de nuevos mecanismos de regulación se hace apremiante a la hora de establecer variantes en el proceso fisiológico que pueden estar potencializando la aparición de la patología vascular.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Población y Muestra

En este estudio se utilizó un banco de muestras, provenientes de mujeres primigestantes que participaron en el estudio financiado por Colciencias/Universidad del Valle/FES (Cód. 11064592) "Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con micronutrientes sobre factores maternos y placentarios asociados a la programación fetal de enfermedades crónicas no transmisibles". En dicho proyecto las gestantes fueron captadas entre las semanas 16 y 20 de gestación, con un rango de edad oscilando entre los 19 a no mayores de 30 años..

Como criterios de inclusión, estas mujeres debían estar afiliadas al sistema de salud pública y ser atendidas en la Empresa Social del Estado ubicada en la zona de ladera de la ciudad de Santiago de Cali – Valle del Cauca, Colombia (E.S.E. ladera) (figura 3). Respecto a los criterios de exclusión, se siguió el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2003 [165]. Todas las participantes firmaron un consentimiento en el cual autorizaban, para fines investigativos, el uso de un banco de muestras, así como de la información suministrada durante el seguimiento del embarazo. Este consentimiento fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad del Valle (Acta N° 017-08).

Las muestras de placenta se preservaron a -70°C, y la identidad de las mujeres estuvo protegida mediante un sistema de codificación, así como la información recopilada hasta el momento del parto.

2.2.2 Selección de las muestras.

A partir del grupo control del estudio anteriormente mencionado, se analizaron 191 datos correspondientes a la variable ΔVMF , identificándose un patrón de distribución de valores extremos, que al evaluar su significancia mediante una prueba t-student, se encontró un p-valor=0,04. Con base en ello, se seleccionaron las muestras que estaban en los extremos de esta distribución y que contaban con muestra de placenta. Adicionalmente, dichas muestras no debían haber presentado ninguna complicación durante el embarazo, haber dado a luz a término y su neonato no haber presentado ninguna complicación antes y durante el parto. Teniendo en cuenta estos criterios, se seleccionaron 11 muestras, de las cuales seis provenían del grupo con ΔVMF positivo, y cinco del grupo con ΔVMF negativo, la variable edad no mostró diferencias significativas entre los grupos (p-valor = 0.537), mediante la prueba U-Mann - Withney.

2.2.3 Extracción y cuantificación de ADN y ARN a partir de tejido de placenta

Se tomaron 11 muestras de la cara materna de la placenta congeladas a -70°C, de las cuales cuatro (las mismas usadas para el transcriptoma) fueron usadas para extraer ADN, a partir de 30mg de tejido, mediante el DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), y 11 (incluyendo las cuatro anteriormente extraídas para el análisis de transcripcional) para la extracción de ARN total, utilizando el miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Para ambos kits se siguieron las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Mediante el uso de un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), se realizó el análisis espectrofotométrico de la cuantificación y evaluación de pureza de los ácidos nucleicos, a partir de 1ul de muestra.

En el caso del ARN total, se realizaron electroforesis con geles de agarosa al 1,2%, usando formamida y aplicando calor para desnaturalizar las

muestras de ARN, siguiendo el protocolo de Masek *et.al.*, 2005 [86], y así determinar la calidad del ARN extraído, de acuerdo a la presencia de las bandas para ARN ribosomal, 28s y 18s, con un peso aproximado de 5 kb y 2 kb, respectivamente. Y con una razón 28s:18S de 2:1, lo que garantiza una integridad total del ARN

2.2.4 Arreglos de PCR para metilación de ADN

Para evaluar el porcentaje de metilación de 16 regiones promotoras de genes involucrados en angiogénesis (tabla 4), se utilizó el EpiTect Methyl II PCR array (335112CMETH9624-24; Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este método se basa en la cuantificación del ADN, posterior a la digestión con dos tipos de enzimas de restricción, una sensible y otra dependiente de metilación, las cuales digieren el ADN metilado o desmetilado respectivamente; para lo cual, se utilizó el EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit (335452; Qiagen). Una vez terminada la digestión se procede a realizar el montaje de las placas con sus respectivas muestras; el ADN no digerido en cada reacción enzimática es cuantificado por PCR en tiempo real, usando cebadores que flanquean la región promotora de interés. La fracción relativa de ADN metilado y desmetilado es subsecuentemente determinada por la comparación de la cantidad de ADN en cada reacción simulada donde no se adiciona enzimas. Para este procedimiento se utilizó un termociclador CFX96 (Bio-Rad), y el programa usado fue el siguiente:

1- 10 min a 95°C	
2- 15 seg a 95°C	} X
3- 1 min a 60°C	
	} 40 ciclos

Se adiciona curva de melt al final, y se ajusta la tasa de rampa a 1°C/seg.

Tabla 4. Regiones promotoras de genes involucrados en angiogénesis.

UniGene	RefSeq	Símbolo	Descripción
Hs.369779	NM_012238	SIRT1	Sirtuina 1
Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular
Hs.284244	NM_002006	FGF2	Factor de crecimiento de fibroblasto 2 (básico)
Hs.536663	NM_002213	ITGB5	Integrina, beta 5
Hs.338207	NM_004958	MTOR	Blanco mecanístico de rapamicina (serina/treonina quinasa)
Hs.633514	NM_003255	TIMP2	TIMP inhibidor de metalopeptidasa 2
Hs.559820	NM_001126049	KLLN	Kilin, inhibidor de la replicación del ADN regulada por p53
Hs.131704	NM_003873	NRP1	Neuropilin 1
Hs.194236	NM_000230	LEP	Leptina
Hs.479754	NM_001093772	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 oncogen homólogo del sarcoma viral felino
Hs.264887	NM_001174067	FGFR1	Receptor del factor de crecimiento de fibroblasto 1
Hs.654360	NM_002019	FLT1	Tirosina quinasa 1 relacionado con Fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor vascular de permeabilidad)
Hs.118400	NM_003088	FSCN1	Homologo 1 de Fascin, agrupación de proteínas actina (Strongylocentrotus purpuratus)
Hs.479756	NM_002253	KDR	Receptor del dominio del insert quinasa (un receptor tirosina quinasa tipo III)
Hs.705413	NM_001198689	LEPR	Receptor de leptina

2.2.5 Arreglos de PCR para miRNAs

Esta técnica combina dos metodologías, una es la de microarreglos, en la que se conocen las secuencias de interés que van a hibridar con la muestra; y la otra, es el PCR en tiempo real, que incrementa la sensibilidad y eficiencia de la reacción. Respecto a la tecnología de microarreglos, los arreglos de PCR presentan grandes beneficios en términos de eficiencia, ya que no solo se hibrida e identifica la secuencia de interés, sino que también se está validando y cuantificando en términos de abundancia dicha

secuencia mediante la PCR en tiempo real. Además de la optimización de los recursos, porque permite utilizar pequeñas cantidades de ARN por reacción, debido a la sensibilidad de la PCR [191]. Todo lo anterior presenta grandes beneficios cuando los objetivos experimentales se enfocan en una sola vía de regulación o en un limitado número de genes de interés.

Siguiendo las especificaciones del fabricante, se utilizó un miScript II RT Kit (218161; Qiagen) para los experimentos de transcripción reversa (RT-PCR). Una vez las muestras fueron retrotranscritas a ADNc, se utilizó el miScript miRNA PCR array (331221-D24; Qiagen). Un arreglo de PCR, diseñado para identificar secuencias de miRNAs maduros validados experimentalmente por regular angiogénesis (tabla 5). El master mix utilizado para estos arreglos de PCR corresponde al miScript SYBR Green PCR kit (218075 Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El programa del termociclador fue el siguiente:

- 1- 10 min a 95°C
 - 2- 2- 15 seg a 95°C
 - 3- 3- 1 min a 60°C
- } X
} 40 ciclos

Al final, se adicionó la curva de melt, y se ajustó la tasa de rampa a 1°C/seg. El termociclador utilizado fue un CFX96 (Bio-Rad), el control endógeno usado fue RNU6-2 y el método de cuantificación fue el $\Delta\Delta Ct$.

2.2.6 Determinación de posibles blancos de regulación por parte de miRNAs

Para determinar la lista de genes blancos para cada uno de los miRNAs que mostraron una expresión diferencial significativa, se utilizó el algoritmo miRanda – mirSVR [192]. Este algoritmo consta de un modelo de regresión basado en las características de la secuencia y estructura de los sitios de predicción entre el dúplex microRNA/ARNm, extraídas de la base de datos

miRanda, cuyos perfiles de expresión derivan de un proyecto de secuenciación masiva de un gran grupo de tejidos de mamíferos, líneas celulares de origen patológico y normal. A este se suma mirSVR, un método de aprendizaje automático que ordena los sitios blanco del miRNA según un puntaje de regulación, incrementando la confiabilidad del método de predicción de los blancos al tener en cuenta este puntaje. La gran ventaja que tiene este frente a otros algoritmos, es su capacidad para identificar un significativo número de sitios no-canónicos y no-conservados determinados experimentalmente.

Tabla 5. Lista de angiomiRs evaluados

Mature ID	Número de acceso (miRBASE)	Genes blanco
has-miR-16-5p	MIMAT0000069	VEGFA [170]
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	JNK1 [176]
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	VEGF [193]
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	PTEN [194]
hsa-miR-23a-5p	MIMAT0004496	SPROUTY2 y SEMA6A [195]
hsa-miR-27a-5p	MIMAT0004501	SPROUTY2 y SEMA6A [163,195]
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	ITGB5 [190]
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	mTOR [196]
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	SPRED1/PIK3R2 [165]
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	VEGFG, bFGF, HOXA5 [166]
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	p120RASGAP, estimulado por VEGF, bFGF, PTEN [178]
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	PDGFR alfa y proteína quinasa C epsilon [196]
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	FASCIN [196]
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	CYR61 [197]
hsa-miR-210	MIMAT0000267	HIF-1 [170,172]
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	ROBO1, ROBO2, GLCE [198]
hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	c-KIT [184]
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	c-KIT [184]
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	VEGFR2 [162]
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	SUFU, FUS-1 [181]

2.2.7 Análisis de enriquecimiento a partir de sets de genes:

Para identificar las vías de señalización comprometidas a partir de los genes de expresión diferencial que podrían estar siendo regulados por alguno de los mecanismos anteriormente mencionados, se utilizó la herramienta Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [92]. Un método cuyo

poder se basa en el enfoque de grupos de genes, estos son, grupos que comparten una función biológica, una localización cromosómica o regulación en común.

2.2.8 Identificación y cuantificación de la proteína IGFBP1 por la técnica de Western Blot

2.2.7.1 Preparación de la muestra:

Para la extracción de las proteínas, se tomaron 3 ml de buffer CelLityc (C3228 Sigma-Aldrich) con inhibidor de proteasas a los cuales se adicionaron 500 mg de tejido de placenta. La muestra fue lisada mecánicamente y se sometió a ultrasonido mediante el uso de un sonicador para obtener un tejido uniformemente homogenizado. Posteriormente, se incubó en baño frío por 30 min y se centrifugó a 1000 rpm por 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante, ya que es el que contiene las proteínas, y a partir de este se procedió a medir su concentración.

La cuantificación proteica se realizó por medio del ensayo con ácido bicinoninico (BCA-1 Sigma-Aldrich) en una placa de 96 pozos teniendo en cuenta los siguientes pasos:

- a) Preparación del reactivo de trabajo: se mezclan 50 partes del reactivo A más una parte de reactivo B hasta obtener un color verde claro.
- b) La curva de calibración que va desde 100mg/ml a 1000µg/ml en tubos ependorf de 1.5ml según tabla 6.

Tabla 6. Datos de la curva de calibración.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Concentración (µg/ml)	0	100	200	400	600	800	1000
Solución proteína estándar (µl)	0	6	12	24	36	48	60
Buffer de lisis (µl)	60	54	48	36	24	12	0

- c) La dilución de trabajo para placenta fue de 1:20, por lo que las muestras de trabajo se diluyeron de la siguiente manera: por 3 μ l de muestra se adicionaron 57 μ l de Cellytic, que era el buffer en el que estaban diluidas las muestras.
- d) A la placa se aplicaron 200 μ l del reactivo de trabajo, se adicionaron 2 μ l de cada uno de los puntos de la curva más los del blanco. Para las muestras se adicionaron 25 μ l. Se incubó por 30 min a 37°C y se procedió a leer la absorbancia a 562 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad).

A partir de la cuantificación de proteína total para cada una de las muestras, se determinó la cantidad de proteína total usada para realizar la electroforesis, en este caso, se trabajó con 40 μ g/ μ l.

2.2.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), se preparó un gel con dos fases. El primer gel al 10% que corresponde a la fase de separación; y un segundo gel al 4% que corresponde a la fase de apilamiento, siendo este último, el gel donde están dispuestos los pozos para servir la muestra y que esta ingrese a la matriz. Cada muestra fue sembrada intercalando los grupos de estudio, sirviendo en uno de los extremos del gel un marcador de peso molecular para proteínas (10747-012 Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se llevó a cabo iniciando con una pre-corrida de 30 min a 60 voltios y a 100 voltios por 90min. Se usó el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad), empleando Tris-glicina (pH 8.8) como buffer.

2.2.8.3 Electro transferencia

Finalizada la electroforesis se obtuvo el perfil proteico en el gel, se desechó la porción al 4% y el gel de separación se situó sobre el

soporte de nitrocelulosa, para proceder a realizar la electro transferencia de las proteínas de placenta. Esta se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 voltios durante 90 min, se usó el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad), empleando Tris-glicina (pH 8.6) como buffer a 4°C.

2.2.8.4 Inmuno Blot

Una vez concluida la electro transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó con rojo de Ponceau, para verificar la transferencia de las proteínas y observar el patrón de separación. Tomando como referencia el marcador de peso molecular, se realizaron los cortes en la membrana, teniendo en cuenta los pesos moleculares de las proteínas de interés, IGFBP1 (30 kDa) y GAPDH (37 kDa), esta última usada como control interno para normalizar los resultados. Los fragmentos de membrana, fueron lavados con buffer TBST, y se procedió a bloquear con leche bovina al 2% para evitar la fijación inespecífica del anticuerpo primario. Posteriormente se incubaron por 12 horas con su respectivo anticuerpo policlonal, anti-GAPDH (1:2,000) (Ab37168; ABCAM) y anti-IGFBP1 (1:1,000) (Ab4249; ABCAM). Luego, cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario con una dilución 1:10,000 de anti-HRP (peroxidasa de rábano) (sc-2030, SantaCruz Biotechnology) por 1 hora, lo que favorece la identificación de las proteínas de interés. Finalmente se retiró el anticuerpo y se aplicaron lavados con buffer TBST.

2.2.8.5 Revelado

En un cuarto oscuro se procedió a aplicar el SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080, Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante, a cada membrana con el fin de generar luminiscencia y, con base en esto, determinar la presencia de las proteínas en la membrana. Para medir la intensidad de las bandas, es decir, que tanto contenido de la proteína había en cada muestra, se utilizaron películas radiofotográficas o fotosensibles (4489, Kodak) por

membrana. Las soluciones de revelado (desarrolladora y fijadora) procedían de la misma casa comercial.

Una vez terminado el proceso de revelado, las películas, fueron llevadas al escáner para la digitalización de las imágenes, permitiendo así, la cuantificación por densidad óptica, mediante el software libre ImageJ.

2.2.9 Análisis de datos

Para analizar los porcentajes de metilación de las regiones promotoras se utilizó el software proporcionado por la casa comercial Qiagen, EpiTect Methyl II PCR Data Analysis. Para el análisis estadístico se utilizó el software STATA (versión 11.1), aplicando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, para determinar si las diferencias en la expresión de los miRNAs y los niveles proteicos de IGFBP1 eran significativos, teniendo como valor de significancia $p < 0,05$. En el caso de la cuantificación proteica se utilizaron los niveles proteicos de GAPDH como normalizadora.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análisis epigénético a nivel pre-transcripcional mediante la metilación de las regiones promotoras de genes involucrados en angiogénesis.

Se analizaron regiones promotoras de genes conocidos por desempeñar funciones en las vías de señalización angiogénica. Al evaluar una selección de 15 regiones promotoras, se presentan 11 en los que se obtuvieron datos confiables en todas las muestras. Al analizar los porcentajes de metilación, solo se aprecian cambios entre grupos en los genes KIT y LEP (figura 8).

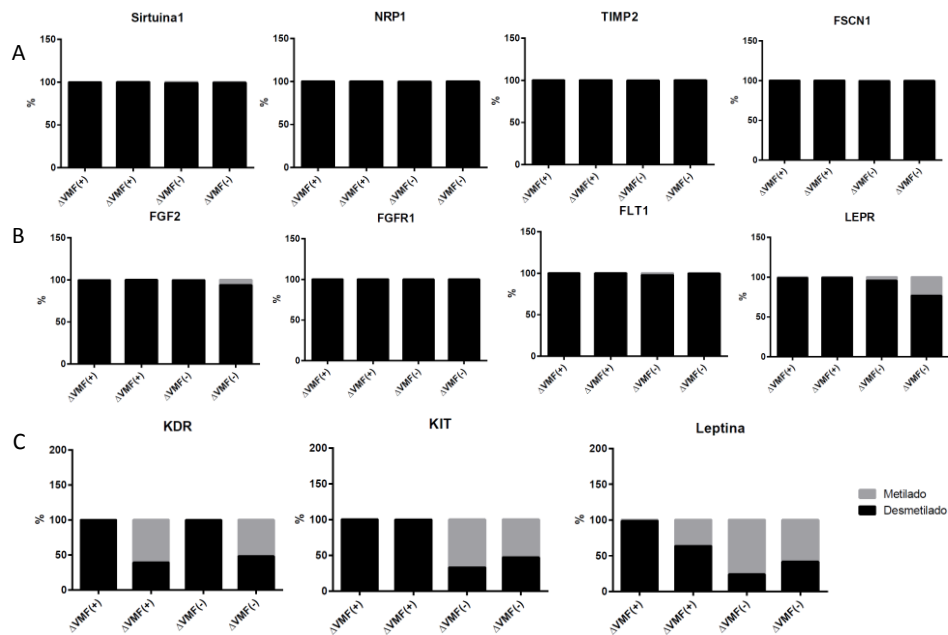


Figura 8. Porcentajes de metilación de regiones promotoras de genes involucrados en angiogénesis. En los paneles A y B, se observa que no se presentaron cambios en el estatus de metilación de estos genes entre los grupos, se observa en su mayoría un 100% de regiones desmetiladas. Sin embargo, en el panel C, se observan cambios en los genes *kdr*, *kit* y *leptina*, sin embargo, la variación de *kdr* no marca diferencias entre los grupos, contrario a lo observado en *kit* y *leptina* que muestran mayores porcentajes de metilación en el grupo ΔVMF negativo (-) frente al positivo (+), este último mostrando porcentajes de desmetilación superiores.

En la tabla 7 se muestran los porcentajes de metilación de los genes *lep* y *kit* para cada grupo, los porcentajes de metilación de los demás genes se presentan en el anexo tabla 1.

Tabla 7. Porcentajes de metilación del promotor de leptina y *kit* en muestras que presentaron Δ VMF positivos y negativos

Δ VMF	% metilación promotor del gen <i>lep</i>	% metilación promotor del gen <i>kit</i>
Positivo	(1.6 – 36.8)	(0.0 – 0.03)
Negativo	(58.4 – 76.2)	(66.88 – 52.90)

2.3.2 Análisis epigenético post-transcripcional mediante los perfiles de expresión diferencial de angiomiRs en placentas con Δ VMF negativo.

De los 20 angiomiRs analizados se encontraron ocho con una alta expresión en el grupo Δ VMF negativo: has-miR-16, -17, -23a, -27a, -92a, -132, -145 y -378, con p-valores = 0.0446, 0.017, 0.0285, 0.0106, 0.0446, 0.0446, 0.0441, 0.0441, respectivamente (figura 9).

Las listas de blancos predictivos de cada uno de estos ocho angiomiRs se cruzó con la lista de transcriptos con baja expresión resultado del transcriptoma (capítulo 1), teniendo en cuenta solo aquellos transcriptos codificantes, en total se obtuvieron 74 genes que son blancos predictivos de estos angiomiRs (anexo 2).

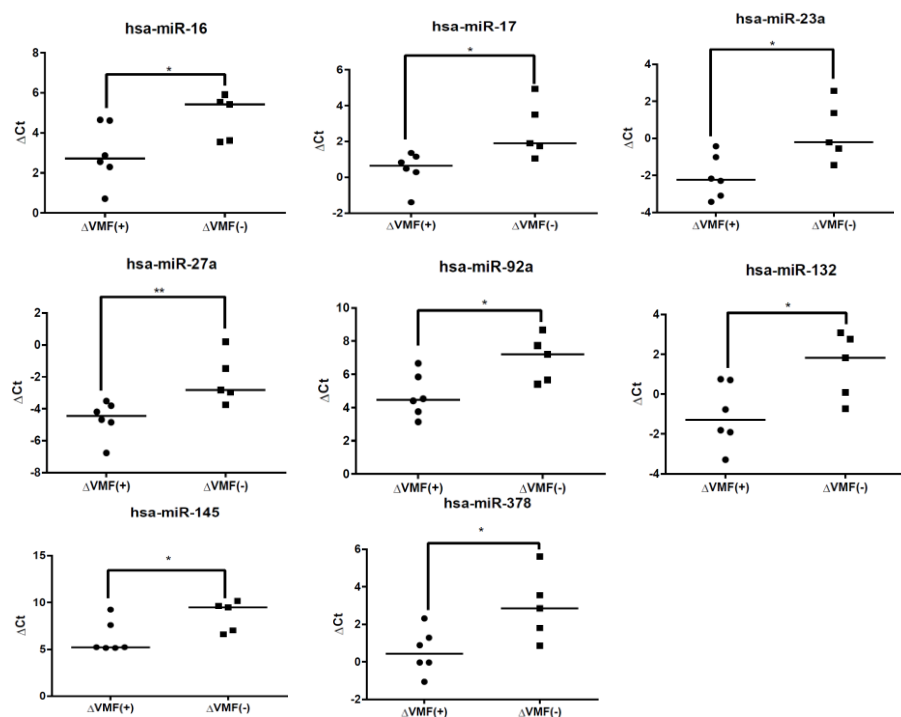


Figura 9. angiomiRs con expresión diferencial en placenta de mujeres con $\Delta VtMf$. Análisis comparativo entre grupos con $\Delta VtMf(+)$ positivo y $(-)$ negativo, encontrando sobreexpresión significativa de ocho angiomiRs en el grupo $\Delta VtMf(-)$. Cabe resaltar que hsa-miR-27a, fue el angiomiR que marcó una mayor diferencia entre los dos grupos (p -valor=0.016). (*) Indica que los niveles mostrados presentaron una diferencia significativa respecto al grupo $\Delta VtMf$ positivo.

Al evaluar estos 74 genes se identificaron dos vías de señalización con potencial angiogénico (tabla 8).

Tabla 8. Vías de señalización con potencial angiogénico de genes que presentaron una baja expresión por posible regulación de angiomiRs.

Nombre del set de genes [# Genes (K)]	Descripción	# Genes en traslape (k)	p-valor	FDR q-valor
PID Vía de señalización HNF3B [45]	Redes del factor de transcripción FOXA2 y FOXA3	HNF1A, KCNJ11, IGFBP1	5.42×10^{-5}	1.2×10^{-2}
PID Vía de señalización del factor HIF1 [66]	Red del factor de transcripción HIF-1-alfa	LEP, IGFBP1, VEGFA	1.7×10^{-4}	2.3×10^{-2}

□ Los números entre corchetes corresponden al total de genes que contiene cada set

Al evaluar los genes involucrados en estas vías, se escogió a LEP por contar con un solo transcripto codificante, y a IGFBP1, por presentar sus tres únicos transcriptos codificantes, identificados en el Ensemble Reference Genome, estar presentes en la lista de genes con baja expresión. Los demás genes presentan muchos transcriptos no codificantes en la misma lista, o como en el caso de VEGFA, transcriptos en la lista de sobre-expresión. Por lo tanto, estos fueron excluidos de los análisis de interpretación biológica. Los genes seleccionados fueron relacionados con los angiomiRs sobre-expresados que podrían estar regulando su expresión (tabla 9)

Tabla 9. angiomiRs que podrían estar regulando la expresión de genes involucrados en vías angiogénicas

Genes	angiomiRs	mirSVR score
LEP	hsa-miR-17,	-0.1465
	hsa-miR-27a	-0.2773
IGFBP1	hsa-miR-92a,	-0.1390
	hsa-miR-132	-0.1395

De estos dos genes, se escogió a *igfbp1* para continuar con los análisis de identificación y cuantificación de sus niveles proteicos en placenta. Esta escogencia se debe a su participación en ambas vías de señalización que promueven placenta.

2.3.3. Relación entre el perfil de expresión de hsa-miR-92a, hsa-miR-132 e *igfbp1* a nivel de mensajero y proteína.

Los perfiles de expresión de hsa-miR-92a y hsa-miR-132 respecto al ARNm de *igfbp1* muestran una relación inversa y significativa evaluándolos

individualmente (figura 10A-C). Sin embargo, al comparar los niveles de expresión entre el ARNm de *igfbp1* y su proteína, y aunque en esta última se observa una disminución, ésta no fue significativa entre los dos grupos (figura 10C y D)

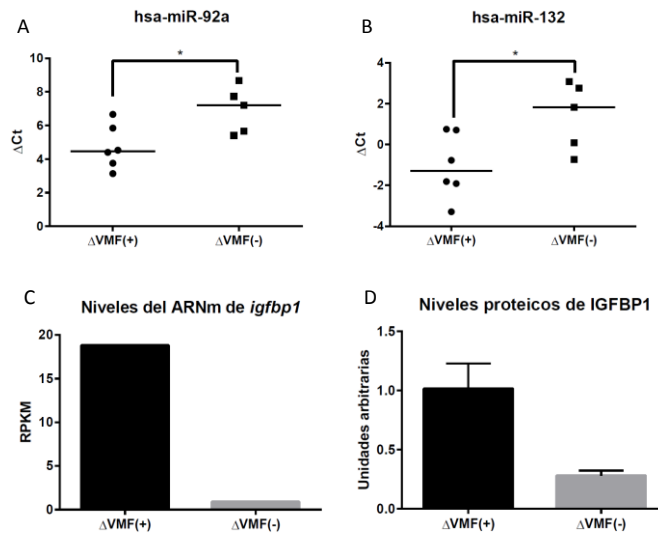


Figura 10. Sobreexpresión de has-miR-92a y hsa-miR-132 estaría disminuyendo los niveles de expresión de *igfbp1* a nivel de ARNm y proteína en el grupo $\Delta VMF(-)$. En los paneles A y B se observa la sobreexpresión de los angiomiRs miR-92a y miR-132 en el grupo $\Delta VMF(-)$ negativo comparado con el $\Delta VMF(+)$ positivo (p-valor=0,0552). El panel C muestra la disminución en el número de transcritos de *igfbp1* en el grupo $\Delta VMF(-)$. Por último, el panel D, presenta los niveles proteicos en los dos grupos con una disminución no significativa en el grupo ΔVMF negativo (p-valor = 0.248). (*) Indica que los niveles mostrados presentaron una diferencia significativa respecto al grupo ΔVMF positivo.

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Regulación epigenética a nivel transcripcional por parte de la metilación de la región promotora de leptina

La metilación de la región promotora del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos que en la mayoría de los casos se ha considerado sinónimo de baja expresión [147]. En el caso de *kit*, un proto-oncogen que codifica para un receptor tirosina-quinasa, donde su ARNm ha sido detectado en la decidua y en la placenta [199,200]. En la placenta madura, a nivel de mensajero, ha sido detectado principalmente en la capa decidual [200,201]. Los estudios que evalúan el estatus de metilación de su región promotora, han sido reportados en melanomas [202] y rabdomiosarcomas [203], demostrando una correlación inversa entre una alta densidad de metilación de la región promotora con los niveles de expresión de *kit*. Sin embargo, estudios en placenta que evalúen específicamente la región promotora de *kit* a nivel de metilación no han sido reportados. Cabe resaltar que aunque faltan estudios en placenta, es necesario recordar que la regulación de *kit* no solo responde a un único mecanismo epigenético, se ha demostrado que SDF1 α (factor derivado del estoma 1 alfa), junto con CXCR4 (receptor 4 de la citosina quimiotáctica motivo C-X-C), promueven la expresión de KIT, a través de la inhibición de la expresión de las DNMT1 y DNMT3 β y la actividad global de DNMT, con la subsecuente desmetilación del gen *kit* [204].

Lo anterior sugiere una evaluación cautelosa de los resultados encontrados, dado que se requiere de mayor información acerca de la red interactiva para predecir cambios en la expresión de este gen.

Por otra parte, en el caso de leptina, una hormona pleiotrópica producida por la placenta, hay reportes que señalan una correlación inversa entre los niveles de expresión y los porcentajes de metilación de su región promotora [205,206]. En placenta, los resultados encontrados señalan que la disminución en la expresión de leptina (ARNm) (tabla 3), podría ser consecuencia del incremento en los porcentajes de metilación en su región promotora (tabla 7). Hay estudios que señalan este mecanismo, no solo como una fuente de disminución de su expresión, sino también, como una de las causas a considerar por su relación con posibles problemas en la angiogénesis [207-209]. Esto último lo reporta Lesseur C, et al., 2014, quienes encontraron una correlación negativa entre porcentajes de metilación y expresión de *lep*, en embarazos de mujeres obesas que desarrollaron diabetes [207].

Hasta el momento, no hay reportes que refuten nuestros resultados.

2.4.2 Regulación post-transcripcional mediante la expresión diferencial de angiomiRs en tejido de placenta.

En los últimos años, los miRNAs han surgido como una herramienta molecular de gran potencial para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades; no solo por la regulación post-transcripcional que ejercen sobre sus mRNAs blancos, sino también, porque la gran mayoría de los miRNAs identificados hasta el momento muestran patrones de expresión estadio y tejido-específico durante el desarrollo, están involucrados en un amplio rango de procesos fisiológicos [210], y los niveles de expresión de muchos de estos se encuentran alterados durante el desarrollo de una patología [211,212].

Con base en lo anterior, se han identificado miRNAs claves para procesos fisiológicos específicos, donde la alteración en sus perfiles de expresión puede estimular o inhibir dicho proceso [3,4]. Un ejemplo de esto, lo presentan los miRNAs que regulan angiogénesis o angiomiRs, muchos de ellos han sido categorizados a partir de la evidencia encontrada en cáncer [166,170,172,177,178,181,187]. Sin embargo, muchos de estos mismos han sido identificados en tejido de placenta [193,197,213-216], al igual que comprometidos en complicaciones vasculares como la PE, abortos espontáneos, y RCIU [159,171,217-229].

De los angiomiRs analizados en placenta, ocho de ellos se encontraron sobre-expresados, de estos, cuatro de ellos presentan funciones mayoritariamente anti-angiogénicas, entre los que se encuentran, hsa-miR-16 [216,226], cuya sobreexpresión en células madre mesenquimales derivadas de la decidua materna (dMSCs), disminuye la producción de VEGFA, lo que induce a un arresto del ciclo celular en el paso G0/G1. La reducción de VEGFA inhibe la habilidad migratoria de las células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y de la formación del tubo en Matrigel [216]. De igual manera, el clúster miR-17~92a, cuenta con dos angiomiRs de características principalmente anti-angiogénicas, siendo estos hsa-miR-17 y hsa-miR-92a, tanto *in vivo* como *in vitro* [177,190]. En el caso de hsa-miR-17, este ha sido reportado como un regulador de la invasión de la arteria espiral materna en el primer trimestre del embarazo, mediante la disminución en la expresión de EFNB2 [193]. Mientras que hsa-miR-92a, ha evidenciado su papel anti-angiogénico mediante el bloqueo de la formación de brotes vasculares, lo que conduce a una inhibición de la formación de la red vascular, también participando en la reducción de la migración de las células endoteliales y su adhesión dispara la fibronectina [190]. Por último hsa-miR-145 ha mostrado un efecto inhibitorio en el crecimiento

de tumores mediante la disminución de la señal angiogénica, tanto in vivo como in vitro [230], así como en la formación de podosomas en células vasculares del músculo liso, los cuales son muy importantes para la migración de estas células [196].

Por otra parte, los cuatro angiomiRs restantes presentan características principalmente pro-angiogénicas. En el caso de hsa-miR-23a y hsa-miR-27a, ambos han mostrado su potencial pro-angiogénico debido a la regulación de sus blancos Sprouty2 y Sema6A, respectivamente, cuya actividad anti-angiogénica está bien reconocida [195]. De igual manera hsa-miR-132, en un estudio realizado por Anand et al., 2010, concluyeron que hsa-miR-132 funciona como un interruptor de encendido para la angiogénesis, suprimiendo la expresión endotelial de p120RasGAP [178]. Por último, hsa-miR-378, es otro angiomiR promotor de la angiogénesis, debido a la regulación de su blanco Nodal, un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta, el cual inhibe la proliferación de las células trofoblásticas, induciendo su apoptosis; estos resultados provienen de un estudio que evaluó placentas de mujeres PE respecto a placentas de embarazos pre-término, encontrando una disminución significativa en los niveles de expresión de este angiomiR en las PE [215].

Se puede apreciar que la evidencia del papel regulador de la mayoría de los angiomiRs ha sido evaluada en cáncer, con muy pocos resultados en su regulación a nivel de placenta, salvo casos excepcionales, como miR-16, el clúster miR-17-92 y miR-378 [177,190,215,216,226]; aún se desconoce mucho acerca del papel regulador de los demás angiomiRs en la angiogénesis de la placenta, lo que hace pertinente su consideración.

2.4.3 Relación entre los mecanismos epigenéticos y los genes diferencialmente expresados a la baja

2.4.3.1 Regulación pre y post-transcripcional de la expresión de leptina en placentas de mujeres que presentaron Δ VMF negativo

La leptina es una hormona pleiotrópica producida por la placenta, que cuenta con funciones vasodilatadoras y pro-angiogénicas (previamente descritas en el capítulo 1). Respecto a la regulación en su expresión, al encontrarse disminuida en las placentas de mujeres con Δ VMF negativo (tabla 3), esta podría ser explicada por medio de dos mecanismos epigenéticos.

El primero es la metilación de su región promotora, que en este grupo presentó porcentajes superiores al 50% (tabla 7). Sin embargo, este no fue el único mecanismo con potencial regulador para la expresión de este gen. Dos angiomiRs sobre-expresados, podrían estar regulando su expresión, estos son hsa-miR-17 y hsa-miR-27a, el primero presenta una actividad principalmente anti-angiogénica, lo que se espera que al regular negativamente a leptina, conduzca a una disminución en la señal pro-angiogénica. Sin embargo, no hay reportes que hayan intentado validar esta predicción. Por otra parte, hsa-miR-27a es conocido por conducir a una señal pro-angiogénica, lo que genera confusión respecto al papel regulatorio que estaría desempeñando sobre leptina y bajo qué condiciones sería uno de sus blancos de regulación. Sin embargo, Viesti *et al.*, 2014, evaluaron esta interacción y no encontraron una correlación inversa entre los niveles de miR-27a y el ARNm de leptina [231]

2.4.3.2 Regulación post-transcripcional de *igfbp1* en placentas de mujeres que presentaron Δ VMF negativo

La proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP1), es producida por placenta y su espectro de acción se mantiene durante todo el embarazo. Esta proteína, previamente descrita en el capítulo 1, estaría actuando principalmente como una molécula anti-angiogénica, por lo que su disminución en la expresión a nivel de ARNm podría estar siendo explicada por el incremento en la expresión de angiomiRs con potencial regulador de su secuencia. Entre estos se encuentran hsa-miR-92a y hsa-miR-132. El primero con un potencial dual, descrito por algunos como pro-angiogénico [190] y por otros como anti-angiogénico [191], y el segundo mayoritariamente pro-angiogénico [178]. En ambos casos no se cuenta con evidencia experimental que haya evaluado la presencia de estos miRNAs con la disminución en la expresión de *igfbp1*.

Respecto a los niveles proteicos, estudios previos, han detectado por western blot [233] e inmunohistoquímica [234] la expresión de IGFBP1 en el amnios y en la decidua, que en la placenta ha sido considerada baja. Los resultados de la identificación y cuantificación de los niveles proteicos de IGFBP1 en este estudio, mostraron una disminución en los mismo, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (p-valor = 0.248). Lo anterior impidió establecer una correlación entre los niveles del ARNm y los de la proteína. Cabe resaltar, que en muchos casos la expresión del ARNm no siempre muestra una correlación perfecta con sus correspondientes niveles proteicos [235,236]. Adicionalmente, un posible problema técnico a considerar, en la cuantificación proteica, es el uso de la proteína de normalización, ya que, pese a ser

ampliamente usada en western blot, GAPDH ha reportado una baja estabilidad entre grupos en muestras de placenta, por lo que se recomienda la tinción con negro de amido, ya que en placenta ha mostrado ser un marcador más estable [237].

6. CONCLUSIONES

- Cambios negativos en el Δ VMF una medida indirecta de la función vasodilatadora del endotelio, muestran variaciones en los perfiles de expresión de genes involucrados en angiogénesis en tejido de placenta.
- Mecanismos de regulación epigenética pre y pos-transcripcionales podrían estar explicando la expresión disminuida del ARNm de leptina; el primero de los mecanismos es el aumento en los porcentajes de metilación de la región promotora de este gen; y el segundo mecanismo, cuenta con la participación de dos angiomiRs cuya expresión se encuentra incrementada, y leptina es uno de sus blancos predictivos de regulación
- La disminución en la expresión de leptina en la placenta, estaría reafirmando los problemas en la vasodilatación que ya de por si estas mujeres han manifestado con el cambio negativo en su VMF, que a la vez podría sugerir una disminución en la señal angiogénica.
- Aumento en la expresión de hsa-miR-92a y hsa-miR-132 podrían explicar la disminución en la expresión de *igfbp1*, así como en sus niveles proteicos
- Dado que estas mujeres no presentaron ninguna complicación de tipo vascular durante y hasta el final del embarazo, y que los análisis de expresión génica y epigenético evidencian alteraciones en pro de preservar una homeóstasis, se propone el siguiente modelo de adecuación homeostático en la angiogénesis placentaria (figura 11).

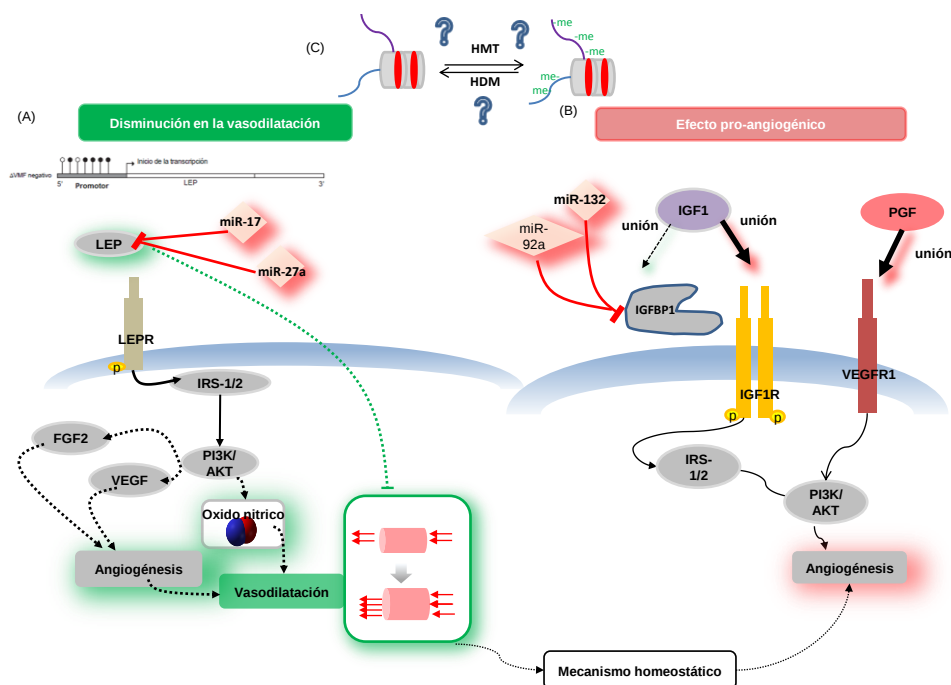


Figura 11. Mecanismo homeostático en la angiogénesis de la placenta de mujeres con Δ VMF negativa. El panel A presenta la vía de leptina y las principales moléculas involucradas en el efecto de esta sobre la angiogénesis y la vasodilatación, así como los mecanismos epigenéticos que estarían disminuyendo su expresión; en la parte superior se aprecia un esquema alusivo a la metilación de la región promotora de leptina, de igual manera se observa como miR-17 y miR-27a estarían disminuyendo su expresión. El panel B muestra la vía IGF1R con la presencia de miR-92a y miR-132 sobreexpresados, controlando la expresión de IGFBP1, permitiendo la liberación de IGF1 favoreciendo su unión al receptor IGF1R, lo que lleva a un incremento en el estímulo angiogénico. El panel C, al centro en la parte superior, señala otro mecanismo epigenético que es la metilación de histonas, algo que aportaría más información a este modelo. Las flechas discontinuas muestran el posible efecto sobre las moléculas que señalan; las flechas continuas indican los pasos y moléculas con evidencia fuerte de estar involucradas; las flechas gruesas señalan uniones fuertes o sobre-expresadas; y las líneas de puntas chatas indican un efecto inhibitorio o con expresión reducida.

7. PERSPECTIVAS

Este estudio muestra la importancia que pueden tener pequeñas variaciones en la función endotelial sobre los mecanismos moleculares que participan activamente en procesos fundamentales para la gestación como es la angiogénesis. El mecanismo homeostático propuesto tras la evidencia encontrada supone una validación con un número mayor de muestras de estas asociaciones identificadas, las cuales sustentan el modelo.

Cabe resaltar que un estudio longitudinal que evalúe la predisposición de estas mujeres al desarrollo de enfermedades crónicas y de tipo vascular, podría brindar mayor conocimiento acerca de los mecanismos que las desencadenan.

8. REFERENCIAS

1. Singh S, Sedgh G, Hussain R. Unintended pregnancy: worldwide levels, trends, outcomes. *Stud Fam Plann* 2010, 41: 241–250.
2. Ness RB, Roberts JM. Epidemiology of pregnancy-related hypertension. In: Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy, edited by Lindheimer MD, Roberts JM, and Cunningham GF. San Diego, CA: Academic, 2009, p. 37-50.
3. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PFA. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010, 88: 31-38.
4. De Onis M. Intrauterine Growth Retardation. 2020 Vision Focus 5 (Health and Nutrition Emerging and Reemerging Issues in Developing Countries),
[<http://www.ifpri.org/sites/default/files/pubs/2020/focus/focus05/focus05.pdf>] [2011].
5. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1:S81-90.
6. Conrad KP. Maternal vasodilation in pregnancy: the emerging role of relaxin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Aug;301(2):R267-75.
7. Chappell LC, Duckworth S, Seed PT, Griffin M, Myers J, Mackillop L, Simpson N, Waugh J, Anumba D, Kenny LC, Redman CW, Shennan AH. Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study. *Circulation*. 2013 Nov 5;128(19):2121-31.
8. Yinon Y, Kingdom JC, Odutayo A, Moineddin R, Drewlo S, Lai V, Cherney DZ, Hladunewich MA. Vascular dysfunction in women with a history of preeclampsia and intrauterine growth restriction: insights into future vascular risk. *Circulation*. 2010 Nov 2;122(18):1846-53.

9. Instituto Nacional de Salud, Observatorio Nacional de Salud, Segundo Informe ONS: Mortalidad 1998-2011 y situación de salud en los municipios de frontera terrestre en Colombia. Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. 2013.
10. Berg CJ, Callaghan WM, Syverson C, and Henderson Z. Pregnancy-Related Mortality in the United States, 1998 to 2005. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 May;117(5):1230.
11. Hilfiker-Kleiner D, & Arany Z. Focus on pregnancy-mediated heart and vascular disease. *Cardiovasc Res*. 2014 Mar 15;101(4):543-4.
12. Weissgerber TL, Davies GA, Tschakovsky ME. Brachial artery flow-mediated dilation is not affected by pregnancy or regular exercise participation. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Oct;121(8):355-65.
13. Saarelainen H, Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Heiskanen N, Lyyra-Laitinen T, Viikari JS, Vanninen E, Heinonen S. Pregnancy related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women. *Circ J* 2006, 70:768–772.
14. Trudinger BJ, Giles WB, Cook CM. Uteroplacental blood flow velocity-time waveforms in normal and complicated pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1985; 92:39–45.
15. North RA, Ferrier C, Long D, Townend K, Kincaid-Smith P. Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 1994; 83:378–386.
16. Jansson T, Powell TL. 2006. IFPA 2005 Award in placentology lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? – a review. *Placenta* 27:S91–S97.
17. Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 2011 32:797–805.
18. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fmslike tyrosine kinase 1

- (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111: 649-658.
19. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642-649.
 20. Chambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA*. 2001 Mar 28;285(12):1607-12.
 21. Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S119-29.
 22. Ming-Huei Cheng, Peng-Hui Wang. Placentation abnormalities in the pathophysiology of preeclampsia. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009 Jan;9(1):37-49.
 23. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update*. 2012 Jul;18(4):436-57.
 24. Escudero C, Celis C, Saez T, San Martin S, Valenzuela FJ, Aguayo C, Bertoglia P, Roberts JM, Acurio J. Increased placental angiogenesis in late and early onset pre-eclampsia is associated with differential activation of vascular endothelial growth factor receptor 2. *Placenta*. 2014 Jan 29. pii: S0143-4004(14)00008-3.
 25. Heidemann BH, & McClure JH. Changes in maternal physiology during pregnancy. *BJA CEPD Reviews* 2003 3 (3): 65-68.
 26. Poston L, Williams DJ. The endothelium in human pregnancy. In vascular endothelium in human physiology and pathophysiology. 2000, eds. P.J.T. Vallance and D.J. Webb. Harwood academic publishers, pp. 247-81.

27. Liu LX, Arany Z. Maternal cardiac metabolism in pregnancy. *Cardiovasc Res.* 2014, 101, 545–553.
28. Dørup I, Skajaa K, Sørensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 2):H821-5.
29. Anumba DOC, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol.* 1999;277:H848–H854.
30. Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 jul 31;7: 79.
31. Rappaport V, Hirata G, Yap HK, Jordan SC. Antivascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162;In press
32. Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Mc Laughlin MK. Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:1025–1034.
33. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004 Feb-Mar;25(2-3):114-26.
34. Cipollone F, Muiesan ML. Flow-mediated vasodilation: improving specificity for endothelial function evaluation. *J Hypertens.* 2013 Feb;31(2):253-5.
35. Gómez O, Figueras F, Fernández S, Bennasar M, Martínez JM, Puerto B, Gratacós E. Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11-41 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Aug;32(2):128-32.
36. Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Capítulo 8, Vasoactivators and Placental Vasoactivity.

37. Fox S., Khong T. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta* 1990 11 59–6.
38. Myatt L. Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta* 1992, 13 329–341
39. Rodríguez I, González M. Physiological mechanisms of vascular response induced by shear stress and effect of exercise in systemic and placental circulation. *Front Pharmacol.* 2014 Sep 16;5:209.
40. Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. *J Vasc Res.* 2009; 46(5):504-12.
41. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-676.
42. Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S10-8.
43. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998, 125:1591-1598.
44. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, et al. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000, 96:271-276.
45. Nicosia RF, Villaschi S. Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1995, 73:658-666.
46. Kaufmann P, Black S, Huppertz. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003, 69:1-7.
47. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol* 2002, 33:1069-1077.

48. Mayhew TM. Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* 2002; 23:742-750.
49. Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 1995; 73:1839–1851.
50. Assheton R. The morphology of the ungulate placenta, particularly the development of that organ in sheep, and notes upon the placenta of the elephant and hyrax. *Phil Trans R Soc Lond Ser B* 1906; 198:143–200.
51. Magness RR. Maternal cardiovascular and other physiological responses to the endocrinology of pregnancy. In: Bazer FW (ed.), *The Endocrinology of Pregnancy*. Totowa, NJ: Humana Press; 1998: 507–539.
52. Meschia G. Circulation to female reproductive organs. En: Shepherd JT, Abboud FM (eds.), *Handbook of Physiology*, sección 2, vol. III, parte 1. Bethesda, MD: American Physiologocal Society; 1983: 241–269.
53. Barcroft J. *Researches in Pre-Natal Life*. Oxford: Blackwell Scientific; 1946.
54. Barcroft J, Barron DH. Observations on the form and relations of the maternal and fetal vessels in the placenta of sheep. *Anat Rec* 1946; 94:569–595.
55. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235(4787):442-7.
56. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 1992;6(3):886-92.
57. Hyder SM, Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol* 1999;13(6):806–11.
58. Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007; 109:257-265.
59. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:550-563.

60. Huppertz B, Peeters LL. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis* 2005; 8:157-167.
61. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38:258-268.
62. Shore VH, Wang TH, Wang CL, et al. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18:657-665.
63. Park JE, Chen HH, Winer J, et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269:25646-25654.
64. Pan Q, Chantry Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007;11, 53–67.
65. Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, et al. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 1996;26(12):1182–5.
66. Torry DS, Wang HS, Wang TH, Caudle MR, Torry RJ. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(6 Pt 1):1539-44.
67. Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IE, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factors characterizes pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106(10):1019-22.
68. Vuorela P, Matikainen MT, Kuusela P, Ylikorkala O, Alitalo K, Halmesmaki E. Endothelial tie receptor antigen in maternal and cord blood of healthy and preeclamptic subjects. *Obstet Gynecol* 1998;92(2):179-83.

69. Rosenfeld CR, Morriss FH, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC. Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. *Gynecol Invest* 1974; 5:252–268.
70. Reynolds LP, Ferrell CL. Transplacental clearance and blood flows of bovine gravid uterus at several stages of gestation. *Am J Physiol* 1987; 253:R735–R739.
71. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81:491–497.
72. Vita JA, Keaney JF Jr. Exercise: toning up the endothelium? *N Engl J Med* 2000; 342:503–505.
73. Germain AM, Romanik MC, Guerra I, Solari S, Reyes MS, Johnson RJ, Price K, Karumanchi SA, Valdés G. Endothelial dysfunction: a link among preeclampsia, recurrent pregnancy loss, and future cardiovascular events?. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):90-5.
74. Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1–H5.
75. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE: Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995, 74:247-253.
76. Silva SY, Villamizar C, Villamizar N, Silva F, Luengas C, Casas JP, Villa-Roel C, López-Jaramillo P: Colombian study to assess the use of noninvasive determination of Endothelium-mediated vasodilation (CANDEV). II. Does location of the occlusion device affects Diagnostic accuracy? *Endothelium* 2005, 12:107-111.
77. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R, International Brachial Artery Reactivity Task Force: International brachial artery reactivity task force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated

- vasodilation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task force. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39:257-265.
78. Ramírez-Vélez R, Romero M, Echeverri I, Ortega JG, Mosquera M, Salazar B, Girón SL, Saldarriaga W, Aguilar de Plata AC, Mateus JC. A factorial randomized controlled trial to evaluate the effect of micronutrients supplementation and regular aerobic exercise on maternal endothelium-dependent vasodilatation and oxidative stress of the newborn. *Trials*. 2011 Feb 28;12:60.
79. Echeverri I, Ortega-Ávila JG, Mosquera M, Castillo A, Jiménez E, Suárez-Ortegon MF, Mateus JC, Aguilar-de Plata C. Relationship between maternal and newborn endothelial function and oxidative stress. *Am J Hum Biol*. 2015 May 6.
80. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: Implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol* 2005; 568:357-369.
81. Parker BA, Ridout SJ, Proctor DN. Age and flow-mediated dilation: A comparison of dilatory responsiveness in the brachial and popliteal arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H3043-H3049.
82. Brandão AH, Pereira LM, Gonçalves AC, Reis ZS, Leite HV, Cabral AC. Comparative Study of Endothelial Function and Uterine Artery Doppler Velocimetry between Pregnant Women with or without Preeclampsia Development. *J Pregnancy*. 2012;2012:909315.
83. Cloonan N, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods* 2008;5:613–619.
84. Nagalakshmi U, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 2008;320:1344–1349.
85. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 2008;5:621–628.

86. Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal Biochem.* 2005 Jan 1;336(1):46-50.
87. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63.
88. Bentley DR., Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, et. al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008;456(7218):53–59.
89. Mercer TR, Clark MB, Crawford J, Brunck ME, Gerhardt DJ, Taft RJ, Nielsen LK, Dinger ME, Mattick JS. Targeted sequencing for gene discovery and quantification using RNA CaptureSeq. *Nat Protoc.* 2014 May;9(5):989-1009.
90. Ledergerber C, Dessimoz C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Brief Bioinform.* 2011 Sep;12(5):489-97.
91. Feng J, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Shirley Liu X, Zhang Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics.* 2012 Nov 1;28(21):2782-8.
92. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 25;102(43):15545-50.
93. Khan F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension.* 2005 Nov;46(5):1123-8.
94. Furchott R, Zawadzki D. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
95. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P.. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in

- atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1986, 315: 1046–1051.
96. Calver A, Collier J, Green D, Vallance P. Effect of acute plasma volume expansion on peripheral arteriolar tone in healthy subjects. *Clin. Sci. Lond.* 1992, 83: 541–547.
 97. Quinton AE, Peek MJ, Cook CM, Kirby A. Flow-mediated dilatation assessment in women with preeclampsia compared to women with gestational hypertension. *Hypertens Pregnancy.* 2012;31(4):377-86.
 98. Sierra-Laguado J, García RG, López-Jaramillo P. Flow-mediated dilatation of the brachial artery in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006, 93, 60—61.
 99. Seeliger C, Brueckmann A, Schleußner E. Maternal endothelial function in the course of pregnancy and postpartum - ultrasound-based longitudinal assessment using flow-mediated dilatation (FMD). *Ultraschall Med.* 2012 Dec;33(7):E126-31.
 100. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004 Jul;93(1):105-13.
 101. Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, Ogata I, Koyama M, Azuma C, Saji F, Murata Y. Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF)- α , but not to IL-6. *Mol Hum Reprod.* 1999 Sep;5(9):885.
 102. Lang I, Pabst MA, Hiden U, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, Desoye G. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 2003 Apr;82(4):163-73.
 103. Dye J, Lawrence L, Linge C, Leach L, Firth J, Clark P. Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition. *Endothelium* 2004;11:151–167.

104. Wang X, Athayde N, Trudinger B. Microvascular endothelial cell activation is present in the umbilical placental microcirculation in fetal placental vascular disease. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:596–601.
105. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J* 1998; 17:5085–5094.
106. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275:26765–26771.
107. Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, Michiels C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* 2003; 278:31277–31285.
108. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277:38205–38211.
109. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5):359-71.
110. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes.* 2003 Dec;52(12):2959-68.
111. Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C982-8.
112. Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by

- fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 May;186(5):1056-61.
113. Martina NA, Kim E, Chitkara U, Wathen NC, Chard T, Giudice LC. Gestational age-dependent expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoforms in human extraembryonic cavities, maternal serum, and decidua suggests decidua as the primary source of IGFBP-1 in these fluids during early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jun;82(6):1894-8.
 114. Khosravi J, Krishna RG, Bodani U, Diamandi A, Khaja N, Kalra B, Kumar A. Immunoassay of serine-phosphorylated isoform of insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-1. *Clin Biochem*, 2007. 40(1-2): p. 86-93.
 115. Westwood M. Role of insulin-like growth factor binding protein 1 in human pregnancy. *Rev Reprod* 1999;4(3):160-7.
 116. Gibson JM, Westwood M, Lauszus FF, Klebe JG, Flyvbjerg A, White A. Phosphorylated insulin-like growth factor binding protein 1 is increased in pregnant diabetic subjects. *Diabetes*, 1999;48(2):321-6.
 117. Cruickshank JK, Heald AH, Anderson S, Cade JE, Sampayo J, Riste LK, Greenhalgh A, Taylor W, Fraser W, White A, Gibson JM. Epidemiology of the insulin-like growth factor system in three ethnic groups. *Am J Epidemiol*, 2001;154(6):504-13.
 118. Wheatcroft SB, Kearney MT. IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, 2009; 20(4):153-62.
 119. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 1995;16:3-34.
 120. Han VKM, Bassett N, Walton J, Challis JRG. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2680-2693.

121. Ritvos O, Ranta T, Jalkanen J, Suikkari AM, Voutilainen R, Bohn H, Rutanen EM. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 1988;122:2150–2157.
122. Rechler MM, Clemmons DR. Regulatory actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 1998 Jul;9(5):176–183.
123. Monzavi R, Cohen P. IGFs and IGFBPs: role in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002 Sep;16(3):433-47.
124. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 1995, 16, 3–35.
125. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts C. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995, 16:143–163.
126. Vincent AM, Feldman EL. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res* 2002, 12:193–197.
127. Wathes DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR. Role of the insulin-like growth factor systems in uterine function and placenta development in ruminants. *Journal of Dairy Science* 1998, 81, 1778–1789.
128. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83:851e7.
129. Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 1990; 63:1267e76.
130. Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, et al: Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-1686.
131. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:201–207.

132. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011 Dec 2;4:51.
133. Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 2001;212:83e91.
134. Basak S, Duttaroy AK. Leptin induces tube formation in first-trimester extravillous trophoblast cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Sep;164(1):24-9.
135. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes.* 2002 Jan;51(1):168-73.
136. Bełtowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Feb;39(2):168-78.
137. Nakagawa K, Higashi Y, Sasaki S, Oshima T, Matsuura H, Chayama K. Leptin causes vasodilation in humans. *Hypertens Res.* 2002 Mar;25(2):161-5
138. Teragawa H, Fukuda Y, Nakagawa K, Higashi Y, Chayama K. Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. *Hypertens Res.* 2003 Feb;26(2):147-52.
139. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 2001, 7, 575–583.
140. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003, 9, 936–943.

141. Ahmed A, Li XF, Dunk C, et al. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995; 12:235-243.
142. Eleftheriades M, Papastefanou I, Lambrinoudaki I, Kappou D, Lavranos D, Akalestos A, Souka AP, Pervanidou P, Hassiakos D, Chrousos GP. Elevated placental growth factor concentrations at 11-14 weeks of gestation to predict gestational diabetes mellitus. *Metabolism*. 2014 Nov;63(11):1419-25.
143. Oura H, Bertoncini J, Velasco P, Brown LF, Carmeliet P, Detmar MA. Critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation. *Blood* 2003;101, 560–567.
144. Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, Failla CM, Zambruno G. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J. Cell Sci.* 2002;115, 2559–2567.
145. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998;273:30336–30343.
146. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007;447:396–398.
147. Ling C, Groop L. Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2009 Dec; 58(12): 2718–2725.
148. Chavan-Gautam P, Sundrani D, Pisal H, Nimbargi V, Mehendale S, Joshi S. Gestation-dependant changes in human placental global DNA methylation levels. *Mol Reprod Dev* 2011, 78:150.
149. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001, 60:5–20.
150. Oyama S The ontogeny of information. En *Developmental systems and evolution*. 2a edición. Raleigh, NC: Duke University Press; 2000.

151. Lins RJ, Mitchell MD. Novel insights into the control of human pregnancy: potential role(s) for epigenetic regulation. *Reproductive Biology Insights* 2008, 1:3–8.
152. Ghildiyal M, and Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 2009; 10, 94–108.
153. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, and Kim, VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125, 887–901.
154. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, and Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436, 740–744.
155. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gatignol A, and Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 2005; 6, 961–967.
156. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, and Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006; 25, 522–532.
157. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009 Mar; 11 (3): 228 – 34.
158. Fu G, Brkić J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci.* 2013 Mar 8;14(3):5519-44.
159. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Feb;204(2):178.e12-21.
160. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2013 May 23;88(5):130.

161. Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. *Sci Signal*. 2009 Jan 6;2(52):pe1.
162. Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, Soutschek J, et al. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 2008 Nov 4;14(5):382–93.
163. Urbich C, Kaluza D, Frömel T, Knau A, Bennewitz K, Boon RA, Bonauer A, Doebele C, Boeckel JN, Hergenreider E, Zeiher AM, Kroll J, Fleming I, Dimmeler S. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1607-16.
164. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh R-F, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 2008 Aug;15(2):272–84.
165. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15:261–71.
166. Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 2008 Feb 1;111(3):1217–26.
167. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:1516-1521.
168. Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 4; 405(1):42-6.
169. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2007;6:5.

170. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, Ji Y, Zhao C, Wang J, Yang BB, Zhang Y. MiRNA directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. PLoS ONE 2006;1:e116.
171. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. J Biol Chem 2008;283:15878-15883.
172. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, Pescatori M, Brioschi M, Kulshreshtha R, Banfi C, Stubbs A, Calin GA, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. J. Biol. Chem. 2009;284, 35134-35143.
173. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M, Ishikawa G, Yoneyama K, Asakura H, Izumi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T. Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. Hypertension. 2012 Feb;59(2):265-73.
174. Patella F, Rainaldi G. MicroRNAs mediate metabolic stresses and angiogenesis. Cell Mol Life Sci. 2012 Apr;69(7):1049-65.
175. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005;435:839–843.
176. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. Nat Genet 2006;38:1060–1065.
177. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. Blood. 2010 Jun 10;115(23):4944-50.

178. Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, Murphy EA, Mukthavaram R, Scheppke L, Huang M, Shields DJ, Lindquist JN, Lapinski PE, King PD, Weis SM, Cheresch DA. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med*. 2010 Aug;16(8):909-14.
179. Anand S, Cheresch DA. MicroRNA-mediated regulation of the angiogenic switch. *Curr Opin Hematol*. 2011 May;18(3):171-6.
180. Jin W, Reddy MA, Chen Z, Putta S, Lanting L, Kato M, Park JT, Chandra M, Wang C, Tangirala RK, Natarajan R. Small RNA sequencing reveals microRNAs that modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2012 May 4;287(19):15672-83.
181. Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad*. 2007 Dec 18;104(51):20350-5.
182. Langenkamp E, Zwiers PJ, Moorlag HE, Leenders WP, St Croix B, Molema G. Vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibition in-vivo affects tumor vasculature in a tumor type-dependent way and downregulates vascular endothelial growth factor receptor 2 protein without a prominent role for miR-296. *Anticancer Drugs*. 2012 Feb;23(2):161-72.
183. Kuehbacher A, Urbich C, Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2008 Jan; 29(1):12–5.
184. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 2007 Apr 27; 100(8):1164–73.
185. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 2006 Nov 1; 108(9):3068–71.

186. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:13944–13949.
187. Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, Johnson JM, Cummins JM, Raymond CK, Dai H, Chau N, Cleary M, Jackson AL, Carleton M, Lim L. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2007;27:2240–2252.
188. Mouillet JF, Chu T, Sadovsky Y. Expression patterns of placental microRNAs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 Aug;91(8):737–43.
189. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafre SA, Farace MG, Agami R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *Embo J*. 2007;26:3699–3708.
190. Zhao B, Zhu Y, Cui K, Gao J, Yu F, Chen L, et al. Expression and significance of PTEN and miR-92 in hepatocellular carcinoma. *Molecular medicine reports*. 2013;7:1413–6.
191. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324(5935):1710–1713.
192. Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*. 2009 Aug 28;10:407.
193. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*. 2010;11(8):R90.

194. Wang W, Feng L, Zhang H, Hachy S, Satohisa S, Laurent LC, Parast M, Zheng J, Chen DB. Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun;97(6):E1051-9.
195. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH. MiR-21 Induced Angiogenesis through AKT and ERK Activation and HIF-1 α Expression. *PLoS One* 2011;6[4]: e19139.
196. Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN, Wang S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc Natl Acad Sci* 2011 May 17;108[20]:8287-8292.
197. Quintavalle M, Elia L, Condorelli G, &Courtneidge SA. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol* 2010;189:13–22.
198. Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, Hu Y. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *Am J Obstet Gynecol* 2010 May;202[5]:466.
199. Small EM, Sutherland LB, Rajagopalan KN, Wang S, Olson EN. MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ Res* 2010 Nov 26;107[11]: 1336–1344.
200. Orr-Urtreger A, Avivi A, Zimmer Y, Givol D, Yarden Y, Uonai P. Developmental expression of c-kit, a protooncogene encoded by the W locus, *Development* 1990; 109:911-923
201. Motro B, Der Kooy DV, Rossant J, Reith A, Bernstein A. Contiguous pattern of ckit and steel expression: analysis of mutation at the Wand Sl loci, *Development* 1991; 113:1207-1221
202. Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Kaneko Y, Iwai M, Nakayama H, Mori T. Expression of c-kit protein during placental development. *Biol Reprod.* 1992 Oct;47(4):614-20.

203. Dahl C, Abildgaard C, Riber-Hansen R, Steiniche T, Lade-Keller J, Guldberg P. KIT is a frequent target for epigenetic silencing in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2015 Feb;135(2):516-24.
204. Enguita-Germán M, Gurrea M, Schiapparelli P, Zhu TS, Crowley JG, Hamm LL, Costello MA, He X, Talsma CE, Flack CG, Hervey-Jumper SL, Heth JA, Muraszko KM, Rey JA, Fan X, Castresana JS. KIT expression and methylation in medulloblastoma and PNET cell lines and tumors. *J Neurooncol.* 2011 Jun;103(2):247-53.
205. Chen Z, Pan X, Yao Y, Yan F, Chen L, Huang R, Ma G. Epigenetic regulation of cardiac progenitor cells marker c-kit by stromal cell derived factor-1 α . *PLoS One.* 2013 Jul 24;8(7):e69134.
206. Bouchard L, Thibault S, Guay SP, et al. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:2436-41.
207. Marchi M, Lisi S, Curcio M, et al. Human leptin tissue distribution, but not weight loss dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics* 2011;6:1198-206.
208. Lesseur C, Armstrong DA, Paquette AG, Li Z, Padbury JF, Marsit CJ. Maternal obesity and gestational diabetes are associated with placental leptin DNA methylation. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Dec;211(6):654.e1-9.
209. Lea RG, Howe D, Hannah LT, Bonneau O, Hunter L, Hoggard N. Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2000 Aug;6(8):763-9.
210. Islami D, Bischof P, Chardonens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod.* 2003 Jul;9(7):395-8.
211. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007 Jul 15; 23:175–205.
212. Lee D-C, Romero R, Kim J-S, Tarca AL, Montenegro D, Pineles BL, et al. miR-210 targets iron-sulfur cluster scaffold homologue in human

- trophoblast cell lines: siderosis of interstitial trophoblasts as a novel pathology of preterm preeclampsia and small-for-gestational-age pregnancies. *Am J Pathol* 2011 Aug;179(2):590–602.
213. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010 Oct;2(4):161–79.
 214. Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med*. 2012 Feb;16(2):249–59.
 215. 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 Mar;196(3):261.e1–6.
 216. Luo L, Ye G, Nadeem L, Fu G, Yang BB, Honarparvar E, et al. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *J Cell Sci* 2012 Jul 1; 125(Pt 13):3124–32.
 217. Wang Y, Fan H, Zhao G, Liu D, Du L, Wang Z, et al. MiR-16 inhibits the proliferation and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells in severe pre-eclampsia. *FEBS J*. 2012;279:4510–24.
 218. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci*. 2011 Jan;18(1):46–56.
 219. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res Int* 2013 Jan;2013:970265.
 220. Chen D, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod* 2013 May;88(5):130.
 221. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell*. 2009 Sep;35(6):856–67.

222. Takizawa T, Ishibashi O, Ohkuchi A, Moksed Ali M, Kurashina R, Luo SS, et al. Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: A novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension*. 2012;59:265–73.
223. Dai Y, Qiu Z, Diao Z, Shen L, Xue P, Sun H, et al. MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1. *Placenta*. 2012;33:824–9.
224. Doridot L, Houry D, Gaillard H, Chelbi ST, Barbaux S, Vaiman D. miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics* 2014 Jan;9(1):142–51.
225. Hong F, Li Y, Xu Y. Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *J Int Med Res*. 2014 Dec;42(6):1243–51.
226. Cindrova-Davies T, Herrera EA, Niu Y, Kingdom J, Giussani DA, Burton GJ. Reduced cystathionine γ -lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator. *Am J Pathol* 2013 Apr;182(4):1448–58.
227. Maccani MA, Padbury JF, Marsit CJ. miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS One*. 2011;6.
228. Kotlabova K, Doucha J, Hromadnikova I. Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol Elsevier* 2011 May 5;89(2):185–91.
229. Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Nelson DM, Parks WT, Sadovsky Y. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta* 2010 Sep;31(9):781–4.
230. Ventura W, Koide K, Hori K, Yotsumoto J, Sekizawa A, Saito H, et al. Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in

- early pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013 Jul;169(1):28–32.
231. Zou C, Xu Q, Mao F, Li D, Bian C, Liu LZ, Jiang Y, Chen X, Qi Y, Zhang X, et al. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle*. 2012 Jun 1; 11(11): 2137–2145.
 232. Viesti A Collares R, Salgado W Jr, Pretti da Cunha Tirapelli D, dos Santos JS. The expression of LEP, LEPR, IGF1 and IL10 in obesity and the relationship with microRNAs. *PLoS One*. 2014 Apr 1;9(4):e93512.
 233. Gratton RJ, Asano H, Han VK. The regional expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) in the placentae of women with pre-eclampsia. *Placenta* 2002 Apr;23(4):303-10.
 234. Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1997;176(4): 751-8.
 235. Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(5):426e36.
 236. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(4):304e13.
 237. Lanoix D, St-Pierre J, Lacasse AA, Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark. *Placenta*. 2012 Mar;33(3):151-6.

ANEXOS

Anexo Tabla 1. Porcentajes de metilación de las regiones promotoras de genes involucrados en angiogénesis.

Símbolo	ΔVMF positivo	ΔVMF positivo	ΔVMF negativo	ΔVMF negativo
SIRT1	0,45%	0,11%	1,27%	0,77%
FGF2	0,70%	0,15%	0,67%	6,32%
TIMP2	0,00%	0,00%	0,55%	0,00%
NRP1	0,00%	0,06%	0,55%	0,24%
LEP	1,58%	36,78%	76,24%	58,35%
KIT	0,00%	0,03%	66,88%	52,90%
FGFR1	0,00%	0,00%	0,15%	0,22%
FLT1	0,20%	0,07%	2,34%	0,35%
FSCN1	0,00%	0,00%	0,79%	0,40%
KDR	0,10%	60,78%	0,10%	51,84%
LEPR	1,25%	0,71%	4,40%	23,40%

Anexo Tabla 2. Genes con transcriptos codificantes que se presentan con baja expresión y que a su vez son blanco predictivo de al menos un angiomiR sobre-expresado en estas mismas muestras.

Genes codificantes con baja expresión	angiomiRs que los regulan
DCTD	miR-145
VEGFA	mirR-16,17,23a
KCNK9	miR-16
NUAK1	miR-23a,145
CDH12	miR-17,145
FAM53A	miR-17
DMKN	miR-27a
SLITRK2	miR-16,17,23a,27a
ABLIM2	miR-17,23a,92a,145
CNR1	miR-17,23a,27a,132,145
DNAH11	miR-132
PRUNE2	miR-17,23a,145
RET	miR-16,23a,27a,92a,132
HDAC4	miR-378
CACNA2D4	miR-16,23a,378
TMPRSS4	miR-16,27a,145
ATP8B3	miR-92a
HSPA6	miR-17
CEP72	miR-378
MCF2L	miR-17,145,378
ADRA1A	miR-92a,132,145
PRDM16	miR-27a
PAX1	miR-17
CACNA1B	miR-16,132
HNF1A	miR-17
PLAT	miR-17
TCEA3	miR-145,378
DLX1	miR-23a,27a,132,378
KCNG3	miR-16,145
THBS2	miR-17,27a,132
ZBTB42	miR-27a,145,378
LEP	miR-17,27a
PLXNB3	miR-16
GPR17	miR-132
NCOA7	miR-23a,27a,92a,145
ELFN1	miR-92a

AJAP1	miR-17,23a
CNKSR2	miR-23a,27a,92a
ECEL1	miR-132
ANK1	miR-27a
KREMEN2	miR-16
SLC45A1	miR-23a
GLIPR1L1	miR-17
DCAF12L1	miR-23a
FCGR2C	miR-16,145
POMC	miR-27a
HLA-DRB5	miR-378
ERN2	miR-16,23a
ARHGEF4	miR-16
RAG2	miR-92a
NKAIN4	miR-92a
SPTBN4	miR-378
SLC8A2	miR-378
BTNL9	miR-16,17,92a
SLC2A4	miR-17
AVPR1A	miR-17
AVPR2	miR-17
EGR3	miR-23a,27a
PCDH8	miR-23a,92a
CCR5	miR-132
DMD	miR-16,27a,132
LINGO3	miR-132
NR4A2	miR-17,27a,132,145
KLHL13	miR-23a,132
IL25	miR-16,17
HOXD10	miR-23a,27a,92a
GPR144	miR-92a,132
BRSK2	miR-16,17,23a
GZMA	miR-132
KCNJ11	miR-16
SLC12A3	miR-17
CELSR1	miR-16,23a,132,145
APOA4	miR-16
IGFBP1	miR-92a,132
