



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO DE LA DIABETES
GESTACIONAL EN EL TRANSPORTE PLACENTARIO DE
NUTRIENTES AL FETO

D^a. María Ruiz Palacios

2015

Esta tesis ha sido dirigida por

Prof. Dra. Elvira Larqué Daza

Departamento de Fisiología, Facultad de Biología

Universidad de Murcia, España

Prof. Dr. Antonio José Ruiz Alcaraz

Departamento de Bioquímica .y Biología molecular B e inmunología.

Universidad de Murcia, España

Prof. Dra. María Sánchez-Campillo Muñoz

Departamento de Bioquímica .y Biología molecular B e inmunología.

Universidad de Murcia, España

A mi padre

A mi madre

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de las siguientes entidades:

HERO España S.A. financió el proyecto titulado "Transferencia de Ácidos Grasos en Embarazadas con Diabetes Gestacional y Beneficios en el Neonato"

Fundación Séneca (Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia),

ESPGHAN Pediatric Nutrition Award for Young Investigators (Budapest 2009).

Título del proyecto: "Fatty Acid Transfer in Gestational Diabetes and Neurodevelopment Evaluation of Neonates"

INDICE:

I. INTRODUCCIÓN	1
1. GDM: CONCEPTO Y PREVALENCIA	3
2. FACTORES DE RIESGO.	6
3. REPERCUSIONES DE LA GDM EN LA MADRE Y EN EL FETO.	7
3.1. Repercusiones en la madre	7
3.2. Repercusiones en el feto	7
3.2.1. Macrosomía fetal.....	8
3.2.2. Adiposidad fetal.....	9
3.2.3. Implicaciones neurológicas en el feto	10
4. ADAPTACIONES METABÓLICAS EN EMBARAZO Y GDM.	11
4.1. Adaptaciones en el metabolismo de carbohidratos	11
4.2. Alteraciones en el metabolismo lipídico	12
4.3. Alteraciones en el metabolismo de aminoácidos	13
4.4. Perfil de citoquinas en la GDM	14
4.4.1. Leptina.....	15
4.4.2. Interleucina 6 (IL-6) y resistina	16
4.4.3. Adiponectina.....	16
4.4.4. TNF α	17
5. ESTRUCTURA PLACENTARIA Y ALTERACIONES EN GDM	18
6. TRANSFERENCIA PLACENTARIA DE GLUCOSA AL FETO	20
7. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA EN LA PLACENTA.	22
7.1. Ruta PI3K-Akt-mTOR.....	25
7.2. Ruta Ras-ERK	28
8. RESISTENCIA A LA INSULINA EN PLACENTAS DE MUJERES CON GDM.	29
9. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS GRASOS AL FETO y ALTERACIONES EN GDM	32
9.1. Captación y transporte de ácidos grasos por la placenta.....	33
9.1.1. Lipasas placentarias.....	33
9.1.2. Proteínas transportadoras de membrana	36
9.1.3. Transporte intracelular de ácidos grasos en placenta	38
9.1.4. Transporte de ácidos grasos a la circulación fetal	38
9.1.5. MFSD2A.....	39
9.2. Regulación del transporte de ácidos grasos.....	40
9.2.1. Relación entre los mediadores moleculares de la ruta de la insulina y transportadores de ácidos grasos.	41

10. TRANSFERENCIA DE AMINOÁCIDOS AL FETO EN EMBARAZOS NORMALES Y EN EMBARAZOS CON GDM.....	42
10.1. Transporte de aa en GDM.....	45
10.2. Regulación del transporte de aa: Papel de mTOR.....	46
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	49
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	51
III. MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. SUJETOS.....	55
2. OBTENCIÓN DE DATOS.....	57
2.1 Historia clínica.....	57
2.2 Cuestionario dietético	57
2.3 Ecografía obstétrica.....	58
2.4 Reconocimiento del recién nacido	58
3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	58
4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	59
4.1 Bioquímica general.....	59
4.2 Insulina y HOMA	60
4.3 Ácidos grasos	60
4.3.1 Extracción de lípidos del suero	60
4.3.2 Extracción de lípidos de la placenta.....	61
4.3.3 Metilación de los ácidos grasos.....	62
4.3.4 Análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.....	62
4.4 Cuantificación de lisofosfolípidos (LP)	63
4.5 Cuantificación de aminoácidos.....	63
4.6 Análisis de citoquinas.....	63
5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS Y MEDIADORES DE LA INSULINA MEDIANTE WESTERN BLOT	64
5.1 Cuantificación de proteínas	64
5.2 Electroforesis	65
5.3 Transferencia de proteínas y detección inmunoquímica.....	68
6. LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	70
6.1 Subcultivo	71

6.2 Determinación de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul Tripán.....	71
6.3 Autenticación de la línea celular BeWo.....	72
6.4 Estimulación de células BeWo con insulina e inhibidores de la vía señalización de la insulina.....	72
6.5 Análisis por Western blot de mediadores de la insulina y de proteínas transportadoras de ácidos grasos.....	75
7. ESTADÍSTICA.....	76
IV. RESULTADOS.....	77
1. DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS.....	79
2.1 Características antropométricas de la madre.....	79
2.2 Medidas ecográficas y biometría fetal.....	80
2.3 Medidas antropométricas de los recién nacidos.....	82
2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LA MADRE (RECLUTAMIENTO Y PARTO) Y DEL RECIÉN NACIDO.....	86
2.1 Parámetros glucídicos.....	86
2.2 Parámetros lipídicos.....	88
2.3 Adipoquinas.....	97
3. PLACENTA.....	100
3.1 Estructura placentaria.....	100
3.2 Proteínas transportadoras de ácidos grasos en placenta.....	102
3.3 MFSD2a.....	105
3.4 Asociación de transportadores placentarios con peso materno, parámetros de adiposidad fetal y grosor placentario.....	107
3.5 Asociación de transportadores placentarios lipídicos y metabolismo glucídico.....	109
4. ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO DE LA INSULINA SOBRE LOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS GRASOS.....	115
5. EFECTOS EN LA TRANSFERENCIA METERNO-FETAL DE AA.....	119
5.1 Perfil de aminoácidos en suero materno en el momento del parto.....	119
5.2 Perfil de aminoácidos en el niño (aa en suero venoso umbilical).....	122
5.3 Perfil de aminoácidos en placenta.....	125
V. DISCUSIÓN.....	131
1. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LA MADRE Y DE LOS FETOS.....	134
2. GLUCEMIA E INSULINA EN LA MADRE Y EN LOS RECIÉN NACIDOS.....	136

3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS.....	138
4. PARÁMETROS LIPÍDICOS.....	141
4.1 Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos totales.....	141
4.2 Lisofosfolípidos.....	143
5. ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN PLACENTARIAS	144
5.1 Transportadores placentarios de ácidos grasos	146
5.2 Mediadores de la ruta de señalización de la insulina en placenta	149
5.3 Relación entre la insulina y el metabolismo de lípidos en la placenta..	152
5.4 Transporte de glucosa en placenta	156
5.5 Transporte de aminoácidos en placenta	156
VI. CONCLUSIONES	161
VII. BIBLIOGRAFÍA	165
BIBLIOGRAFÍA	167
VIII. ANEXO.....	191

ABREVIATURAS

GDM	Diabetes Mellitus Gestacional
IUGR	Crecimiento intrauterino retardado
IDDM	Diabetes mellitus insulinodependiente
NICE	National Institute for Health and Care Excellence
ADA	Asociación Americana de Diabetes
IADPSG	Grupos de estudio de la Asociación Internacional de Diabetes y Embarazo"
WHO	Organización Mundial de la Salud
HAPO	The hyperglycemia and Adverse Pregnancy outcome
LGA	Large for gestational age
CA	Circunferencia abdominal
HOMA	Homeostasis model of assessment (for insulin resistance)
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
TNF α	Factor de necrosis tumoral
IL-6	Interleucina 6
GH	Hormona de crecimiento
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
MVM	Membrana microvellositaria
BM	Membrana basal
SCTB	Sincitiotrofoblasto
TEMED	Tetrametiletildiamina

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
APS	Persulfato amónico
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TG	Triglicéridos
AG	Acidos grasos
NEFAs	Ácidos grasos no esterificados
LC-PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
DHA	Ácido docosahexaenoico
AA	Ácido araquidónico
PL	Fosfolípidos
Liso-PL	Lisofosfolípidos
LPC	Lisofosfatidilcolina
EC	Ésteres de colesterol
QM	Quilomicrones
LPL	Lipoproteín Lipasa
EL	Endotelial lipasa
FABPpm	Fatty acid binding protein plama membrane
FAT/CD36	Fatty acid translocase
FATP	Fatty acid transport protein
FABP	Fatty acid binding proteins
FABP4 o A-FABP	Adipocyte FABP
LD	Lipid droplets

MFSD2A	Major facilitator superfamily domain-containing protein 2A
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptors
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustratos del receptor de insulina
PI3K	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase o PI3 kinasa
Akt	Proteín Kinasa B
ERK	Extracellular-signal-regulated Kinase
PIP-3	Fosfoinositol-3,4,5 fosfato
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
S6K	Proteína ribosomal Kinasa
4E-BP1/2	Proteína de unión al factor eucariótico de iniciación 4
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLr	Receptor de lipoproteína de baja densidad
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VLDLr	Receptor de lipoproteína de muy baja densidad

I. INTRODUCCIÓN

1. GDM: CONCEPTO Y PREVALENCIA

La diabetes mellitus gestacional (GDM) es una de las complicaciones más comunes del embarazo, y se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo (Metzger y Coustan 1998). Dicha intolerancia es debida a un aumento de la resistencia a la insulina por la acción de las hormonas placentarias y una inadecuada secreción pancreática de insulina para compensarla, lo que lleva a una hiperglicemia e hiperinsulinemia. Además, en mujeres que padecen esta patología aumenta el riesgo de desarrollar una diabetes tipo 2 después del embarazo, y lo que es más importante, aumenta el riesgo de padecer obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico en la descendencia (Buchanan y Xiang 2005).

En los últimos años, la incidencia de la GDM ha aumentado exponencialmente en la mayor parte de los países, debido al aumento exponencial de la obesidad a nivel mundial (Jensen *et al.*, 2001). La gran variabilidad en cuanto a la tasa de prevalencia de la GDM a nivel mundial (1-18%) se debe principalmente a la falta de consenso en cuanto a los criterios diagnósticos de esta, aunque incuestionablemente la etnia y región geográfica también influyen. En Europa varía del 2% en el norte, a más del 10% en el sur, siendo la prevalencia mucho mayor en el litoral mediterráneo (Buckley *et al.*, 2012).

Los primeros criterios para el diagnóstico de la GDM fueron establecidos hace más de 40 años, y a pesar de ello siguen siendo utilizados en la actualidad (O'Sullivan y Mahan 1964). Posteriormente se emplearon los clásicos "criterios de la *National Diabetes Data Group*" (NDDG 1979) (Tabla 1), hasta que fueron sustituidos por los criterios de Carpenter y Coustan (Carpenter y Coustan 1982), (basal: 95 mg/dl; 1h: 180 mg/dl; 2h: 155 mg/dl; 3h: 140 mg/dl) con los que al bajar los puntos de corte aumentó la prevalencia (Tabla 1). Con el paso de los años diferentes instituciones han ido proponiendo nuevos criterios diagnósticos de la GDM, de entre los cuales los de la

INTRODUCCIÓN

Asociación Americana de Diabetes (ADA) han sido los más empleados, a pesar de que estos se han ido modificando a lo largo de los años (ADA 1987, 2014).

En España, el estudio de prevalencia más destacado es el Estudio Multicéntrico Español; un estudio prospectivo, multicéntrico, que incluyó los datos de 16 hospitales del Servicio Nacional de Salud desde los años 2002 a 2005, con 9270 gestantes principalmente españolas, aunque también incluyó algunas africanas, asiáticas y caribeñas (Ricart *et al.*, 2005). Según este estudio, la prevalencia de la GDM sería del 8.8% aplicando los criterios de la NDDG (Criterios diagnósticos clásicos del grupo de diabetes nacional), y del 11.6% según los nuevos criterios propuestos por Carpenter y Coustan (C&C).

Sin embargo, recientemente han cobrado gran fuerza los criterios propuestos por los "Grupos de estudio de la Asociación Internacional de Diabetes y Embarazo" (IADPSG), según los cuales la prevalencia de la GDM a nivel global aumenta hasta un 18% (Metzger *et al.*, 2010). Además, según un estudio, la prevalencia de GDM en la mujer mediterránea aumenta hasta un 26.6% según dichos criterios, en contraposición del 8.7% aplicando los criterios de la ADA (Savona-Ventura *et al.*, 2012). En un estudio reciente realizado en Madrid, que incluyó 3276 mujeres, la prevalencia aumenta a un 35.5% aplicando los criterios de la IADPSG con respecto a un 10.6% aplicando los criterios de Carpenter y Coustan (Duran *et al.*, 2014).

Debido a su mayor sensibilidad para detectar mujeres con alto riesgo de padecer GDM, los criterios de la IADPSG han sido adoptados por la Asociación Americana de Diabetes (ADA 2014) y por la Organización Mundial de la Salud (WHO 2014). Sin embargo, no han sido respaldados por los Institutos Nacionales de Salud en USA (Vandorsten JP 2013), ni por el NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*) en el Reino Unido (NICE 2013), debido a su preocupación por los costes y por la poca evidencia sobre los beneficios de tratar GDM ante unos umbrales tan bajos. De hecho, se han propuesto recientemente, por la NICE, unos nuevos criterios para el diagnóstico de la GDM, basados también en una carga oral de glucosa de 75 g (Tabla 1). No obstante, en un estudio reciente, el grupo de Meek al analizar características obstétricas y neonatales de mujeres que eran positivas para GDM según los criterios de

la IADPSG pero negativas con los criterios de la NICE, han demostrado que los criterios de la IADPSG son capaces de identificar mujeres con alto riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con la GDM, a diferencia de los criterios de la NICE, con los que no se identificaron a estas mujeres (Meek *et al.*, 2015). Por consiguiente, parece que todavía no es posible llegar a un consenso internacional sobre los criterios adecuados para el diagnóstico de la GDM. En la tabla 1 se muestra un resumen de los criterios diagnósticos actualmente más empleados para el diagnóstico de la GDM (Tabla 1). En la región de Murcia, la estrategia diagnóstica consta de dos etapas: primero se realiza una prueba de cribado mediante el test de O'Sullivan en la semana 24 a 28 de embarazo y si ésta resulta positiva (Glucosa \geq 140 mg/dl 1 hora tras administración sobrecarga 50 g glucosa) se realiza una prueba diagnóstica mediante sobrecarga oral de 100 g de glucosa y control de glucemia en las siguientes 3 horas según los criterios de la National Diabetes Data Group. Sin embargo, en la mayor parte de las comunidades autónomas de España se emplean los criterios de Carpenter y Coustan (Buckley *et al.* 2012).

Tabla 1. Criterios diagnósticos para la detección de la GDM.

	National diabetes data group Criteria	IADPSG Criteria (WHO y ADA)	NICE 2015 Criteria
Carga oral de glucosa	100 g glucosa	75 g glucosa	75 g glucosa
Glucosa materna en ayunas	105	92	101
1 hora	190	180	
2 horas	165	153	140
3 horas	145		

Los valores de glicemia están expresados en mg/dl (máximos valores por encima de los cuales los resultados son considerados anormales).

IADPSG International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups.

NICE (National Institute for Health and Care Excellence).

WHO (World health organization).

INTRODUCCIÓN

2. FACTORES DE RIESGO.

En los últimos años está aumentando muchísimo la prevalencia de la GDM debido fundamentalmente al aumento en la edad de las mujeres embarazadas y al aumento exponencial de la obesidad (Guariguata *et al.*, 2014). El 40% de las mujeres en edad reproductiva padecen **sobrepeso u obesidad** (Yeh y Shelton 2005), lo que se traduce en un aumento de la resistencia a la insulina que probablemente desencadenará el desarrollo de una diabetes gestacional. De hecho, un estudio reciente mostró que más del 70% de todas las mujeres con GDM presentaban sobrepeso u obesidad (Shin y Yoon 2010). Es por ello que la obesidad y el sobrepeso se consideran los factores de riesgo más comunes para desarrollar la GDM.

Al igual que la obesidad y el sobrepeso, existen otros factores de riesgo no modificables como son la **alta paridad**, la **etnia** (mayor prevalencia de GDM en afroamericanas y nacidas en países del sureste asiático), la historia familiar de **diabetes mellitus**, y el **síndrome de ovario poliquístico** (Petry 2010; Solomon *et al.*, 1997). Además, según estudios recientes, el **bajo peso de la madre al nacer** (Ogonowski *et al.*, 2014), la **ganancia de peso** durante la adolescencia y la **obesidad central materna** también se consideran factores de riesgo para desarrollar GDM (Yeung *et al.*, 2010).

Sin embargo también existen factores de riesgo que son modificables como **antecedentes de macrosomía fetal** (>4000 g) en gestaciones previas, presencia de **GDM en gestaciones previas** (Petry 2010), **inactividad física** (Chasan-Taber *et al.*, 2008), **dieta baja en fibra y alta en azúcares** (Zhang *et al.*, 2006), excesiva **ganancia de peso** durante el embarazo (Hedderson *et al.*, 2010) y **estrés** durante el embarazo (Silveira *et al.*, 2014). Además, Cullinan *et al.* postulan la existencia de un fuerte gradiente socioeconómico en la prevalencia de la GDM (Cullinan *et al.*, 2012), mientras que Abouzeid *et al.* afirman que estos gradientes económicos solo son evidentes en las mujeres de mayor edad, y no en las jóvenes (Abouzeid *et al.*, 2015).

Sorprendentemente, el sexo fetal está involucrado en los resultados del embarazo de forma que ha sido propuesto que el riesgo de la madre a padecer GDM es mayor cuando **el feto es de sexo masculino** (Retnakaran y Shah 2015; Sheiner *et al.*, 2004), justificando así que la GDM puede ser afectada por el sexo del bebé, como ya fue propuesto por otros autores (Buckberry *et al.*, 2014; Sood *et al.*, 2006).

3. REPERCUSIONES DE LA GDM EN LA MADRE Y EN EL FETO.

3.1. Repercusiones en la madre

Las mujeres con GDM presentan mayor riesgo de padecer preeclampsia (hipertensión materna durante el embarazo), debido en parte a la alta resistencia a la insulina (Carpenter 2007; Yogev *et al.*, 2004). Incluso las pacientes con ligera intolerancia a la glucosa o con GDM presentan mayor riesgo de sufrir alteraciones hipertensivas durante el embarazo (Jensen *et al.* 2001; McLaughlin *et al.*, 2006).

La GDM tiene además implicaciones posteriores al parto, tales como mayor probabilidad de volver a sufrir esta patología en el siguiente embarazo. Además, dado que el 70% de las mujeres con GDM presentan obesidad y sobrepeso, se ha demostrado que el peso pregestacional de las madres está correlacionado con el riesgo de sufrir GDM en embarazos posteriores (MacNeill *et al.*, 2001).

Las mujeres con GDM presentan mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares después del embarazo que aquellas con niveles de glucosa normales durante el embarazo (Bellamy *et al.*, 2009). Además, este riesgo aumenta progresivamente con el paso de los años (Feig *et al.*, 2008), de tal forma que de todas las mujeres que presentan diabetes tipo 2, un porcentaje bastante alto de ellas (10-31%) sufrieron GDM previamente (Cheung y Byth 2003).

3.2. Repercusiones en el feto

La diabetes gestacional conlleva numerosos riesgos para los neonatos, tanto a corto como a largo plazo. De hecho, los fetos de madres con GDM tienen un riesgo mayor de muerte intrauterina, sobre todo en los casos que requieren insulina para el control glicémico (Girz *et al.*, 1992). Además, después del nacimiento, estos niños también presentan mayor riesgo de morbilidad (Blank *et al.*, 1995).

El estudio HAPO (*The hyperglycemia and Adverse Pregnancy outcome*), realizado a gran escala (25000 mujeres aproximadamente), demuestra que los riesgos adversos maternos, fetales y neonatales incrementan de manera continua en función de los niveles de glucosa materna, incluso en rangos considerados normales para el embarazo (Metzger *et al.*, 2008).

INTRODUCCIÓN

Así pues, los niveles de glucosa se correlacionan fuertemente con resultados adversos tales como macrosomía fetal, peso al nacer por encima del percentil 90 (LGA, *large for gestational age*), aumento de la tasa de cesárea (asociación más débil), hipoglicemia neonatal (asociación menos fuerte) y péptido C en suero de cordón por encima del percentil 90 (indicador de hiperinsulineamia fetal). La hiperglucemia materna también se correlaciona con resultados secundarios adversos del embarazo tales como parto prematuro, distocia muscular, daño al nacer, cuidados intensivos neonatales e hiperbilirrubinemia. Además existen otros factores de riesgo en los niños nacidos de madres con GDM, tales como cardiomiopatía (deterioro de la función del músculo cardíaco), hipomagnesemia y policitemia (aumento del número de glóbulos rojos circulantes)(Metzger *et al.* 2008; Reece *et al.*, 2009). No obstante, una de las principales características de la GDM es la macrosomía fetal.

3.2.1. Macrosomía fetal

La macrosomía fetal es la complicación más común relacionada con la GDM. Usualmente se considera macrosomía cuando el peso fetal al nacer está por encima de 4000 g, sin tener en cuenta la edad gestacional. Si se tiene en cuenta la edad gestacional se denominan LGA cuando los niños sobrepasan el percentil 90 de peso al nacimiento (Mikolajczyk *et al.*, 2011). Además, este sobrecrecimiento fetal que ocurre en la GDM aumenta la incidencia de sufrir desproporción cefalopélvica, ruptura uterina, distocia de los hombros en el parto y laceraciones perineales en estas mujeres (Jastrow *et al.*, 2010).

Numerosos estudios han demostrado una asociación directa entre los niveles de glucosa maternos y la macrosomía fetal (Ferrara *et al.*, 2007; Jensen *et al.* 2001). De forma paralela, todos los estudios HAPO afirman una fuerte correlación entre el aumento progresivo de los niveles de glucosa maternos y el peso al nacer por encima del percentil 90 (Catalano *et al.*, 2012), aún cuando los niveles de glucosa son más bajos que los usados para diagnosticar GDM.

Según la hipótesis de Pedersen, clásicamente aceptada, la hiperglicemia materna lleva a una hiperglicemia fetal que se traduce en hiperinsulinemia, responsable por tanto del crecimiento fetal excesivo (Pedersen 1952). Sin embargo, se ha observado

macrosomía fetal en embarazos con los niveles de glucosa controlados (Tallarigo *et al.*, 1986), lo cual indica que hay otros factores, aparte de la hiperglicemia materna, que estarían contribuyendo a este sobrecrecimiento fetal. Así pues, la macrosomía fetal y LGA han sido correlacionados positivamente con los niveles de triglicéridos en el tercer trimestre en mujeres embarazadas con un buen control glucémico, independientemente de la obesidad (Kitajima *et al.*, 2001). Por otro lado, algunos estudios postulan un aumento en la transferencia materno-fetal de aminoácidos en mujeres con GDM incluso cuando el control metabólico es estricto y los niveles de glucosa están dentro del rango normal (Cetin *et al.*, 2005).

Por todos estos motivos, la teoría de Freinkel está cobrando aceptación, ya que postula que no solo la glucosa, sino también los lípidos y los aminoácidos podrían ser los responsables del sobrecrecimiento de los fetos, jugando un papel muy importante los mecanismos que regulan la transferencia de estos nutrientes al feto (Herrera *et al.*, 1991). Por supuesto, la placenta también juega un papel muy importante en la GDM y por tanto en la macrosomía fetal, ya que se han demostrado cambios en la estructura y metabolismo placentarios en la GDM que alteran el transporte de nutrientes al feto.

Además de las consecuencias a corto plazo que tiene la macrosomía, ya mencionadas anteriormente, existen consecuencias a largo plazo en estos neonatos, tales como aumento de la probabilidad de padecer sobrepeso u obesidad y diabetes mellitus tipo II (TD2M) en la adolescencia y en la edad adulta (Pettitt *et al.*, 1993; Whincup *et al.*, 2008). Los niños nacidos con macrosomía tiene mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico en la infancia, adolescencia y/o en la edad adulta (Guerrero-Romero *et al.*, 2010; Harder *et al.*, 2009). De hecho, el desarrollo de síndrome metabólico durante la infancia predispone a padecer TD2M a los 25-30 años de edad (Morrison *et al.*, 2008). Además, los neonatos de madres con GDM tienen mayor riesgo de padecer diabetes mellitus tipo I (Harder *et al.* 2009), y un peor desarrollo neurológico (Rizzo *et al.*, 1997).

3.2.2. Adiposidad fetal

Catalano *et al.* demostraron que los niños de madres con GDM presentan una mayor grasa corporal (adiposidad neonatal) que los niños de madres sanas, aún

INTRODUCCIÓN

cuando no presentan macrosomía (Catalano *et al.*, 2003). Este aumento de grasa corporal que ocurre en niños nacidos de madres GDM es independiente del peso corporal fetal, lo que indica que las alteraciones en la adiposidad fetal es un proceso clave para entender el fenotipo de la GDM. Por todo ello, la adiposidad ha pasado a ser un factor de riesgo a tener en cuenta para diagnosticar la GDM. De hecho, el estudio HAPO 2008 demostró una fuerte correlación entre el aumento de los niveles de glucosa materna y la adiposidad fetal. Además, este estudio también muestra una correlación continua entre dicha adiposidad fetal y los niveles de insulina fetal, medidos en base al péptido C en el suero del cordón, sugiriendo esto que la relación glicemia materna/adiposidad fetal está mediada por la insulina (Metzger *et al.* 2008). Actualmente la medida ecográfica de la circunferencia abdominal (CA) se utiliza para estimar la adiposidad fetal, siendo por tanto esta medida un marcador de crecimiento anormal que puede ser usado para el diagnóstico de esta patología.

3.2.3. Implicaciones neurológicas en el feto

Algunos estudios proponen que la GDM podría afectar al desarrollo del sistema nervioso de los fetos, y consecuentemente, al desarrollo neurológico y psicológico de los recién nacidos. Son muchos los estudios que han demostrado peores puntuaciones en los test de actividad motora, capacidad de atención (Ornoy *et al.*, 2001) así como mayor incidencia de autismo (Dionne *et al.*, 2008; Krakowiak *et al.*, 2012) en niños de mujeres con GDM en edad escolar, que podrían tener consecuencias para toda la vida.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs), en concreto el ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA) están implicados en la morfogénesis del cerebro, especialmente desde el tercer trimestre de la gestación hasta los 18 meses de vida (Sastry 1985). De hecho, el DHA es especialmente abundante en los tejidos del sistema nervioso central, estando implicado en la fluidez de membrana de este sistema y de la retina, por lo que juega un papel muy importante en la función neurológica visual en los recién nacidos (Lauritzen *et al.*, 2001).

Alteraciones en la GDM en los niveles de DHA en los fetos, probablemente debido a fallos en el transporte placentario, podrían desencadenar alteraciones en el sistema neurológico (Pagan *et al.*, 2013). No obstante, se desconocen los mecanismos que

pueden estar alterados en la transferencia selectiva de DHA o de otras moléculas y que pueden ser importantes para el neurodesarrollo del feto.

4. ADAPTACIONES METABÓLICAS EN EMBARAZO Y GDM.

El embarazo humano se caracteriza por una serie de cambios metabólicos para asegurar el transporte continuo de nutrientes al feto. En la primera mitad del embarazo se promueve el anabolismo y la acumulación de grasa en el tejido adiposo, mientras que en la segunda mitad se promueve el catabolismo mediante un aumento de la resistencia a la insulina que activa la lipólisis en el tercer trimestre, para asegurar el crecimiento fetal

4.1. Adaptaciones en el metabolismo de carbohidratos

Al inicio del embarazo, se produce un aumento en la secreción de insulina sin que varíe su sensibilidad (Barbour *et al.*, 2007). Sin embargo, durante el segundo y tercer trimestre se produce un aumento progresivo de la resistencia a la insulina hasta llegar a una situación similar a la diabetes tipo 2. Esta resistencia a la insulina en el avance del embarazo puede ser debida a dos factores: El efecto del aumento de la adiposidad materna y el efecto desensibilizador sobre la insulina que tienen hormonas placentarias tales como lactógeno, prolactina, progesterona, hormona del crecimiento y hormona liberadora de corticotropina (CRH).

En embarazos complicados por GDM, se produce un aumento todavía mayor de la resistencia a la insulina en comparación con un embarazo normal, debido a diferentes componentes (Bartha *et al.*, 2000): El primer componente es la resistencia a la insulina pregestacional, que puede ser parcialmente heredada y parcialmente adquirida. La parte heredada, al igual que ocurre en la diabetes tipo 2, está determinada por la obesidad y por las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA). De hecho, existe una asociación negativa entre los niveles de NEFA y la resistencia a la insulina (Catalano *et al.*, 2002). El Segundo componente es la resistencia a la insulina gestacional que tiene lugar en la segunda mitad del embarazo. Numerosos estudios postulan que mujeres con GDM tienen alterada la función de las células β del páncreas, por lo que la resistencia a la insulina se ve agravada por la secreción alterada de esta hormona (Homko *et al.*, 2001). De hecho, se puede decir que la GDM es el resultado de

INTRODUCCIÓN

la incapacidad de las células β del páncreas para compensar el aumento de la resistencia a la insulina en el tercer trimestre del embarazo (Sivan y Boden 2003). Es por todo ello que los embarazos con GDM están caracterizados por una hiperglucemia e hiperinsulinemia generalizadas.

Actualmente no se conocen bien todas las causas que llevan al aumento de la resistencia a la insulina en la GDM. El aumento en los niveles de leptina (Kautzky-Willer *et al.*, 2001), de marcadores inflamatorios como TNF α (Factor de necrosis tumoral) (Winkler *et al.*, 2002) y proteína C reactiva (Retnakaran *et al.*, 2003) y el descenso en los niveles de adiponectina en mujeres con GDM (Retnakaran *et al.*, 2004) podrían contribuir además a los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina en estas pacientes.

4.2. Alteraciones en el metabolismo lipídico

Durante el embarazo, el aumento neto del peso de la madre se corresponde con el aumento de los depósitos de grasa durante los dos primeros trimestres de gestación, debido sobre todo al aumento en la secreción de insulina inicial.

Por el contrario, en el tercer trimestre de gestación, que es cuando se produce el mayor crecimiento fetal, se favorece el catabolismo de estos depósitos, debido al aumento de la actividad lipolítica del tejido adiposo y del hígado, con aumento de los niveles del enzima lipoproteín lipasa, paralelo al aumento en la resistencia a la insulina. Todo ello se traduce en una hiperlipidemia materna que garantizará el aporte continuo de ácidos grasos al feto (Herrera 2002). De hecho, en el tercer trimestre de gestación aumentan de forma muy significativa los niveles de triglicéridos y colesterol con respecto a los niveles encontrados en mujeres no embarazadas.

En cuanto a las alteraciones del perfil lipídico en embarazadas con GDM, existen discrepancias entre los diferentes autores: La mayoría de los estudios postulan una mayor hipertrigliceridemia materna durante todo el embarazo (Hollingsworth y Grundy 1982), mientras que otros no han encontrado cambios en los niveles de triglicéridos en embarazadas con GDM con respecto a las controles (Marseille-Tremblay *et al.*, 2008; Montelongo *et al.*, 1992). Más discrepancias han sido observadas con respecto al colesterol total y a las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas (Hollingsworth y

Grundy 1982; Montelongo *et al.* 1992; Rizzo *et al.*, 2008; Sanchez-Vera *et al.*, 2007). Esto nos lleva a la conclusión de que la alteración del metabolismo lipídico en los sujetos con GDM es en cualquier caso hacia un perfil más aterogénico, lo que puede aumentar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en estas mujeres.

En cuanto a los niveles de lisofosfolípidos (Liso-PL), los únicos estudios disponibles se han realizado en pacientes con diabetes tipo 2 y los resultados son contradictorios (Barber *et al.*, 2012; Pietilainen *et al.*, 2007). Lamentablemente, no se dispone de datos del nivel de Liso-PL en suero de mujeres con GDM, aunque estos compuestos están adquiriendo gran importancia por el aporte de LC-PUFA a los tejidos (Nguyen *et al.*, 2014).

4.3. Alteraciones en el metabolismo de aminoácidos

Existen pocos datos sobre adaptaciones en el metabolismo de estos nutrientes en el embarazo. No obstante, a partir del segundo trimestre existe una resistencia a la insulina que favorece la liberación de aminoácidos (aa) hacia el feto. Además, está ampliamente documentado que las concentraciones de aa son mucho mayores en los fetos que en la circulación materna, lo cual sugiere un transporte activo desde la madre al feto (Young y Prenton 1969).

No obstante, en casos de resistencia a la insulina ligada a obesidad es característica la hiperaminoacidemia (Felig *et al.*, 1969). Numerosos estudios proponen un aumento en los niveles de aminoácidos ramificados, neutros y aromáticos en suero de sujetos obesos con resistencia a la insulina, estando además estos niveles asociados con el índice de resistencia a la insulina (HOMA) (Huffman *et al.*, 2009; McCormack *et al.*, 2013; Newgard *et al.*, 2009). En diabetes tipo I, situación en la que se da una resistencia a la insulina muy aguda, se han descrito en suero materno mayores concentraciones de la mayoría de los aa tanto en etapas tempranas del embarazo como en etapas tardías, sugiriendo un papel fundamental de estos nutrientes en la macrosomía característica de estos fetos (Kalkhoff *et al.*, 1988).

En casos de mujeres con GDM se han encontrado niveles altos de lisina, tirosina (aromático) y valina (ramificados) en suero materno, y además estando estos niveles relacionados con la resistencia y secreción de insulina (Park S). En otro estudio se

INTRODUCCIÓN

demonstraron niveles altos de aa aromáticos en mujeres con GDM tratadas con dieta (Pappa *et al.*, 2007). Según un estudio reciente, los niveles de ornitina en suero materno de mujeres con GDM están significativamente aumentados en comparación con controles mientras que en el suero fetal, no solo se encontraron niveles más altos de ornitina, sino también de valina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina, ornitina, glutamato, prolina y alanina, mientras que los niveles de glutamina disminuyeron significativamente en este grupo (Cetin *et al.* 2005)(Cetin I 2004). Esto sugiere que en casos de GDM se puede producir un transporte alterado de aa, lo cual podría afectar al crecimiento fetal. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que pueden estar alterados en el transporte placentario de aa en la GDM.

4.4. Perfil de citoquinas en la GDM

Las citoquinas son producidas principalmente por las células del sistema inmune (NK y macrófagos) en respuesta a estímulos externos como estrés, lesiones e infección, pero también son producidas por el tejido adiposo (en este caso se denominan también adipocinas) (Guerre-Millo 2004). La placenta, también puede sintetizar citoquinas, haciendo posible una cooperación funcional entre el sistema inmune y el metabolismo en mujeres embarazadas. Además, la producción de citoquinas por la placenta es esencial para el correcto mantenimiento del embarazo, desde la implantación hasta el parto (Hauguel-de Mouzon y Guerre-Millo 2006).

La GDM se caracteriza por un bajo grado de inflamación crónica denominado "metainflamación" (Pantham *et al.*, 2015). En mujeres con GDM se produce un aumento en los niveles de adipocinas y citoquinas inflamatorias, quizá debido a la acumulación de macrófagos funcionales en el estroma intersticial de la placenta y del tejido adiposo (Klein *et al.*, 2008; Radaelli *et al.*, 2003). Aunque todavía no se conoce el desencadenante de la inflamación en mujeres GDM, se sabe que el ambiente metabólico anormal, la dieta y factores ambientales como sobrecarga calórica o cambios en la microbiota en estas embarazadas podrían ser los causantes de esta inflamación, incrementándose la producción de citoquinas inflamatorias en el tejido adiposo y en la placenta (Cani 2009; Larsen *et al.*, 2010). Así pues, cambios en los niveles circulantes de TNF α , adiponectina, leptina, resistina, IL-6 (Desoye y Hauguel-de

Mouzon 2007) podrían contribuir además a la resistencia a la insulina que se da en el embarazo, y más aún, en la GDM.

Algunas de estas citoquinas intervienen además en la regulación de transportadores de nutrientes, por lo que influirían también en el desarrollo de los fetos. Actualmente está cobrando mucha importancia el estudio de los mecanismos mediante los cuales el estado de "inflamación" repercute en el desarrollo de los fetos, y por tanto en la programación fetal de obesidad y otras patologías (Pantham *et al.* 2015).

La placenta actúa como fuente y diana de citoquinas mediadoras de la inflamación: libera citoquinas a la circulación materna y fetal, y es sensible a la acción de citoquinas maternas, fetales, y también sensible a la acción de sus propias citoquinas (regulación autocrina), destacando así su papel modulador. Aunque el aumento en los niveles de citoquinas maternas podría desencadenar el aumento en la producción de citoquinas por parte de la placenta, existe poca evidencia de que la inflamación materna sea igual que la inflamación fetal. Dado que las citoquinas no pueden atravesar la placenta, el estado de inflamación del feto depende de las citoquinas de la placenta y las producidas por él mismo. Las citoquinas más estudiadas en casos de GDM se describen a continuación:

4.4.1. Leptina

La leptina juega un papel fundamental en la regulación de la ingesta y gasto energético. Está implicada en la secreción de insulina, la utilización de glucosa, la síntesis de glucógeno y el metabolismo lipídico. Esta hormona es liberada a la circulación materna en función de las reservas de lípidos del organismo y actúa sobre receptores hipotalámicos disminuyendo la ingesta de comida y aumentando el gasto energético (Wauters *et al.*, 2000). La expresión y acción de la leptina son modificables por alteraciones metabólicas asociadas a la resistencia a la insulina, tales como obesidad y GDM. Los niveles de leptina aumentan hacia el tercer trimestre de gestación y descienden a sus concentraciones iniciales en el parto (Miehle *et al.*, 2012). Estos niveles elevados contribuyen a la movilización de las reservas maternas y aumentan la disponibilidad y la transferencia placentaria de lípidos al feto (Sattar *et al.*, 1998). Existe

INTRODUCCIÓN

evidencia de que la placenta es el principal contribuidor al aumento de los niveles de leptina durante la gestación, más que el tejido adiposo (Briana *et al.*, 2010).

Los niveles de esta citoquina fueron menores en niños macrosómicos de mujeres con GDM, lo que demuestra los niveles maternos son independientes de los niveles fetales. A pesar de ello, diversos estudios proponen la leptina sintetizada por el tejido adiposo fetal como un marcador de adiposidad fetal (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2006). Numerosos estudios también demuestran que la leptina es regulador del transporte de ácidos grasos, como se verá más adelante.

4.4.2. Interleucina 6 (IL-6) y resistina

La resistina producida en el tejido adiposo está relacionada con la resistencia a la insulina (Steppan *et al.*, 2001), aunque el mecanismo en humanos todavía no está muy definido (Briana y Malamitsi-Puchner 2009). Así algunos estudios han demostrado una asociación entre los niveles de resistina circulante y la resistencia a la insulina (Gharibeh *et al.*, 2010; Kirwan *et al.*, 2002). Las concentraciones maternas de resistina son mayores en mujeres gestantes que en las no gestantes (Cortelazzi *et al.*, 2007). Los niveles de resistina se han asociado con los niveles de IL-6 (Kuzmicki *et al.*, 2009), por lo que ambas podrían actuar de manera conjunta en el mecanismo de resistencia a la insulina. Además, numerosos estudios han demostrado también un aumento en los niveles de estas citoquinas en suero materno de mujeres con GDM (Morisset *et al.*, 2011), aunque sigue existiendo gran controversia a este respecto (Lobo *et al.*, 2013).

4.4.3. Adiponectina

La adiponectina es una adipocitoquina sintetizada en el tejido adiposo, que presenta propiedades insulino-sensibilizantes, antiaterogénicas y antiinflamatorias. (Diez y Iglesias 2003). Aunque esta adipoquina no es producida por la placenta, sí es sensible a su acción (Lappas *et al.*, 2005).

Su concentración disminuye en situaciones de resistencia a la insulina como la diabetes mellitus tipo 2 (Weyer *et al.*, 2001) y la GDM (Heitritter *et al.*, 2005; Pala *et al.*, 2015; Winzer *et al.*, 2004). Las bajas concentraciones de adiponectina plasmática se correlacionan con la resistencia a la insulina en mujeres obesas y en mujeres con GDM

(Cseh *et al.*, 2004; Weyer *et al.* 2001), demostrando la relación de esta hormona con la insulina.

Sin embargo, la información que existe sobre la adiponectina en el embarazo normal es contradictoria: los niveles pueden disminuir, aun en mujeres no obesas (Catalano y Ehrenberg 2006), lo cual sería coherente con el aumento de la resistencia a la insulina que se produce en este estado, o permanecer sin cambios (Cortelazzi *et al.* 2007; Mazaki-Tovi *et al.*, 2005) entendiéndose esto como un mecanismo protector independiente contra el aumento gradual de la resistencia a la insulina. Por otro lado, TNF α y otros mediadores proinflamatorios inhiben la transcripción de adiponectina en adipocitos (Bruun *et al.*, 2003), lo que también podría explicar los bajos niveles de esta adipocitina en el suero de mujeres con GDM. Ategbo *et al.* también demostraron no solo una disminución en los niveles de adiponectina maternos en casos de GDM, sino también una disminución en los niveles de adiponectina en niños macrosómicos de madres con GDM (Ategbo *et al.*, 2006), lo que podría contribuir a la programación fetal de la obesidad en estos niños.

4.4.4. TNF α

Es la citoquina más ampliamente estudiada en relación con la inflamación y con el desarrollo de la resistencia a la insulina en obesidad y GDM. Es producida principalmente por los macrófagos, y tiene efectos sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Grunfeld y Feingold 1991). En la placenta se produce una sobreproducción de esta citoquina en GDM, que está asociada con un incremento en la adiposidad fetal mediante la activación de fosfolipasa A2 (Radaelli *et al.* 2003) e incremento en la resistencia a la insulina, inactivando su ruta de señalización. En cuanto a los niveles de TNF α en circulación materna, la principal hipótesis es que están elevados en mujeres con GDM (Kirwan *et al.* 2002), contribuyendo así a la mayor resistencia a la insulina que ocurre en esta patología. De hecho, TNF α está directamente implicado con la resistencia a la insulina, ya que bloquea su ruta de señalización a nivel del receptor IR (Barbour *et al.* 2007). Algunos estudios proponen TNF α como un factor de predicción de la GDM (Kirwan *et al.* 2002; Xu *et al.*, 2014). Sin embargo, los niveles de esta citoquina en casos de GDM con diferentes tratamientos a penas ha sido investigado.

5. ESTRUCTURA PLACENTARIA Y ALTERACIONES EN GDM

La placenta, debido a su localización entre la sangre fetal y materna, es un órgano clave en la regulación del transporte de nutrientes y gases de la madre hacia el feto, además de producir hormonas y otros factores necesarios para el correcto desarrollo del embarazo. Factores maternos como el peso antes del embarazo, ganancia de peso, estilo de vida, así como condiciones adversas existentes en patologías tales como GDM, pueden afectar a la estructura y fisiología placentaria, provocando alteraciones en la transferencia de nutrientes al feto, alterándose por tanto el crecimiento fetal. Antes de analizar los sistemas de transporte de nutrientes, es preciso comprender la estructura de la placenta, y en concreto del epitelio encargado de esta función, el sincitiotrofoblasto.

La placenta humana es de tipo hemocorial, donde la sangre materna entra al espacio intervilloso vía arterias espirales y fluye directamente entre los villi terminales sin que intervenga ninguna pared vascular materna. En los villi placentarios hay dos capas que los nutrientes han de atravesar para llegar hasta el feto: La primera capa, en contacto con la circulación materna, está formada el sincitiotrofoblasto (SCTB), un epitelio multinucleado que proviene de la fusión de trofoblastos mononucleares. Este epitelio está formado a su vez por dos membranas polarizadas, la membrana microvellositaria (MVM), en contacto directo con la circulación materna y la membrana basal (BM), en contacto con los capilares fetales. La segunda capa que deben de atravesar los sustratos es el epitelio endotelial fetal, en contacto directo con el flujo sanguíneo fetal. Dado que sólo sustratos de pequeño tamaño pueden atravesar la MVM y BM, existen en este epitelio transportadores específicos de nutrientes, cuya expresión y actividad pueden alterarse en patologías como la GDM provocando así un crecimiento inadecuado de los fetos, con posibles consecuencias en el futuro (Figura 1).

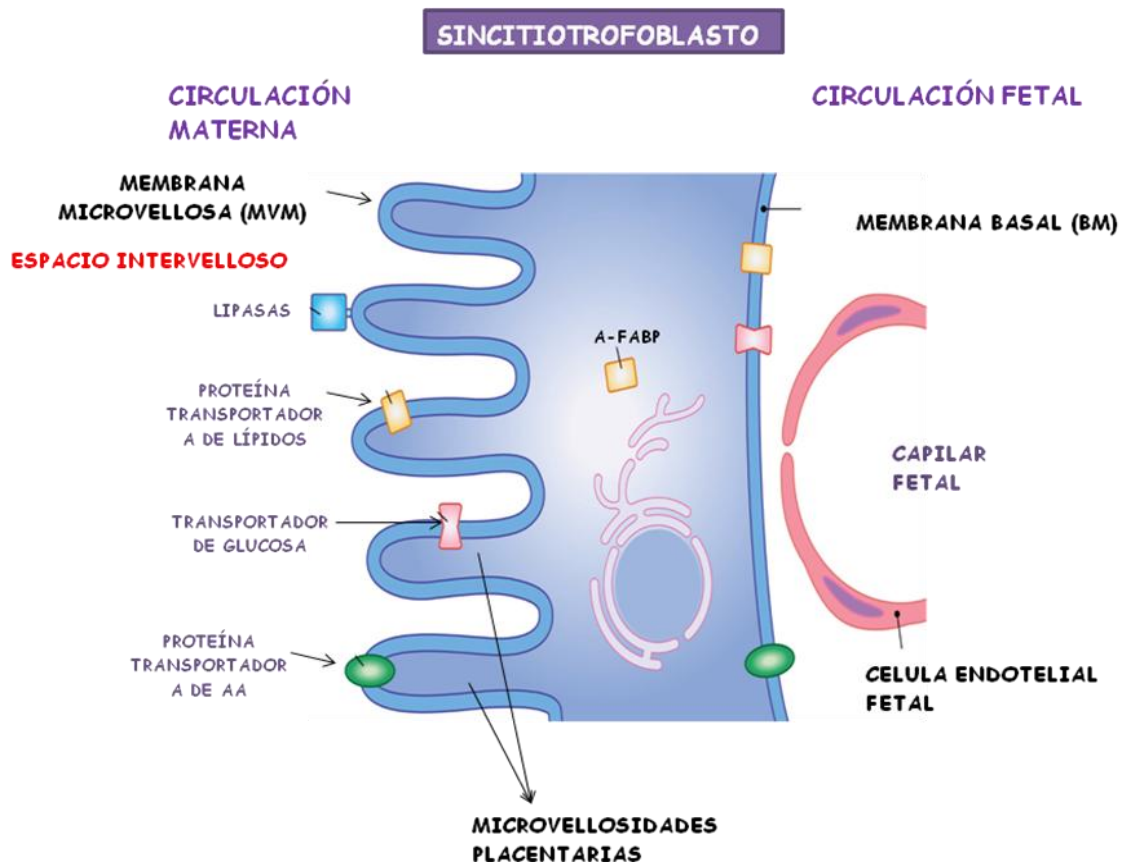


Figura 1. Esquema de la estructura del sincitiotrofoblasto: La sangre materna circula en el espacio intervellosos y está en contacto con la membrana microvellositaria (MVM). La membrana basal (BM) del sincitiotrofoblasto está orientada hacia la cara fetal, en contacto con las células endoteliales fetales. Los transportadores que median el transporte de aminoácidos, glucosa y ácidos grasos son expresados en ambas membranas. Las lipasas se encargan de la liberación de ácidos grasos para su captación por las proteínas transportadoras de ácidos grasos (Adaptación de Lager y Powell 2012).

La GDM provoca cambios en el ambiente micro-anatómico y/o cambios a nivel molecular, tales como una alterada vascularización de los villi, desequilibrio de moléculas bioactivas y un aumento del estrés oxidativo revisado por (Gauster *et al.*, 2012). Además estas alteraciones provocan un aumento del tamaño de las placentas que es clásicamente conocido y que puede afectar al transporte; las placentas de gran tamaño se asocian con la macrosomía presente en casos de GDM y obesidad (Wallace *et al.*, 2012). Estos estudios evidencian que en casos de sobrenutrición la captación y transferencia de nutrientes al feto está activada. Por consiguiente, se ha postulado que cambios en la estructura placentaria presentes en patologías como la GDM pueden provocar cambios en el número, expresión, densidad, distribución y actividad de los transportadores, alterando por tanto la transferencia materno-fetal (Jansson *et al.*, 2006). Dado que no todas las mujeres con GDM reciben el mismo tratamiento, sería

INTRODUCCIÓN

muy interesante analizar los efectos de éste (dieta o insulina) sobre la estructura placentaria, y por consiguiente, sobre el desarrollo de los fetos.

6. TRANSFERENCIA PLACENTARIA DE GLUCOSA AL FETO

El feto es casi totalmente dependiente de la glucosa materna, ya que su producción es mínima (Kalhan y Parimi 2000). Sin embargo, en la placenta el transporte de glucosa es independiente de insulina, ya que no se produce por GLUT-4 como en los tejidos periféricos, sino que se produce mayoritariamente mediante difusión facilitada a través del transportador GLUT-1, que es independiente de la insulina. GLUT-1 está presente de forma mayoritaria en la membrana apical de los trofoblastos, y en menor grado en la membrana basal de estos (Illsley 2000) (Figura 2). Por ello, se cree que la membrana basal del sincitiotrofoblasto es un paso limitante en el transporte de glucosa al feto, por lo que cambios en la expresión de este transportador tendrá consecuencias sobre el transporte materno-fetal de glucosa y sobre el crecimiento del feto.

GLUT-4, se encuentra sólo en pequeñas cantidades en trofoblastos en el primer trimestre (Ericsson *et al.*, 2005) y en células estromales (Xing *et al.*, 1998) (Figura 2) y no se sabe bien cuál es su función en la placenta. De hecho, algunos estudios postulan una disminución en este transportador en placentas de mujeres con GDM tratadas con insulina (Colomiere *et al.*, 2009). GLUT-3, otro transportador de glucosa, se expresa en células endoteliales y estromales de placentas a término (Hahn *et al.*, 2001), no obstante, tampoco se conoce bien su función (Figura 2).

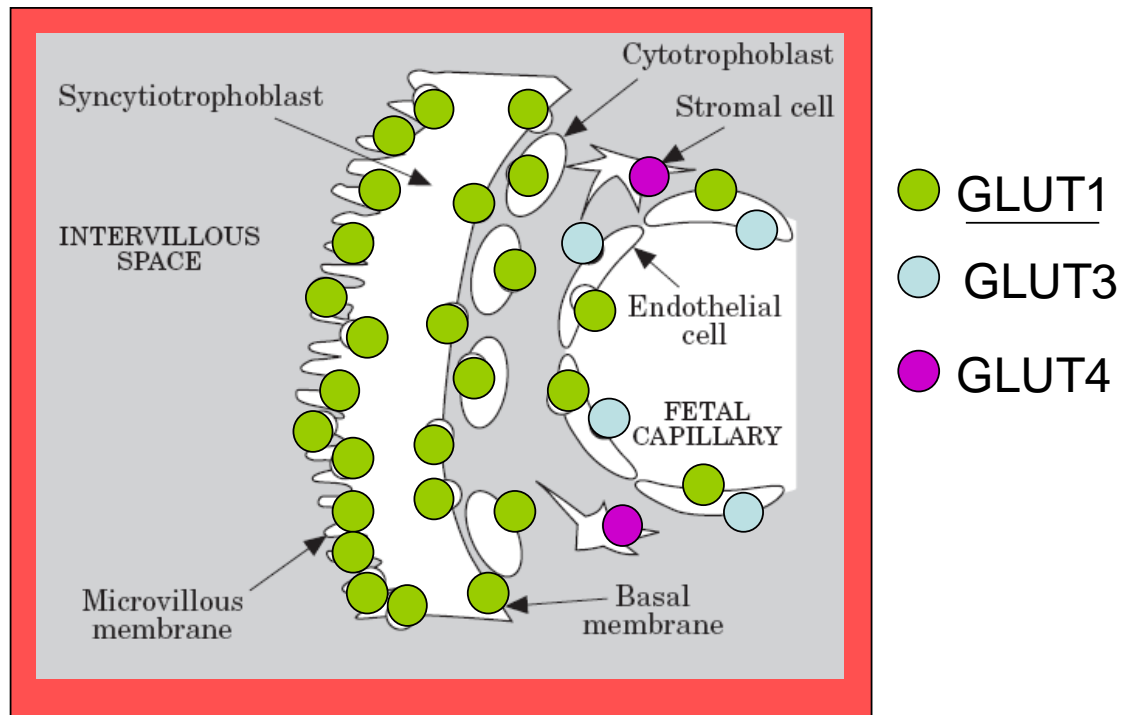


Figura 2. Transferencia placentaria de glucosa mediante difusión facilitada por el transportador GLUT-1, expresado de forma mayoritaria en la membrana apical (MVM) del sincitiotrofoblasto, GLUT-1 también está presente en la membrana basal (BM), pero en menor proporción. Adaptado de Illsley *et al.*,2003).

Existe controversia en cuanto a las alteraciones en la expresión de GLUT-1 en casos de GDM. Algunos autores han descrito una disminución en el transporte de glucosa en placentas de mujeres con GDM (Challier *et al.*, 1986; Hauguel *et al.*, 1986; Osmond *et al.*, 2000), además de una reducción de los niveles de GLUT-1 en trofoblastos humanos expuestos a condiciones de hiperglicemia (Hahn *et al.*, 1998; Illsley *et al.*, 1998) y de estrés oxidativo (Araujo *et al.*, 2013b; Lappas *et al.*, 2012) aunque esta situación se revertía cuando se eliminaba esta condición de exceso de glucosa, por lo que parece existir una cierta regulación feed-back para limitar la transferencia de glucosa al feto. Sin embargo, cuando la hiperglicemia es más severa se puede perder esta regulación y el transporte de glucosa al feto estaría aumentado.

Algunos estudios postulan un aumento en la expresión de GLUT-1 en la membrana basal en mujeres embarazadas diabéticas en comparación con controles (Gaither *et al.*, 1999), así como un aumento de GLUT-1 en placentas de mujeres no obesas con GDM tratadas con insulina, aunque aquí no separaron la membrana basal y la membrana apical (Colomiere *et al.*,2001), lo cual hubiera sido muy interesante para discernir si era

INTRODUCCIÓN

en la cara materna o en la cara fetal en la que se producía este aumento. Además, se ha descrito un aumento en la captación de glucosa en explantes de placentas procedentes de mujeres con GDM (Visiedo *et al.*, 2015), aunque tampoco aquí separaron membrana basal y membrana apical y no diferenciaron el modo de tratamiento (dieta-insulina).

En la placenta han sido identificadas numerosas moléculas como reguladoras del transporte de glucosa, tales como como la hormona de crecimiento GH (Ericsson *et al.*, 2005), hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Gao *et al.*, 2012), así como estrógenos y progesterona revisado (Lager y Powell 2012). No obstante, recientemente se ha descrito el factor de crecimiento IGF-1 como regulador del transportador GLUT-1 presente en la membrana de los trofoblastos (Baumann *et al.*, 2014), por lo que sería muy interesante estudiar los niveles de este factor de crecimiento en mujeres con GDM y analizar su asociación con el transporte de glucosa.

7. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA EN LA PLACENTA.

Aunque la insulina **no puede** atravesar la placenta, ni activar GLUT-1, sí puede unirse a su receptor específico IR presente en la membrana de los trofoblastos, activando así las rutas de señalización de esta hormona (Desoye *et al.*, 1992). La insulina es una hormona peptídica esencial para regular los niveles intracelulares y plasmáticos de glucosa. Es la hormona anabolizante más potente del organismo y actúa a través de la transducción de una cascada de señalización que desencadena una amplia variedad de respuestas celulares, entre las que destacan el transporte de glucosa via GLUT4 (en tejidos periféricos pero no en placenta), la síntesis de glucógeno, la síntesis de proteínas y de lípidos y la disminución de la liberación de ácidos grasos procedentes de triglicéridos a la circulación (Nystrom y Quon 1999). La resistencia a la insulina es, por definición un defecto en las señales de transducción de esta hormona (Pessin y Saltiel 2000), presentes tanto en obesidad como en GDM.

La expresión de los receptores de insulina en la placenta varía conforme avanza el embarazo, así como en los diferentes compartimentos (materno y fetal). Al principio de la gestación, los receptores de insulina se localizan principalmente en la membrana apical de los trofoblastos, mientras que al final del embarazo se encuentran

principalmente en el endotelio (Desoye *et al.*, 1994; Desoye *et al.*, 1997). Esto podría explicar resultados recientes en los que se ha demostrado que la placenta es más sensible a la acción de la insulina al principio del embarazo que al final (O'Tierney-Ginn *et al.*, 2015). Sin embargo, otros estudios han mostrado una alta expresión del receptor de insulina en la MVM del sincitiotrofoblasto a término lo que sugiere que la insulina materna podría afectar también a la función trofoblástica in vivo al final del embarazo (Ramirez *et al.*, 2012).

En mujeres obesas con valores altos de IMC la resistencia a la insulina se mantiene igual a lo largo de todo el embarazo, lo cual indicaría que estas mujeres ya tienen una baja respuesta a la insulina desde el principio del embarazo (Catalano y Ehrenberg 2006) (Figura 3). Esto también podría ocurrir en GDM, ya que cursa con mayor resistencia a la insulina que la obesidad. En base a estos estudios, en casos de GDM sería muy importante identificar si es la insulina materna o la insulina fetal la responsable de la activación del metabolismo placentario, así como el papel que tendría la insulina exógena en estos procesos.

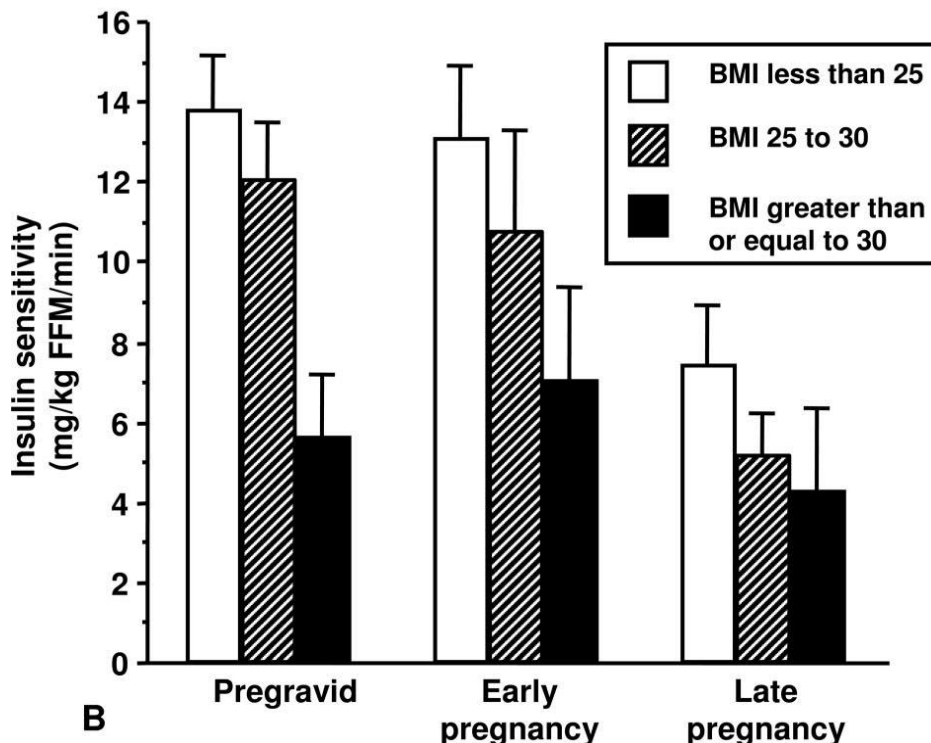


Figura 3. Cambios longitudinales en sensibilidad a la insulina en mujeres normopeso, con sobrepeso y obesas. Véase que en mujeres con obesidad (BMI ≥ 30) la sensibilidad a la insulina no disminuye de forma significativa conforme avanza la gestación (Catalano *et al.*, 2006).

INTRODUCCIÓN

Las rutas de señalización de la insulina mejor caracterizadas son la ruta **Ras-ERK** (*extracellular-signal-regulated Kinase*) y la ruta **IRS** (substrato de receptor de insulina)-**PI3K-Akt-mTOR** (McKay y Morrison 2007; Pessin y Saltiel 2000). Estas vías de señalización son los principales mecanismos de las células para controlar la supervivencia, la diferenciación, la proliferación y el metabolismo.

Aunque se trate de rutas diferentes, muchos estudios apuntan a una regulación cruzada entre todas ellas (Mendoza et al., 2011), lo cual dificulta aún más la comprensión del mecanismo molecular de esta hormona (Figura 4). Además, la insulina no es la única molécula capaz de activar estas rutas, ya que las citoquinas, así como otras hormonas y factores de crecimiento juegan un papel muy importante en su activación, por lo que también están implicadas en el metabolismo celular, pudiendo afectar también al transporte de nutrientes, como veremos más adelante.

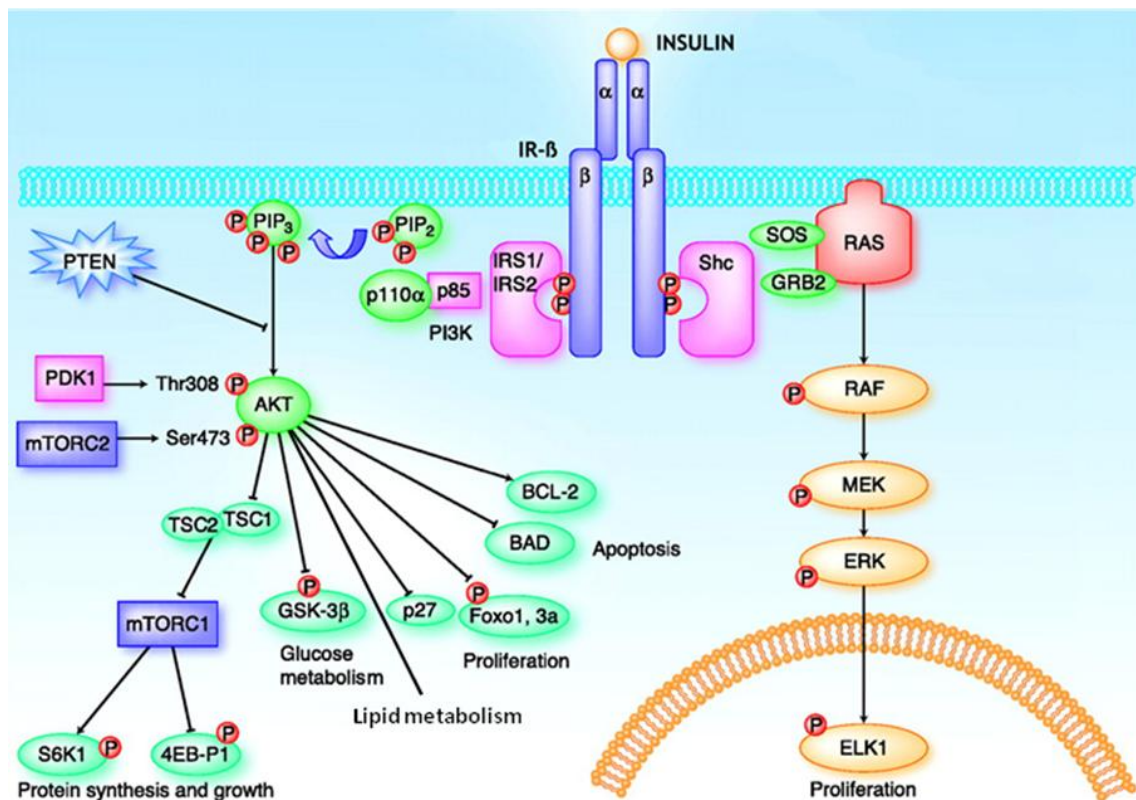


Figura 4. Principales vías de señalización de la insulina. Las rutas PI3K-Akt-mTOR y ERK son los principales mecanismos de las células para controlar la supervivencia, proliferación así como el metabolismo celular. La ruta de mTOR se activa también por nutrientes, así como por el estatus energético de la célula (ATP), y desencadena la síntesis proteica. La insulina controla muchas funciones del metabolismo, como la síntesis de glucógeno, de ácidos grasos o el transporte de glucosa, mediante la translocación al citoplasma del transportador GLUT-4 (adaptado de CCR pathways).

7.1. Ruta PI3K-Akt-mTOR

Esta es la ruta de señalización más estudiada en los casos de resistencia a la insulina, debido a que la activación de Akt (*Protein Kinasa B*) desencadena, en tejidos periféricos, la traslocación al citoplasma del transportador de glucosa GLUT-4, con la consecuente captación de glucosa (Figura 5). No obstante, en el trofoblasto, tal y como hemos mencionado anteriormente, GLUT-4 no media el transporte de glucosa, por lo que la activación de Akt estimularía otras rutas metabólicas en la placenta.

En tejidos sensibles a la acción de insulina, la insulina se une a su receptor específico IR fosforilando la subunidad β de este receptor en tirosina (Tyr). La autofosforilación de estos residuos Tyr activan a su vez a los sustratos de unión a insulina (IRS1 /2) mediante la fosforilación también en Tyr, desencadenando estos la activación de proteína PI3Kinasa (PI3K), que se encuentra justo por encima de Akt. PI3K está formada por una subunidad reguladora (p85 α) y por una subunidad catalítica (p-110) (Figura 4). La asociación entre PI3-Kinasa/IRS Tyr fosforilada se produce cerca de fosfolípidos de membrana que son sus sustratos, resultando la formación de fosfoinositol-3,4,5 fosfato (PIP-3), necesario para la propagación de la señal por medio de la fosforilación de Akt por parte de PDK1 y por parte de mTORC2 (Figura 4). Akt puede activar mTOR y a otras cadenas de señalización resultando en la síntesis de AG y en la síntesis de glucógeno, además de regular la proliferación celular. Un aumento en los niveles de p85 α impediría la formación del heterodímero (p85 α /p110) de PI3K, lo que impediría la fosforilación de Akt, con la consecuente inhibición de esta ruta de señalización. Esto ocurre en muchos casos de resistencia a la insulina (Pessin y Saltiel, 2000).

INTRODUCCIÓN

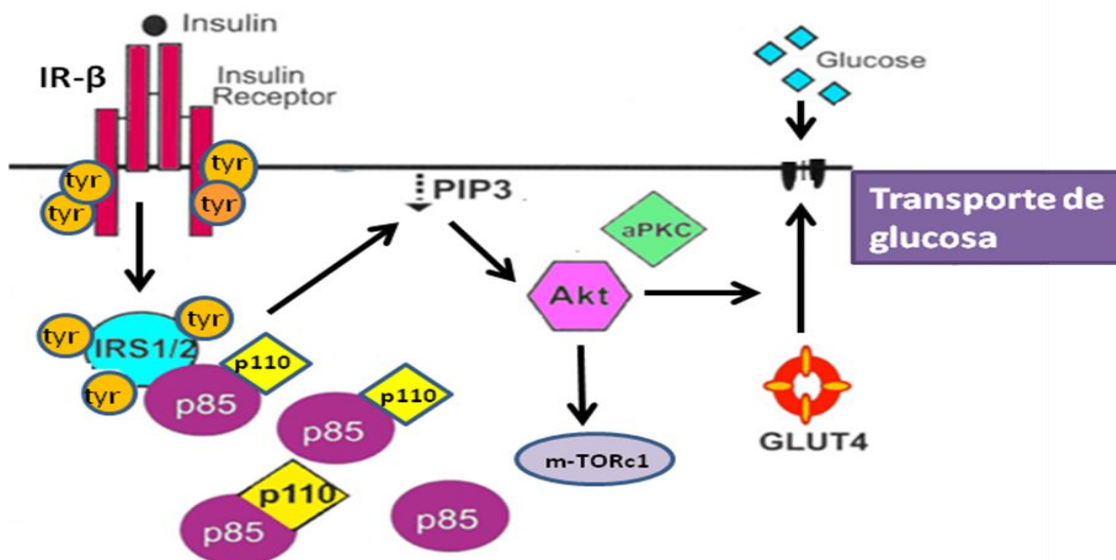


Figura 5. Mecanismo de regulación del transporte de glucosa mediado por insulina en tejidos periféricos. La insulina se une a su receptor específico IR fosforilando la subunidad β de este receptor en tirosina (Tyr). La autofosforilación de estos residuos Tyr activan a su vez a los sustratos de unión a insulina (IRS-1/2) mediante la fosforilación en Tyr, desencadenando estos la activación de proteína PI-3Kinasa y posteriormente la de Akt. Tanto la activación de Akt como la de la proteína Kinasa C son necesarias para el transporte de glucosa, mediante la inducción de la translocación del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT-4 del citoplasma a la membrana. Adaptado de Barbour *et al.*, 2007.

Aguas abajo de Akt se encuentra mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), cuyos mecanismos de acción son muy complejos e involucran a un gran número de mediadores. La cascada de activación de mTOR regula un amplio rango de procesos intracelulares, entre los que se incluyen el crecimiento, la proliferación, el metabolismo, la autofagia y la supervivencia. Además, dentro de la regulación del metabolismo, es de gran importancia destacar que su activación induce la síntesis de proteínas.

La importancia de la ruta mTOR radica en su reciente descubrimiento como sensor de nutrientes. El término "sensor de nutrientes" hace referencia a aquellas rutas de señalización que regulan el metabolismo celular en respuesta a concentraciones alteradas de nutrientes y factores de crecimiento, controlando la transcripción y la traducción. En general, los sensores de nutrientes promueven un fenotipo anabólico en el caso de abundancia de nutrientes y de energía, mientras que promueven un fenotipo catabólico en el caso contrario. En la placenta humana se han descrito varias vías que actúan como sensores de nutrientes: La vía de AMPK, la de la Glicogeno sintasa 3

(GSK-3), y la de mTOR, que puede ser activada por insulina y por aminoácidos, entre otros Revisado (Jansson *et al.*, 2012).

Una de las principales funciones de mTOR es que regula la expresión de los transportadores de aminoácidos, contribuyendo por tanto al crecimiento fetal. Está formado por dos complejos multiproteicos: El complejo Raptor (mTORC1) y el complejo Rictor (mTORC2). El complejo mTORC1 es estimulado por insulina (Wang *et al.*, 2006), factores de crecimiento, el estatus de energía, aminoácidos y estrés celular, mientras que mTORC2 no se cree que funcione como un sensor de nutrientes (Mendoza *et al.*, 2011) (Figura 6).

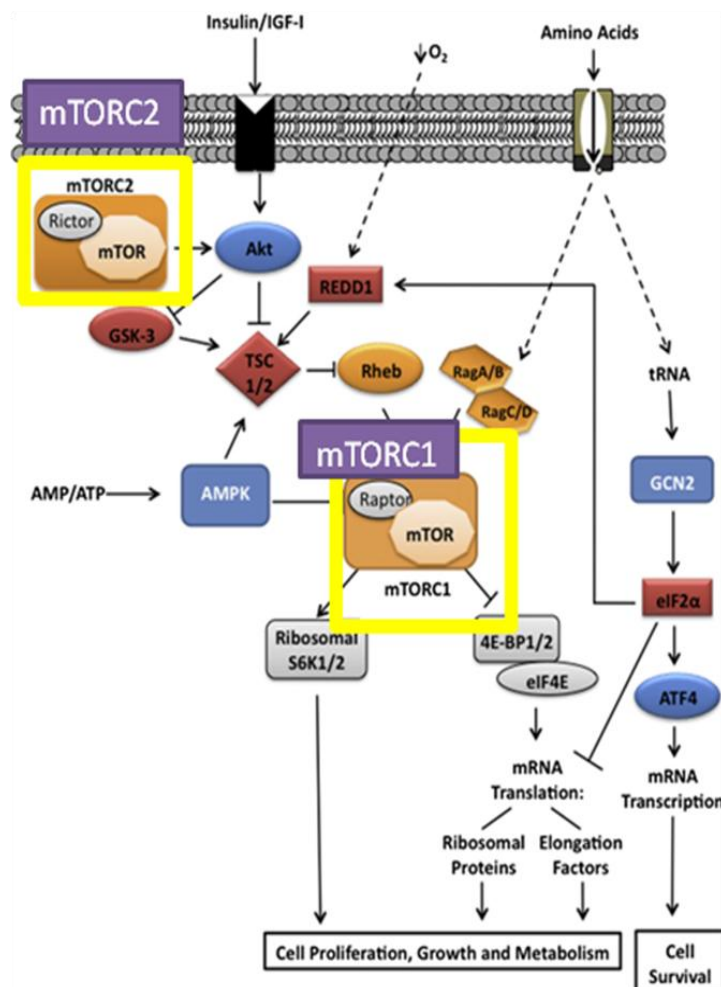


Figura 6. Ruta mTOR y otras vías que actúan como sensores de nutrientes. En este esquema se muestra el complejo Raptor (mTORC1), sensible a rapamicina, y el complejo Rictor (mTORC2), no sensible a rapamicina. Insulina e IGF1 inducen la fosforilación de Akt, el cual inhibe TSC2, lo cual permite la activación de Rheb y por tanto de la vía mTORC1. El efecto de la activación de mTORC1 es la fosforilación de S6K1/2 y la disociación de eIF4E de 4E-BP1/2, lo que estimula la síntesis proteica, la proliferación celular, el crecimiento y un fenotipo anabólico. Niveles bajos de oxígeno inhiben la ruta de mTOR mientras que niveles altos de aa la estimulan (Jansson *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN

El principal efecto de la activación de mTOR1 es la síntesis proteica. Su mecanismo de acción es la fosforilación en cadena de dianas moleculares aguas abajo: mTORC1 favorece la disociación del complejo formado por 4E-BP1/2 (proteína de unión al factor eucariótico de iniciación 4E) y el propio factor eucariótico de iniciación 4E (eIF4F), activando la síntesis proteica. También activa a la proteína S6 quinasa (S6K), que a su vez fosforila proteínas involucradas en la traducción del mRNA, aumentándose la expresión de transportadores de ácidos grasos en placenta (Figura 6). Esta ruta también se regula mediante bucles de retroalimentación negativa. Así, por ejemplo, S6K puede inactivar IRS Y mTORC2, disminuyendo la actividad de mTORC1.

El mecanismo de activación de mTORC2 está menos estudiado, aunque se sabe que fosforila Akt y PKC (proteín kinasa C), no siendo un sensor de nutrientes y regulando principalmente la organización del citoesqueleto, la supervivencia celular y el metabolismo lipídico (Mendoza *et al.*, 2011).

7.2. Ruta Ras-ERK

La proteína ERK (*extracelular signal-regulated Kinase*) es una MAPK (*mitogen-activated protein kinasa*) que funciona como el mayor efector de la oncoproteína RAS. La activación del receptor de insulina puede activar mediante otra vía de señalización a ERK, que a su vez puede fosforilar un amplio rango de dianas aguas abajo, o bien puede translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción (Figura 7). Esta ruta es activada, además de por insulina, por otras hormonas peptídicas, factores de crecimiento, neurotransmisores y quimiocinas a través de un receptor tirosín-quinasa en el caso de la insulina. Las rutas de ERK Y Akt-mTOR no funcionan de forma independiente, sino que pueden activar o inhibir su actividad la una a la otra (Mendoza *et al.*, 2011). Así pues, según estudios recientes ERK puede activar la ruta mTOR mediante fosforilación directa al complejo mTORC1 (Winter *et al.*, 2010).

La activación de ERK es esencial para el crecimiento celular, estando implicada por tanto en la supervivencia, la proliferación y la motilidad celular, y su efecto en el metabolismo es menor por lo que apenas ha sido estudiada en casos de resistencia a la insulina, al contrario que la ruta Akt. Sin embargo, estudios recientes han demostrado una alteración en la ruta ERK que podría ser responsable de la resistencia a la insulina

en músculo esquelético de mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos en el que la ruta de Akt no estaba alterada (Rajkhowa *et al.*, 2009). Además, un estudio reciente ha demostrado la alteración de la ruta ERK en músculo esquelético de mujeres obesas, lo cual podría estar relacionado también con la resistencia a la insulina presente en estas mujeres (Ruiz-Alcaraz *et al.*, 2013). No obstante, todavía no se conoce el significado y las consecuencias de las posibles alteraciones de esta ruta de señalización de respuesta a la insulina en la placenta, por lo que sería muy interesante su investigación.

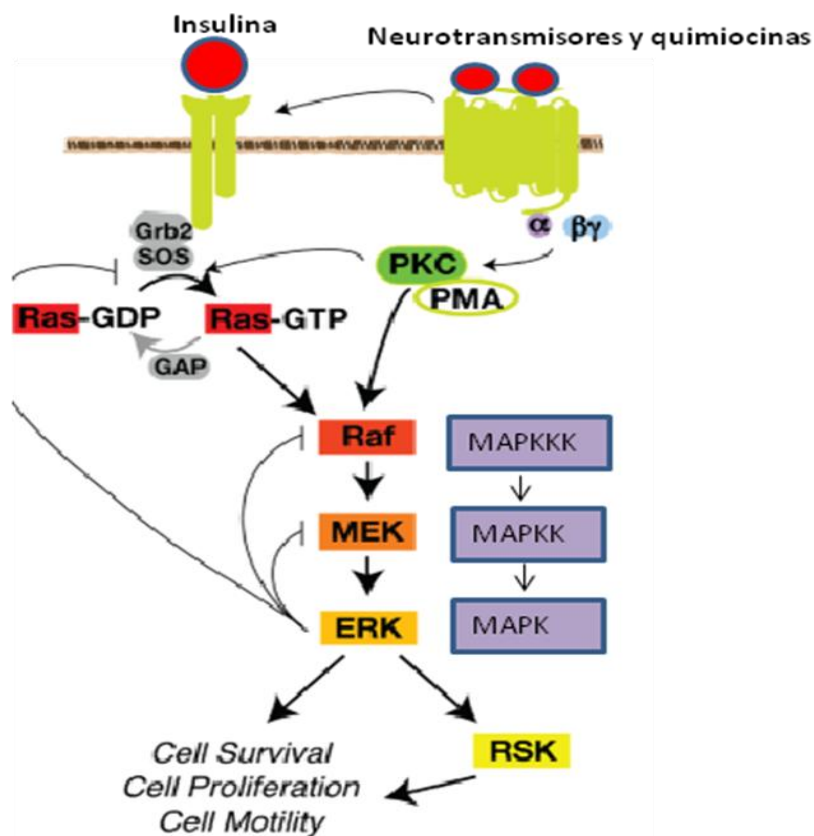


Figura 7 Ruta Ras-ERK activada por insulina y por otros factores tales como neurotransmisores y quimiocinas. Véanse los bucles de retroalimentación negativa. La proteína Raf es una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), MEK es una MAPK quinasa (MAPKK) y ERK es la quinasa efectora (MAPK). Adaptado de Mendoza *et al.*, 2011.

8. RESISTENCIA A LA INSULINA EN PLACENTAS DE MUJERES CON GDM.

Muy pocos estudios han analizado la ruta de señalización de la insulina en las placentas con GDM, y los pocos que hay utilizan un número muy bajo de sujetos, sin analizar el efecto que el tratamiento puede tener sobre la fisiopatología de la resistencia a la insulina. Sin embargo, se ha sugerido que en placentas a término la

INTRODUCCIÓN

expresión del receptor de insulina IR estaba afectada por la diabetes, y más interesante, se podría afectar de forma diferente en función del tratamiento (dieta o insulina). Así, se han demostrado niveles más bajos de este receptor en diabéticas tratadas con dieta (signo pues de resistencia a la insulina) y mayor en las tratadas con insulina con respecto a los controles (Desoye *et al.* 1992), lo cual podría indicar que en placenta, la insulina exógena podría revertir la situación de resistencia a la insulina presente en las diabéticas tratadas solo con dieta, aunque se necesitan más estudios para corroborar este hecho.

Recientemente se ha sugerido que la resistencia a la insulina en placentas de diabéticas tratadas con dieta podría deberse a un aumento en los niveles de la subunidad p85 α en estas gestantes. Esta situación se revertía tras el tratamiento con insulina, ya que disminuyeron los niveles de esta subunidad y aumentaron los niveles del dímero p85 α /p110, lo cual implicaría la activación de la ruta PI3Kinasa -Akt en este grupo de mujeres tratadas con insulina. No obstante, en tejidos periféricos el tratamiento con insulina no parece capaz de revertir la resistencia a la insulina, ya que la subunidad p85 α se mantuvo elevada con respecto a los controles en mujeres con GDM tratadas con insulina (Colomiere *et al.*, 2010). En otro estudio similar en placenta se demostró también el aumento de la subunidad p85 α de la PI3Kinasa en mujeres con GDM tratadas solo con dieta, no pudiéndose corroborar si la insulina revertía la situación de resistencia a la insulina (Alonso *et al.*, 2006). No obstante, el efecto de la inhibición de la ruta de la insulina en el transporte de otros nutrientes no fue analizado en estos estudios. En cualquier caso, parece que la cadena de señalización de la insulina está menos dañada en la placenta que en otros tejidos periféricos expuestos durante mayor tiempo a las hiperglucemias.

El exceso de nutrientes presente en la obesidad y en la diabetes (no tratada con insulina) inhibe la ruta de señalización de Akt mediante el complejo mTORC1, lo que llevaría a una situación de resistencia a la insulina en placenta (Tzatsos y Kandrór 2006). Además de las alteraciones que se pueden producir a varios niveles de la ruta de señalización de la insulina, en placenta existen proteínas que pueden interferir con la ruta de señalización de esta hormona contribuyendo así a la resistencia en este órgano. Un estudio reciente ha demostrado la sobreexpresión en placentas con GDM de

proteínas relacionadas con la insulina, tales como la Anexina 2 y la proteína 14-3-3. Estas proteínas bloquean la ruta de la insulina a varios niveles, por lo que contribuirían a la resistencia a la insulina presente en la GDM (Liu *et al.*, 2012). Además, existen otras moléculas capaces de inhibir la ruta de señalización de la insulina bloqueando algunos de sus intermediarios, como es el caso de TNF α , que fosforila en serina IR e IRS-1, inhibiéndolos (Barbour *et al.*, 2007).

A diferencia de la placenta, en tejidos periféricos se han estudiado más ampliamente las vías de señalización de la insulina en GDM, y se han analizado defectos en la mayoría de sus mediadores en casos de resistencia: alteraciones a nivel del receptor IR (Friedman *et al.*, 1999; Grunberger 1991; Shao *et al.*, 2000), a nivel de IRS (Catalano *et al.* 2002; Colomiere *et al.* 2010; Friedman *et al.* 1999), de Akt (Catalano *et al.* 2002, Colomiere *et al.* 2010), y de mTOR (Barbour *et al.*, 2011) (Figura 8). Lamentablemente en la mayoría de estos estudios no separaron a las mujeres en función del tratamiento, y no se puede saber si la insulina revertía la situación de resistencia o no. Solamente el grupo de Colomiere (en mujeres con GDM) (Colomiere *et al.*, 2010), y el de Tomazic en mujeres con diabetes tipo 2 (Tomazic *et al.*, 2002) observaron que la insulina en principio **no** mejoraba el estado de resistencia en tejidos periféricos. Esto deja en evidencia, que deben existir mecanismos compensatorios que contrarresten estos bloqueos de esta ruta de señalización en tejidos periféricos, como han sido propuestos en diferentes estudios, donde un aumento en los niveles de IRS-2 contrarresta la bajada de IRS-1 (Kubota *et al.*, 2000; Rondinone *et al.*, 1997).

En la figura 8 se detallan los principales defectos en la ruta de señalización de la insulina que conducirían a un estado de resistencia, tanto en tejidos periféricos como en placenta.

INTRODUCCIÓN

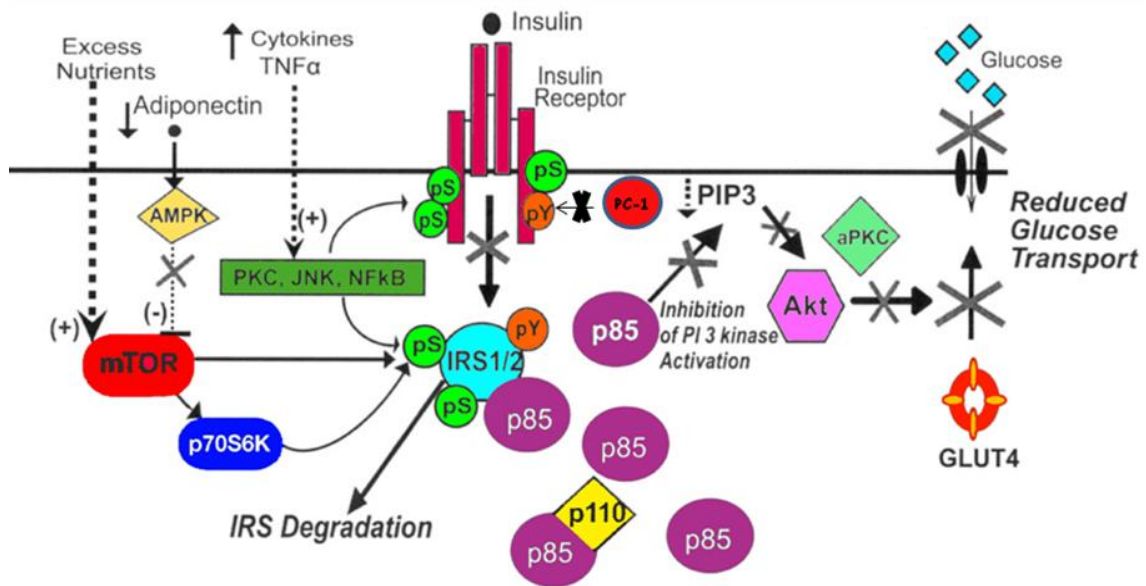


Figura 8. Mecanismo molecular de resistencia a la insulina. Fosforilaciones en serina (pS), bloquean al receptor IR y a los sustratos de unión al receptor IRS 1/2. La proteína PC-1 inhibe la fosforilación en tirosina (pY), del receptor IR, inhibiendo su actividad. Niveles elevados de p85 α impiden la formación del heterodímero p110/p85 α , siendo este paso esencial para la transmisión de la señal hasta AKT. Niveles elevados de citoquinas como TNF α fosforilan en serina, mediante la acción de otras moléculas, a IRS1/2, inactivándolo. Véase que mTORC1 puede inhibir la ruta también mediante fosforilación en serina de IRS, lo cual indica que un aumento de nutrientes llevaría a una situación de resistencia a la insulina. Adaptado de Barbour *et al.* 2007.

9. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS GRASOS AL FETO y ALTERACIONES EN GDM

Los ácidos grasos son fuente de energía, elementos estructurales necesarios para las membranas celulares, así como precursores de importantes compuestos bioactivos, por lo que juegan un papel muy importante en el desarrollo de órganos y tejidos fetales, así como en la acumulación de grasa en los fetos. La placenta humana se caracteriza por un alto transporte de lípidos, a pesar de que los fetos pueden sintetizar ácidos grasos saturados y monoinsaturados a partir de glucosa. Sin embargo, los ácidos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), y en particular ácido docosahexaenoico (DHA) y araquidónico (AA), que son muy importantes para el desarrollo del cerebro fetal en esta etapa de la vida (Uauy R 2001). La placenta, tiene por tanto un papel muy importante en la regulación del transporte de estos ácidos grasos y realiza un transporte selectivo y preferencial de estos ácidos grasos, fenómeno que se conoce con

el nombre de biomagnificación (Larque *et al.*, 2011), de forma que las concentraciones de LC-PUFAS en el feto son mucho mayores que en la madre.

En casos de exceso de nutrientes en suero materno, como es el caso de la GDM y obesidad, parece existir un transporte alterado de los ácidos grasos que pueden tener consecuencias a corto y largo plazo para el feto. Además, se ha observado un aumento en el contenido de triglicéridos en placentas de mujeres diabéticas (Bildirici *et al.*, 2003), así como una disminución en la tasa de oxidación de ácidos grasos en estas (Visiedo *et al.*, 2013), lo cual pone de manifiesto la alteración del transporte de ácidos grasos en casos de GDM. Sin embargo, los porcentajes de DHA y AA en placentas y en suero fetal son menores en casos de GDM que en controles, lo cual pone de manifiesto un fallo en el transporte de LC-PUFAs en patologías como la GDM (Min *et al.*, 2005; Wijendran *et al.*, 2000). Mediante la administración de AG marcados con isótopos estables a embarazadas con GDM, nuestro grupo de investigación ha demostrado una menor transferencia de DHA en sangre de cordón, mientras que la transferencia del resto de ácidos grasos estaba aumentada (Pagan *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos alterados en esta transferencia son aún desconocidos y se desconoce si podrían estar relacionados con la inhibición de la señalización de la insulina en estas placentas.

En la circulación materna hay dos fuentes de ácidos grasos: ácidos grasos no esterificados (NEFAs) y ácidos grasos esterificados en lipoproteínas plasmáticas. Sólo los NEFAs pueden atravesar la membrana del trofoblasto, mientras que los ácidos grasos esterificados en los TG, PL y ésteres de colesterol (EC) de las lipoproteínas han de ser hidrolizados por las lipasas placentarias para su transferencia al feto.

9.1. Captación y transporte de ácidos grasos por la placenta

9.1.1. Lipasas placentarias

En la membrana microvillositaria de la placenta se ha descrito la presencia de dos lipasas, que liberarían los ácidos grasos de las lipoproteínas: lipoprotein lipasa (LPL) y endotelial lipasa (EL) (Figura 9).

INTRODUCCIÓN

LPL presenta actividad triglicérido lipasa y es responsable de la hidrólisis de los TG del núcleo de los quilomicrones (QM) y VLDL, liberando los ácidos grasos para su utilización tisular (Mead *et al.*, 2002; Wang y Eckel 2009). Este es el mecanismo descrito en gran parte de la literatura para el transporte placentario de ácidos grasos. Sin embargo, recientemente se ha descrito otra lipasa, la enzima endotelial lipasa (EL), presente tanto en células del endotelio placentario como en la membrana del sincitiotrofoblasto (Lindegaard *et al.*, 2005) (Figura 9). La Endotelial lipasa presenta casi exclusivamente actividad fosfolipasa A1, liberando el ácido graso esterificado en la posición 1 de los fosfolípidos y produciendo un lisofosfolípido; además posee una mínima actividad triglicérido lipasa (Choi *et al.*, 2002), ya que los ácidos grasos saturados se encuentran predominantemente en la posición sn-1 de los fosfolípidos (PL), mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son típicamente esterificados en la posición sn-2 (MacDonald y Sprecher 1991), la actividad de EL podría producir liso-PL ricos en PUFA en el plasma materno, que podrían ser además una fuente adicional de ácidos grasos para la placenta. Así, diversos estudios describen que la liso-fosfatidilcolina (LPC) podría representar un medio de transporte preferente respecto a los ácidos grasos libres (NEFA) para la incorporación de DHA en el cerebro (Lagarde *et al.*, 2001; Thies *et al.*, 1992).

Endotelial Lipasa (EL) es una enzima predominante en la placenta con independencia de la edad gestacional. Al final del embarazo, la EL continúa expresándose mientras que la LPL está virtualmente ausente en el trofoblasto. En los vasos placentarios, sin embargo, al final de la gestación se observa un incremento en la expresión de ambas (Gauster *et al.*, 2005).

Magnusson *et al.* investigaron la actividad lipoproteína lipasa (LPL) placentaria en gestaciones normales en comparación con gestaciones complicadas con crecimiento intrauterino retardado (IUGR), diabetes mellitus insulín dependiente (IDDM) o diabetes gestacional (GDM). Este estudio demostraba que la actividad LPL placentaria se encontraba reducida un 47% en IUGR pretérmino, mientras que en IDDM se encontraba aumentada un 39 % respecto a los controles. Lindegaard *et al.* también describieron que la actividad LPL placentaria se encontraba aumentada en gestaciones complicadas con IDDM en asociación con el sobrepeso fetal (Lindegaard ML 2006).

Estos estudios apoyan, por tanto, la hipótesis de que alteraciones en LPL pueden contribuir a cambios en el transporte de los ácidos grasos al feto y modificar, en consecuencia, su crecimiento (Magnusson *et al.*, 2004).

No obstante, en casos de GDM, no se ha llegado a un consenso en cuanto a la alteración de la expresión y actividad de estas lipasas: Algunos estudios no muestran diferencias en la actividad LPL y EL (Gauster *et al.*, 2011), mientras que otros muestran un aumento en EL e incluso disminución de LPL en casos GDM (Radaelli *et al.*, 2009). Además, Gauster *et al.* demostraron un aumento de EL en mujeres obesas con GDM, pero no en delgadas con GDM, lo cual pone de manifiesto el papel de la obesidad materna en el transporte placentario (Gauster *et al.* 2011). En la mayoría de estos estudios no se ha analizado el efecto del tratamiento de la GDM en la actividad y expresión de estos transportadores, lo que sería de gran interés, ya que la insulina podría tener efectos importantes sobre el metabolismo placentario.

Otras lipasas que podrían estar implicadas en la hidrólisis de ácidos grasos esterificados, pero cuya relevancia se desconoce, son fosfolipasa A2 tipo II, que se expresa principalmente en placenta (Freed K 1997) y TG hidrolasa con pH óptimo 6.0, diferente a LPL, expresada en la membrana microvillositaria del sincitiotrofoblasto (Waterman *et al.*, 2000). Parte de la fosfolipasa A2 tipo II es secretada al compartimento extracelular donde es activa, pudiendo tener actividad fosfolipasa placentaria, no sólo intracelular, sino también extracelular, aunque el papel de esta enzima en el paso de AG de la madre al feto está por determinar (Rice *et al.*, 1998) (Figura 9).

La placenta posee además receptores específicos para lipoproteínas, siendo este mecanismo de gran relevancia para proveer de colesterol a la placenta y al feto (Larque *et al.*, 2013). Algunas lipoproteínas podrían sufrir endocitosis tras la unión a estos receptores (principalmente LDLr y VLDLr) y este mismo mecanismo podría aportar ácidos grasos al tejido placentario, una vez las lipoproteínas son liberadas por las lipasas intracelulares, aunque la relevancia de las mismas para el suministro de ácidos grasos a la placenta es aún incierto. En placentas con GDM, recientemente ha sido mostrado un aumento en los niveles de RNAm y de expresión de receptores de lipoproteínas como los LDLr, VLDLr y SRBI, tanto en mujeres normopeso, como en

INTRODUCCIÓN

mujeres con sobrepeso y obesas (Dube *et al.*, 2013), aunque la relevancia de este hecho todavía no se conoce (Figura 9). Estos resultados apoyarían una mayor transferencia de grasa en las GDM pero no una menor transferencia de LC-PUFA al feto.

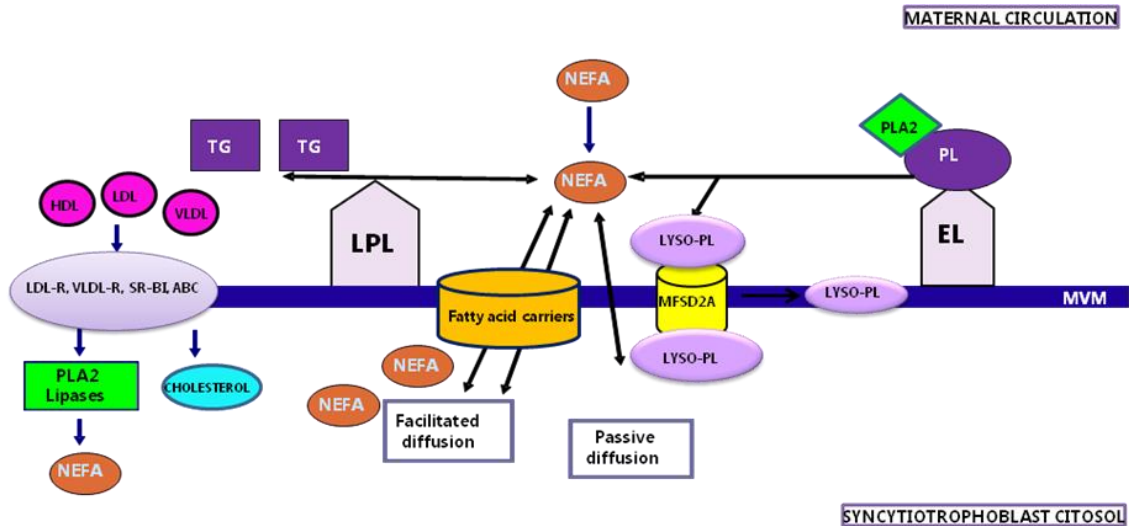


Figura 9. Transporte placentario de ácidos grasos. TG triglicérido, PL fosfolípido, EL endotelial lipasa, LPL lipoproteín lipasa, PLA2 fosfolipasa A2, NEFA Ácidos grasos no esterificados MVM membrana microvellositaria del sincitiotrofoblasto. Adaptado (Gil-Sanchez *et al.*, 2012).

9.1.2. Proteínas transportadoras de membrana

Los ácidos grasos libres (NEFA) y los liberados por las lipasas placentarias entran a la célula a través de difusión pasiva o bien a través de un mecanismo más complejo y saturable, mediado por proteínas transportadoras. Las proteínas de membrana que parecen estar implicadas en el transporte placentario de ácidos grasos son: FABPpm (*Fatty acid binding protein plasma membrane*), FAT/CD36 (*fatty acid translocase*) y FATP-1 a -6 (*Fatty acid transport protein*) con actividad acyl-CoA-sintetasa. Estas proteínas se encuentran localizadas en la membrana microvillositaria y en la basal del sincitiotrofoblasto (Gil-Sanchez *et al.*, 2012) (Figura 10).

Las FATP son proteínas integrales de membrana importantes para la captación de ácidos grasos de cadena larga (Kazantzis y Stahl 2012) y en especial, FATP-1 y FATP-4 han sido relacionadas con la captación de DHA en este órgano (Larque *et al.*, 2006). Son proteínas con función acyl-CoA por lo que facilitan el destino metabólico de los nutrientes que transportan.

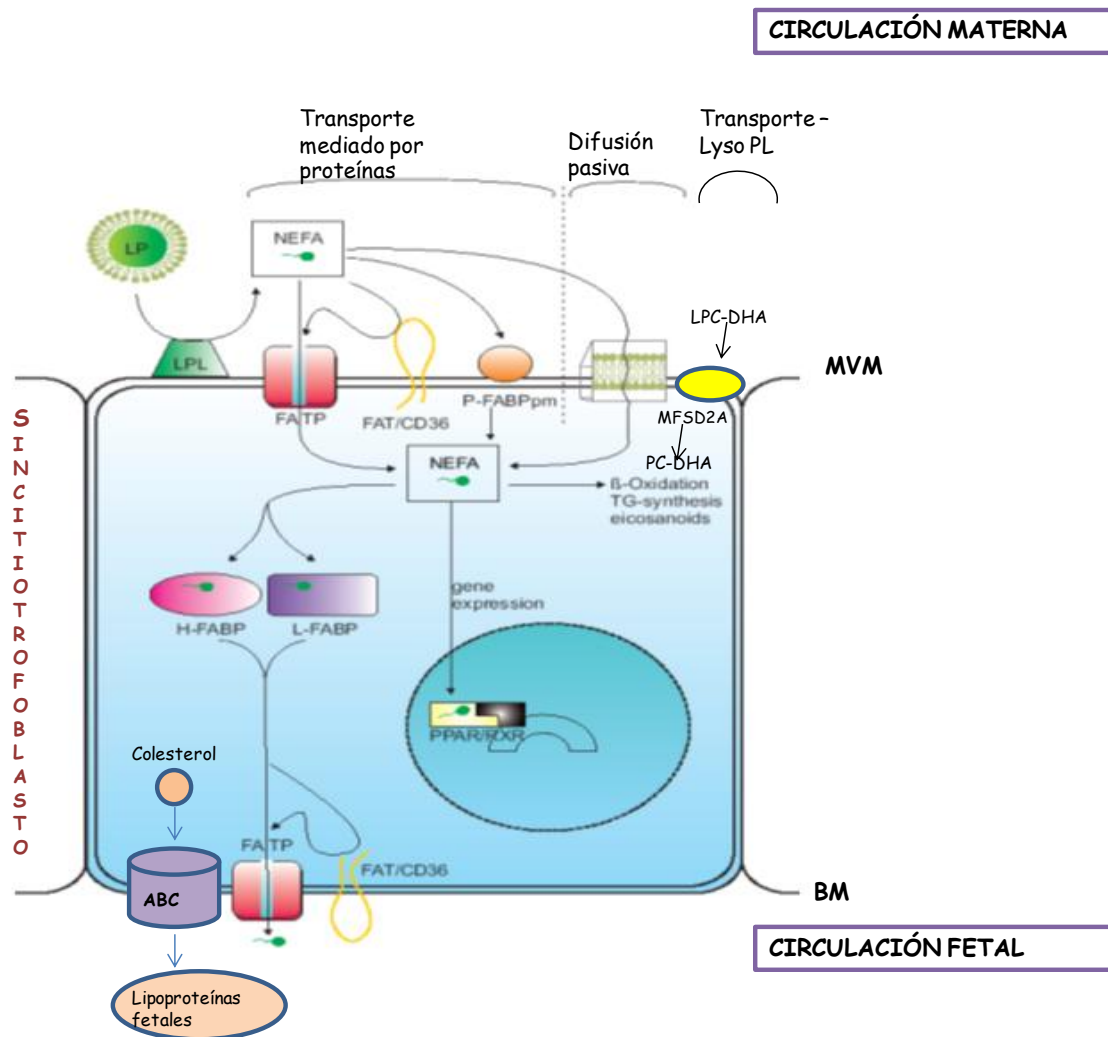


Figura 10. Modelo de transporte de ácidos grasos adaptado de Hanebutt et al 2008. Además se representa en este modelo la posible transferencia al feto de colesterol u otros lípidos mediante las proteínas ABC, que podrían intervenir en la formación de lipoproteínas fetales.. MVM membrana microvellositaria apical, BM membrana basal, LPC lisofostatidilcolina, PC fosfatidilcolina.

No hay estudios disponibles sobre la expresión de FATPs y FAT en placentas en casos de GDM, aunque hay algunos datos sobre la expresión de estos transportadores en casos de obesidad. Así pues, Dubé *et al.* demostraron una disminución en la expresión de FATP-4 y aumento en la expresión de FAT en placentas de mujeres obesas en comparación con las controles (Dube *et al.*, 2012), mientras que Zhu *et al.* mostraron una disminución de FATP-1 y FATP-4 en un modelo ovino de obesidad (Zhu *et al.*, 2010). Por tanto, estos cambios en la expresión de los transportadores podrían estar afectando a la captación placentaria de ácidos grasos. No obstante, se necesitan más estudios y con mayor número de sujetos.

INTRODUCCIÓN

9.1.3. Transporte intracelular de ácidos grasos en placenta

Una vez que los ácidos grasos llegan al citosol, se unen a las proteínas de unión a ácidos grasos citosólicas (FABP, fatty acid binding proteins). En la placenta han sido descritas hasta el momento: FABP1 o L-FABP (Liver FABP), FABP3 o H-FABP (Heart FABP), FABP4 o A-FABP (Adipocyte FABP), FABP5 o K-FABP (Keratinocyte- FABP) y FABP7 o B-FABP (Brain FABP) (Cunningham y McDermott 2009).

Estos ácidos grasos libres pueden ser además oxidados dentro del trofoblasto o bien ser reesterificados y depositados en forma de triglicéridos y otras fracciones lipídicas en la célula placentaria. Estos compuestos pueden sufrir posteriormente hidrólisis (lipólisis) y consecuentemente liberar ácidos grasos a la circulación fetal Revisado (Gil-Sanchez *et al.*, 2012)(Figura 10).

En un estudio reciente, Scifres *et al.* demostraron un aumento en la expresión de A-FABP en placentas de mujeres con embarazos complicados por obesidad y diabetes (tanto diabetes tipo 2 como GDM), en comparación con obesas no diabéticas controles y con no obesas controles (Scifres *et al.*, 2011). Además encontraron que la inhibición de A-FABP en trofoblastos placentarios disminuía la formación de vacuolas lipídicas o *lipid droplets* (LD) y la acumulación de triglicéridos, lo cual sugiere que A-FABP juega un papel importante en la acumulación de lípidos en placentas humanas. Sin embargo, estos autores encontraron que el contenido de TG estaba disminuido en la placenta de sujetos con GDM, mientras que los niveles de A-FABP estaban aumentados, sugiriendo una alta transferencia de estos lípidos al feto en esta patología.

Radaelli *et al.* describieron también un aumento en la expresión de A-FABP de dos a cuatro veces superior en mujeres GDM tratadas con insulina que en las controles (Radaelli *et al.*, 2009). Es importante destacar aquí el posible efecto de la insulina en la activación de estos genes.

9.1.4. Transporte de ácidos grasos a la circulación fetal

En la mayor parte de los estudios se indica que, la placenta transporta los ácidos grasos intracelulares a la circulación fetal mediante los mismos mecanismos que en la circulación materna (Hanebutt *et al.*, 2008). Madsen *et al.* demostraron que la placenta

humana es capaz de sintetizar y secretar apoB, así como una especie de lipoproteínas que podrían transportar lípidos hacia la circulación fetal (Madsen *et al.*, 2004). Sin embargo, la capacidad de secreción de lipoproteínas por la placenta es aún controvertida (Figura 10) y estos resultados no han sido corroborados por otros autores, por lo que actualmente se considera que la placenta no es capaz de producir lipoproteínas, sino que solo trasloca los AG libres a la circulación fetal.

9.1.5. MFSD2A

Recientemente se ha propuesto otro mecanismo alternativo para la transferencia de AG. MFSD2A (*major facilitator superfamily domain-containing protein 2A*) es una proteína que ha sido descrita recientemente como el principal transportador de DHA en cerebro de ratones. Aunque MFSD2A capta preferencialmente DHA esterificado en lisofosfatidilcolina (LPC), también puede transportar LPC con ácidos grasos de más de 14 átomos de carbono, tales como oleato y palmitato(LPC-oleato, LPC-palmitato). Estos LPC serían rápidamente incorporados a fosfatidilcolina en la membrana, permitiendo así un transporte eficaz de LPC mediante movimientos de *flip-flop* (Nguyen *et al.* 2014). Otra parte de estos PC podrían ser liberados al citosol (Figura 9).

MFSD2A pertenece a la superfamilia MFS (*Major facilitator superfamily*), que es una de las familias más importantes de transportadores, con una amplio rango de substratos. MFSD2A está formado por 12 dominios transmembrana y realiza un transporte mediado por sodio (Reddy *et al.*, 2012). Recientemente se ha visto en ratones que este transportador juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo lipídico, crecimiento y desarrollo, pudiendo estar regulado por genes involucrados en el metabolismo lipídico tales como PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptors*)(Berger *et al.*, 2012).

Estudios recientes han demostrado la presencia del transportador MFSD2A en placenta humana a término, específicamente en el sincitiotrofoblasto (no se observó este transportador en células endoteliales ni mesenquimales), aunque no se sabe su distribución en las membranas apical y basal de éste epitelio (Figura 9) Se cree que este transportador juega un papel muy importante en el desarrollo de la placenta humana, ya que tras su unión a sincitina-1, estimula la fusión celular, contribuyendo por tanto a

INTRODUCCIÓN

la formación del sincitiotrofoblasto (Esnault *et al.*, 2008). Es por ello que sería muy interesante investigar el papel de MFSD2A placentario en el transporte de DHA al feto, y su posible alteración en patologías como la diabetes gestacional, que muestran una estructura placentaria claramente afectada.

9.2. Regulación del transporte de ácidos grasos

Aunque se piensa que la insulina juega un papel muy importante en la regulación de los transportadores de ácidos grasos, existen pocos datos que demuestren esta regulación en la placenta. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la expresión y actividad de los transportadores de ácidos grasos podrían estar reguladas, además de por insulina, por otros muchos factores, entre los que destacan citoquinas como IL-6 (Lager *et al.*, 2011) TNF α (Lager *et al.*, 2011), leptina (Mousiolis *et al.*, 2012). En todos estos estudios (*in vitro*) se demostró que niveles altos de estas moléculas activaban la captación de ácidos grasos placentaria. Además, un estudio demostró, como era de esperar, que los propios TGs y NEFAs pueden regular la actividad de algunos de sus transportadores (Magnusson-Olsson *et al.*, 2007). Al igual que en otros tejidos, PPAR γ interviene en la regulación del transporte de ácidos grasos.

PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) es un factor de transcripción activado por ligando (lípidos) que inducen genes involucrados en el metabolismo lipídico (Schoonjans *et al.*, 1996) y en procesos inflamatorios, por lo que está implicado en la fisiopatología de la GDM. Funcionan en cooperación con el receptor α X retinoide (RXR α). Además, está implicado en la regulación de la sensibilidad a la insulina sistémica (Zeghari *et al.*, 2000), por lo que también juega un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Algunos estudios *in vitro* han demostrado la regulación de algunos transportadores de ácidos grasos mediante la vía de señalización (PPAR γ /RXR α) (Mishima *et al.*, 2011; Schaiff *et al.*, 2005), y en casos de GDM y de obesidad se ha demostrado una disminución en la expresión de este factor de transcripción en tejidos periféricos, lo que podría estar contribuyendo así a las alteraciones en el transporte lipídico que se producen en estas patologías (Catalano *et al.* 2002; Holdsworth-Carson *et al.*, 2010; Lappas 2014).

9.2.1. Relación entre los mediadores moleculares de la ruta de la insulina y transportadores de ácidos grasos.

Se dispone de muy pocos estudios que hayan analizado el efecto que tiene la insulina sobre los transportadores de ácidos grasos en la placenta y son muy pocos los estudios en los que se analiza relación entre los mediadores moleculares de la insulina y los transportadores de ácidos grasos en placenta. Tampoco hay muchos estudios en tejidos periféricos. En músculo cardíaco y esquelético de rata, la expresión y translocación al citoplasma de FAT está modulada por la insulina mediante la vía PI3Kinasas (Akt) (Chabowski *et al.*, 2004; Luiken *et al.*, 2002). Además, la insulina también regula la expresión y translocación al citoplasma de FATP-1 en adipocitos y músculo esquelético de rata, aunque no hay evidencia de que actúe mediante la ruta de Akt (Wu *et al.*, 2006). En cuanto al resto de transportadores, la insulina parece modular LPL en adipocitos y músculo esquelético humano (Richelsen 1999), pero no hay datos del resto de los transportadores. La mayoría de los resultados se han obtenido mediante estudios *in vitro*, y sería de gran interés una corroboración *in vivo*.

En la placenta, hay todavía menos información sobre el efecto de la insulina en la regulación de los transportadores de ácidos grasos. Sólo Magnusson *et al.* estudiaron el efecto de la insulina *in vitro*, y demostraron que la actividad de LPL disminuía cuando los trofoblastos eran expuestos a esta hormona durante 24 horas, mientras que no ejercía ningún efecto cuando el tiempo de exposición era de 3 horas (Magnusson-Olsson *et al.*, 2006). La insulina junto con algunos ácidos grasos estimula además en trofoblastos primarios la expresión de adipofilina vía Akt, que es una proteína que se expresa en las vacuolas lipídicas promoviendo la acumulación de lípidos en la placenta (Elchalal *et al.*, 2005). No obstante, la expresión y la actividad de los transportadores de ácidos grasos también están regulados por otras moléculas, tales como IGF-1, hormonas como leptina (Musousiolis *et al.*, 2012, Magnusson-Olson *et al.*, 2006), y algunas citoquinas como IL-6 y TNF α (Lager *et al.*, 2011), además de PPAR γ (Mishima *et al.*, 2011).

Dado que la GDM se caracteriza por una macrosomía e incremento en la adiposidad fetal, sería muy interesante analizar el efecto del tratamiento con insulina en

INTRODUCCIÓN

comparación con el tratamiento con dieta sobre los transportadores de ácidos grasos, ya que podría estar contribuyendo al aumento de la transferencia materno-fetal de lípidos, y por tanto a la programación fetal de la obesidad.

10. TRANSFERENCIA DE AMINOÁCIDOS AL FETO EN EMBARAZOS NORMALES Y EN EMBARAZOS CON GDM.

El tamaño de las proteínas es el factor limitante para la transferencia de éstas al feto, y no pueden por tanto atravesar la placenta. Sin embargo, los aminoácidos sí que pueden atravesar este tejido, y juegan un papel crítico para el desarrollo de los tejidos fetales. Además de ser sustratos energéticos (Jansson 2001), son precursores biosintéticos de purinas, pirimidinas, neurotransmisores y glutatión (Cleal *et al.*, 2011). Las concentraciones plasmáticas de aa son mucho mayores en la circulación fetal que en la circulación materna (Young y Prenton 1969), lo cual sugiere un transporte activo a través del sincitiotrofoblasto. Se ha demostrado en numerosos estudios que en casos de GDM y de obesidad, la activación del transporte de aa produce sobrecrecimiento fetal. No obstante, para comprender estos procesos, es importante conocer, en primer lugar, los mecanismos de transporte de aa en placenta humana y los mecanismos que pueden modular a dichos transportadores.

El transporte de aa en la placenta humana es un proceso complejo, ya que en la membrana del sincitiotrofoblasto se expresan más de 20 transportadores diferentes, que se clasifican en tres clases: transportadores de aa acumulativos (que incluye el sistema A y el sistema X_{AG}^-), transportadores facilitadores y transportadores intercambiadores de aa, que incluye LAT1, LAT2, y $^+LAT1$, y $^+LAT2$) (Lewis *et al.*, 2013). Los transportadores acumulativos median la captación de aa específicos al sincitiotrofoblasto. Los intercambiadores cambian un aa en el sincitiotrofoblasto por otro de la circulación materna o fetal, alterando así la composición de aa pero no la cantidad de aa transportados. Los transportadores facilitadores median el transporte bidireccional de aa, con el transporte en la dirección del gradiente de concentración. Se piensa que estos transportadores están localizados principalmente en la BM, donde median el flujo de aa hacia el feto en contra de un gradiente de concentración (Figura

11). En la tabla 2 se muestra un resumen de los diferentes mecanismos de transporte de aa (Tabla 2).

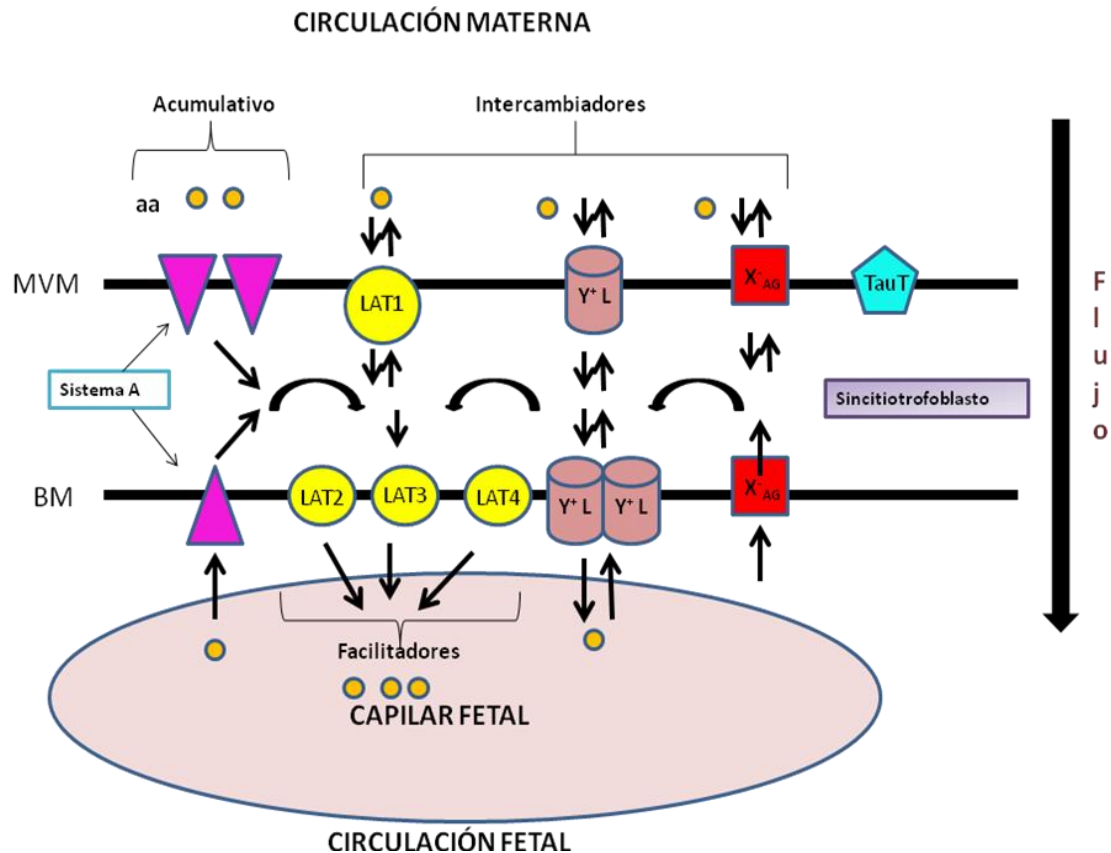


Figura 11. Transporte de aa en la placenta humana. Las flechas indican el movimiento de los aa. El sistema A es un transportador acumulativo que capta los aa de la circulación materna y fetal hacia el interior del sincitiotrofoblasto. Los aa son transportados hacia la circulación fetal a través del sistema L (LAT2,3 y 4) presente en la membrana basal (BM). LAT1 actúa como intercambiador en la membrana microvellositaria (MVM). Los intercambiadores (Y^+L , LAT1, X_{AG}) que cambian un aa por otro, son dependientes de la actividad de los transportadores acumulativos y facilitadores. La flecha grande indica la dirección del flujo de aa, que se produce en contra de gradiente desde la madre hacia el feto.

Sistema A

Este sistema está formado por transportadores dependientes de Na^+ que transportan aa neutros pequeños (SNAT) esenciales y no esenciales, tales como L-alanina, glicina, L-metionina, L-serina y glutamina. Las principales isoformas de este sistema son SNAT1, SNAT2 Y SNAT4, y se expresan de forma preferencial en la MVM, en comparación con la BM. La actividad del sistema A es estimulada por insulina, leptina, IGF1 e interleucina 6. (Jansson *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2009; Roos *et al.*, 2009a).

INTRODUCCIÓN

Sistema L

Se trata de un sistema de transporte independiente de sodio para aa neutros grandes (LAT), aunque se encarga del transporte de algunos neutros (L-met), ramificados (L-leu), y aromáticos (L-fenilalanina y L-tirosina). Su principal función es que actúa como un intercambiador de aa no esenciales por aa esenciales ramificados como leucina (Verrey 2003). Es estimulado por glucosa y por insulina (Roos *et al.*, 2009) y su actividad depende de la actividad de otros transportadores que le suministran aa para que funcione como intercambiador. Este sistema presenta también varias isoformas que se expresan de forma polarizada en la membrana del sincitiotrofoblasto. Así pues, LAT1 se expresa de forma mayoritaria en la MVM, y LAT2, LAT3 Y LAT 4, se expresan de forma mayoritaria en la BM (Cleal *et al.*, 2011).

Sistema B o TauT.

Es un transportador de taurina (aa esencial para la vida fetal) cuya actividad es Na^+/Cl^- dependiente. Se expresa de forma mayoritaria en la MVM del sincitiotrofoblasto revisado por (Araujo *et al.*, 2015).

Sistemas Y^+ , Y^+L , b^{0+}

Son transportadores de aa catiónicos. El sistema Y^+ es una familia de transportadores catiónicos independientes de Na^+ (CATs), de los que CAT1, CAT2B y CAT4 constituyen las principales isoformas en el sincitiotrofoblasto. CAT2b y CAT4 parece que se expresan mayoritariamente en la MVM, mientras que CAT1 lo hace en la BM (Araujo *et al.* 2015).

Y^+L

Está formada por las isoformas $\text{Y}^+\text{LAT1}$ y $\text{Y}^+\text{LAT2}$, y aunque también se expresan en ambas membranas, son mucho más abundantes en la BM del sincitiotrofoblasto (Araujo *et al.* 2015).

b^{0+}

También se expresa principalmente en la BM del sincitiotrofoblasto., Los transportadores catiónicos de aa también pueden transportar aa neutrales como L-leucina, L-metionina y L-fenilalanina (Araujo *et al.* 2015).

X^-_{AG}

Este es el principal transportador de aa aniónicos y se expresa en ambas membranas del sincitiotrofoblasto.

Tabla 2. Sistemas de transporte de aminoácidos

SISTEMA DE TRANSPORTE	MECANISMO	PROTEÍNA	LOCALIZACIÓN	SUBSTRATO
Sistemas dependientes Na⁺				
A	ACC	SNAT1,2,4	MVM/BM	Aminoácidos neutros
asc	EX	ASCT1,2	BM	Aminoácidos neutros
β		TAUT	MVM/BM	Taurina
N		SN1	MVM	Histidina, Asparragina, Glutamina
X _{AG} ⁻	ACC/EF	EAAT1-4	MVM/BM	Aminoácidos aniónicos
GLY		GLYT1	MVM	Glicina y sarcosina
b ⁰⁺		ATB ⁰⁺		Aminoácidos catiónicos y neutros
Sistemas independientes de Na⁺				
L	EX/EF	LAT1,2,4/4F2hc	MVM/BM	Aminoácidos neutros, ramificados y triptófano
γ ⁺	Uniporter	CAT1,4	MVM/BM	Aminoácidos catiónicos
γ ^{+L}	EX	γ ⁺ LAT1/4F2hc	MVM/BM	Aminoácidos catiónicos y neutros en presencia de Na ⁺
b ⁰⁺	EX	rBAT	BM	Aminoácidos catiónicos y neutros
T	EF	TAT1	BM	Aminoácidos aromáticos
asc	EX	asc1/4F2hc	BM	Aminoácidos neutros pequeños y D-serina

ACC, Acumulativo; BM, Membrana basal; EF, Eflux; EX, intercambio; MVM, Membrana microvellositaria. Datos de (Avagliano *et al.*, 2012; Cleal y Lewis 2008).

10.1. Transporte de aa en GDM

En cuanto a la GDM, no se ha llegado a un consenso sobre las posibles alteraciones en el transporte de aa. Algunos estudios apuntan hacia la no alteración del sistema L (Araujo *et al.*, 2013a; Nandakumaran *et al.*, 2004) o de la actividad de los transportadores γ⁺, γ^{+L}, y TauT (Janson *et al.*, 2002), mientras que la mayoría apuntan hacia un aumento en la actividad de algunos transportadores de aa, lo que conllevaría al sobrecrecimiento fetal característico de esta patología. Jansson *et al.* describieron un aumento de la actividad del sistema A en la membrana MVM en madres con GDM, independientemente de que estas tuvieran o no niños grandes para la edad gestacional

INTRODUCCIÓN

(LGA). Sin embargo, la actividad del sistema A no estaba alterada en niños grandes que habían nacido de madres sanas por lo que es el ambiente diabético el que parece afectar al transporte de aa per sé. En este estudio también se demostró un aumento en la actividad del sistema L en la MVM, pero solo en las madres GDM con niños LGA, lo cual sigue el papel de este transportador en el sobrecrecimiento fetal (Jansson *et al.*, 2002). De este estudio se puede deducir que el tratamiento con insulina no afectaba la actividad del sistema A, ya que en el grupo de las GDM con LGA había una mayor proporción de mujeres tratadas con insulina, y la actividad del sistema A fue similar en los dos grupos.

10.2. Regulación del transporte de aa: Papel de mTOR.

El mediador de la vía de señalización de la insulina mTOR es uno de los principales mecanismos responsable de la alteración del transporte de aa en la placenta. Además los propios aa pueden modular los niveles de mTOR para regular la expresión de sus transportadores (Roos *et al.*, 2009b). En casos de exceso o defecto de nutrientes, se producen alteraciones en la vía de mTOR que tienen resultado alteraciones en el transporte de nutrientes. Así pues, en patologías del embarazo que tiene como resultado fetos con retraso en el crecimiento (IUGR) mTOR podría estar inhibido, y por tanto el transporte de aa. En casos de exceso de nutrientes (obesidad y GDM) mTOR podría estar activado, con la consecuente activación de los transportadores de aa y el sobrecrecimiento fetal típico de estas patologías (Jansson *et al.* 2012).

Utilizando explantes y cultivos primarios de trofoblastos humanos se ha demostrado que mTORC1 es un regulador positivo de los transportadores de aa sistema A y sistema L, lo que es crítico para el transporte de aa al feto (Roos *et al.*, 2007; Roos *et al.* 2009a). Además, en otro estudio in vivo en mujeres obesas (sin GDM) se demostró que eran precisamente la insulina e IGF1 los que activaban mTORC1 en mujeres obesas en comparación con mujeres controles. Aunque no encontraron diferencias en la actividad de los transportadores de aa entre los dos grupos de mujeres, sí observaron correlaciones entre las moléculas activadas de la vía mTORC1 y Akt y el peso de los recién nacidos, lo cual indica el papel de mTOR en el transporte de aa en niños LGA (Jansson *et al.*, 2013). Aunque en este estudio las mujeres obesas no presentaban GDM, se cree que esta patología tendría un efecto similar sobre mTOR.

En concordancia con los resultados anteriores, estudios *in vitro* han demostrado que el transporte de aa está regulado por condiciones asociadas a la GDM, en la mayoría de los casos mediante la vía de mTORC1. Hormonas maternas tales como insulina, leptina e IGF1, cuyos niveles están aumentados en casos de GDM, son reguladores positivos del transporte de aa en la placenta (Jansson *et al.* 2003; Kniss *et al.*, 1994; Roos *et al.*, 2009b). Además, un estudio reciente postula que la leptina, mediante la activación de mTOR, activa la síntesis proteica en placentas de mujeres con GDM, en comparación con las controles. Esta podría ser una posible explicación para aumento del tamaño de las placentas en caso de GDM (Perez-Perez *et al.*, 2013).

Algunas citoquinas proinflamatorias (adiponectina, IL-6 y TNF α) también han sido propuestas como activadores del transporte de aa, aunque no mediante la vía de mTOR, sino vía STAT3 (señal de traducción y activador de transcripción 3) (Jones *et al.* 2009; Jones *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha demostrado TNF α como un activador de mTORC1 mediante el complejo TSC1/2 (Laplante y Sabatini 2012). Así pues, el tratamiento de la GDM podría afectar no solo al transporte de lípidos, sino también al de aa, lo cual podría ser una de las causas del sobrecrecimiento fetal típico de esta patología. Insulina, aa, otros factores de crecimiento y citoquinas podrían actuar sobre la vía mTOR, aunque el mecanismo de regulación es muy complejo y puede producirse mediante otras rutas del metabolismo celular.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Existe una alta prevalencia de la GDM, principalmente debido al alarmante aumento de la obesidad a nivel mundial, y en concreto en mujeres en edad reproductiva. Debido al riesgo sobre la salud asociado con la macrosomía y adiposidad fetal en recién nacidos de madres con GDM, es necesario analizar detalladamente los mecanismos implicados en el transporte de nutrientes al feto, para poder aportar tratamientos adecuados que disminuyan la programación fetal de la obesidad en estos sujetos.

La GDM modifica el metabolismo y estructura placentaria, pudiendo afectar así al transporte de nutrientes al feto, pero no se conoce el efecto que el tratamiento de la GDM (dieta o insulina) puede tener sobre el metabolismo placentario y en consecuencia sobre la transferencia de nutrientes al feto. Así, en la GDM no solo se produce más aporte de grasa y otros nutrientes al feto, sino que los niveles de otros ácidos grasos fundamentales para el desarrollo de los niños, como los LC-PUFAs, están disminuidos, sin conocerse las causas de estas alteraciones. Por ello, el objetivo general de esta tesis doctoral es:

- Conocer el efecto del tratamiento de la GDM (dieta o insulina) sobre la expresión de los transportadores de ácidos grasos y sobre la activación de las principales rutas de señalización de la insulina en la placenta, así como dilucidar si la insulina interviene en la regulación de estos transportadores.

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

- Estudiar los efectos que tiene la GDM y su tratamiento sobre medidas antropométricas de los niños, entre las que se encuentra la circunferencia abdominal fetal (AC) como medida de adiposidad fetal.
- Analizar los efectos de la GDM y su tratamiento sobre la estructura placentaria, así como en la expresión en los transportadores de ácidos grasos y otros nutrientes en estas placentas.
- Estudiar posibles mecanismos implicados en el transporte de DHA a los fetos, evaluando los niveles de lisofosfolípidos en estas embarazadas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

- Analizar las rutas de señalización de la insulina en placentas, y discernir si existe resistencia a la insulina en ellas.
- Analizar las asociaciones entre mediadores moleculares de la ruta de la insulina y transportadores de ácidos grasos, para dilucidar el efecto que la insulina pueda tener en la regulación de estos transportadores.
- Discernir si el peso pregestacional de las mujeres de nuestro estudio influyen en la transferencia de nutrientes al feto.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SUJETOS

Las gestantes fueron reclutadas entre la semana 28 y 34 de gestación en la Unidad de Día Obstétrica (U.D.O.) del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Se establecieron tres grupos de estudio:

- **Grupo Control:** gestantes sanas y sin diabetes gestacional (n=25).
- **Grupo GDM Dieta:** gestantes diagnosticadas de diabetes mellitus gestacional (DMG) y que consiguieron un buen control glucémico con tratamiento dietético y actividad física (n=23).
- **Grupo GDM Insulina:** gestantes diagnosticadas de diabetes mellitus gestacional que precisaron insulino-terapia para control metabólico ya que el tratamiento dietético fue insuficiente (n=20).

El número de sujetos con obesidad pregestacional (IMC > 30 kg/m²) fue similar en los dos grupos de gestantes con GDM (n=7 GDM-Dieta, n=9 GDM-Insulina).

Los criterios de inclusión de los sujetos en el estudio fueron los siguientes:

- Edad comprendida entre 20-45 años.
- Gestación con feto único.
- No fumadoras.
- Dieta omnívora.
- No consumidoras de suplementos de DHA en el tercer trimestre de la gestación.
- Ausencia de patología médica conocida antes de la gestación.
- Biometría y Doppler fetal normal en el momento del reclutamiento.

La diabetes gestacional se diagnosticó entre las semanas 24 y 28 de gestación mediante *screening* que se realiza a toda la población gestante con el test de O'Sullivan (sobrecarga oral de 50 g de glucosa). Se consideró un *screening* positivo cuando la glucemia venosa era superior a 140 mg/dl una hora después de la ingesta del preparado. A las pacientes con resultado positivo en el test de O'Sullivan se las sometió una o dos semanas después a un test de confirmación con 100 g de glucosa y determinación de glucemia venosa durante las tres horas siguientes post-ingesta,

MATERIAL Y MÉTODOS

resultando positivo si dos de los cuatro valores se encontraban por encima de las siguientes cifras: basal: 105 mg/dl; 1 hora: 190 mg/dl; 2 horas: 165 mg/dl; 3 horas: 145 mg/dl (Criterios del *National Diabetes Data Group*) (NDDG 1979)

Inicialmente, a todas las pacientes se les instauró tratamiento con dieta y ejercicio. La cantidad de calorías de la dieta se basó en la ganancia de peso que habían experimentado hasta ese momento. Además se les suministró un reflectómetro para realizar tomas de glucemia capilar y un cuaderno para anotarlas. Las pacientes realizaron 2 controles de glucemia capilar diarios, uno preprandial y otro postprandial, en desayuno, comida o cena, variando cada día. Tras dos semanas de tratamiento, fueron reevaluadas en la consulta de endocrinología para diabetes gestacional del Hospital Virgen de la Arrixaca. Las que consiguieron un buen control glucémico se asignaron al grupo de dieta (GDM-dieta). Las que no cumplieron los objetivos glucémicos, iniciaron tratamiento con insulina y se asignaron a dicho grupo (GDM-insulina). Se consideró que una paciente no cumplía los objetivos glucémicos cuando sobrepasó más de dos veces en una semana el límite de glucemia capilar preprandial de 90 mg/dl y el postprandial a las 2 horas de 120 mg/dl.

Para reclutar a las pacientes del grupo control se ofertó el estudio a gestantes sanas que cumplieran los criterios de inclusión y que acudían a realizar la ecografía morfológica entre la semana 20 y 22 de gestación a la Unidad de Medicina Materno Fetal del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Posteriormente se contactó con las gestantes que habían aceptado participar y se las incluyó en el grupo control entre las semanas 28 y 32, tras confirmar que tenían un resultado negativo para el diagnóstico de diabetes gestacional.

El estudio propuesto se diseñó y se llevó a cabo conjuntamente por el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (H.U.V.A.) (Murcia) y por el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.

El proyecto de investigación fue presentado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación del H.U.V.A. Todas las participantes recibieron información detallada

sobre el estudio en el momento de la inclusión y se obtuvo un consentimiento informado por escrito de todas ellas.

2. OBTENCIÓN DE DATOS

2.1 Historia clínica

En el momento del reclutamiento se realizó historia clínica (anamnesis y exploración física), incluyendo los siguientes datos: edad, peso, talla, índice de masa corporal (IMC) antes de la gestación y en el reclutamiento, medida perimetral de la cintura y de la cadera, medida de tensión arterial, fecha de la última regla, edad gestacional en el momento del reclutamiento, antecedentes médico-quirúrgicos y antecedentes obstétricos. Todos los datos antropométricos volvieron a ser evaluados el día del parto.

El peso de las gestantes en el momento del reclutamiento y del parto se obtuvo mediante báscula DETECTO (Model D1130K, NY, EEUU. 150 Kg x 500 gr) en la consulta de la UDO del hospital Virgen de la Arrixaca. El peso pregestacional se obtuvo mediante la anamnesis y los datos recogidos en la cartilla de control del embarazo. La talla también se midió en la consulta. Con estos datos se calculó el índice de masa corporal (IMC) siguiendo la siguiente fórmula matemática.

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Talla (m)}^2.$$

Los perímetros de cintura y cadera se midieron con cinta métrica convencional. Se consideró la medida del perímetro de la cintura a nivel del ombligo y la cadera se midió a nivel de las crestas ilíacas.

La tensión arterial sistólica y diastólica se obtuvo mediante manómetro electrónico (Vital Signs Monitor, Sure Signs VS2, Philips, Andover, MA, EEUU), en el brazo izquierdo y en posición de decúbito supino. Los valores se obtuvieron en milímetros de mercurio.

2.2 Cuestionario dietético

Las gestantes cumplimentaron un cuestionario dietético de frecuencia (Anexo 1) para evaluar el consumo de pescado, aceites y frutos secos en el momento de la inclusión en el estudio. El cuestionario recogía una amplia lista de alimentos y la

MATERIAL Y MÉTODOS

paciente registraba la frecuencia (diaria, semanal, mensual o nunca) con la que consumía cada uno de ellos.

2.3 Ecografía obstétrica

La ecografía obstétrica se realizó el día del reclutamiento y previa al parto en las semanas 37-38 de gestación, mediante ecógrafo Voluson 730 Pro (KTI 105938-100 General Electric Medical Systems, Kretz Ultrasounds, EEUU).

Se midieron los parámetros habituales de biometría fetal: diámetro biparietal, circunferencia cefálica, circunferencia abdominal y longitud de fémur. Así mismo se realizó valoración de líquido amniótico mediante la medición de la columna máxima de líquido (pocket), y se valoró el tipo y el grosor placentarios. Se realizó estudio *Doppler* fetal mediante la medición de los índices de pulsatilidad de las arterias umbilical y cerebral media así como estudio *Doppler* de arterias uterinas maternas, todo ello para comprobar la normalidad en los flujos uterino, placentario y fetal.

2.4 Reconocimiento del recién nacido

Todos los recién nacidos fueron pesados en el paritorio nada más nacer mediante báscula electrónica (SECA Model 727, Alemania. 20 Kg x 500 gr). A las 24 horas del nacimiento, en la planta de maternidad se realizaron las medidas de longitud y perímetros de cintura y cadera con cinta métrica. Éstas medidas fueron tomadas por el personal de enfermería de la planta y quedaron recogidas en la historia clínica del recién nacido.

3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se tomaron muestras de sangre de las gestantes en el reclutamiento y el día del parto. Se extrajeron unos 16 ml de sangre venosa periférica de la madre. Se fraccionó la sangre extraída en diferentes tubos: 5 ml en tubo seco para bioquímica e insulina, 5 ml en otro tubo seco para ácidos grasos, 3 ml en tubo con EDTA para hemograma y otros 3ml en tubo con EDTA para hemoglobina glicosilada.

Tras producirse el parto y alumbramiento, se extrajeron 10 ml de sangre de cordón procedente de la vena umbilical que se repartieron en dos tubos secos, uno para determinación de ácidos grasos y otro para determinaciones bioquímicas e insulina.

La sangre de la madre y del recién nacido se remitieron a los laboratorios de Bioquímica, Hormonas y Hematología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, donde se midieron las concentraciones de glucosa, proteínas totales, colesterol total, triglicéridos, insulina, HOMA.

Para el análisis de ácidos grasos, uno de los tubos con sangre de la madre y otro de vena umbilical se centrifugó inmediatamente a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C (Centrífuga KUBOTA 5.900, Japón) para separar el suero. Las muestras de suero obtenidas fueron congeladas a -80 °C hasta el posterior análisis de ácidos grasos. La extracción de ácidos grasos se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.

La placenta se pesó en el paritorio y se tomaron muestras de cotiledones de unos 2x2 cm que se lavaron con NaCl 0.9% para eliminar restos de sangre. Las muestras obtenidas se introdujeron en tubos secos de 5 ml y fueron congeladas inmediatamente a -80 °C hasta las posteriores extracciones de proteínas para Western blot y para cuantificación de ácidos grasos y aminoácidos.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1 Bioquímica general

La determinación de los parámetros bioquímicos a cada paciente, se realizó en el laboratorio de Bioquímica del (Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca), mediante kits comerciales de *Roche* (Mannheim, Alemania) en los sistemas *Roche/Hitachi cobas c*[®], mediante los siguientes métodos:

- Glucosa (mg/dl): Espectrofotometría de ultravioleta-visible.
- Proteínas totales (mg/dl): Test colorimétrico (espectrofotometría de ultravioleta-visible).
- Colesterol total (mg/dl): Test enzimático-colorimétrico (espectrofotometría de ultravioleta-visible).
- Triglicéridos (mg/dl): Test enzimático-colorimétrico (espectrofotometría de ultravioleta-visible).

MATERIAL Y MÉTODOS

- HDL-colesterol (mg/dl): Test enzimático-colorimétrico homogéneo (espectrofotometría de ultravioleta-visible).
- LDL-colesterol (mg/dl): Calculado mediante la fórmula de Friedewald (346):
$$LDLc = CT - (HDLc + TG/5)$$

4.2 Insulina y HOMA

Las determinaciones de insulina basal ($\mu\text{UI/ml}$) se realizaron en el laboratorio de radioinmunoanálisis (Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca), mediante test inmunológico de electroquimioluminiscencia DÍAsource INS-IRMA Kit (Nivelles, Bélgica). El índice HOMA se calculó a partir de los valores de insulina y glucosa mediante la fórmula (Katz A 2000):

$$\text{HOMA} = \text{Insulina} \times (\text{glucosa} \times 0.0555) / 22.5$$

4.3 Ácidos grasos

4.3.1 Extracción de lípidos del suero

Los ácidos grasos del suero fueron extraídos mediante el método de Folch (Folch *et al.*, 1957). Brevemente, 100 μl de estándar interno C15 fue añadido a 250 μl de suero. Los lípidos totales fueron extraídos en 10 ml cloroformo/metanol (2:1) A continuación se añadieron 8 ml de cloroformo-metanol (1:1) con antioxidante *Butihidroxitolueno* (BHT). Se agitaron las muestras y se introdujeron 30 minutos en baño termostatzado a 55 °C. A continuación se volvieron a adicionar 4 ml de cloroformo y se agitaron los tubos en el vortex entre 30-45 segundos. El contenido del tubo fue filtrado con papel de filtro Whatman del número 6 y el tubo se lavó dos veces con una solución de Cloroformo-Metanol (2:1), agitando el tubo en el vortex y pasándolo por el mismo filtro.

A continuación se añadieron 4 ml de cloruro potásico (KCl) 0.1 M para el precipitado de las proteínas y se agitó durante 1 minuto para mezclar bien las dos fases. Estos tubos se guardaron 24 h a 4 °C en posición vertical. Transcurrido este periodo se formaron tres capas bien diferenciadas:

- Una capa superior transparente de KCl que retiene el agua de la muestra.
- Una pequeña capa intermedia blanquecina que corresponde a las proteínas.

- Una capa inferior de Cloroformo –Metanol 2:1 con los lípidos.

Una vez que las fases quedaron claramente diferenciadas, se aspiró y eliminó completamente la fase superior acuosa y la capa blanca correspondiente a las proteínas con una trompa de vacío. La fase lipídica se filtró sobre un embudo con papel de filtro Whatman del número 6 y se añadió una pequeña cantidad de sulfato sódico para eliminar los restos de agua. El tubo fue lavado dos veces con 1 ml de cloroformo metanol (2:1) y pasado por el filtro. Finalmente los extractos lipídicos obtenidos se llevaron a secado con nitrógeno (ALPHAGAZ N₂) a la temperatura de 55 °C. Tras secarse se pesó el tubo para estimar la cantidad de grasa a metilar.

4.3.2 Extracción de lípidos de la placenta

Para la extracción de ácidos grasos de las muestras de placenta se utilizó el método de Klingler et al (Klingler *et al.*, 2003) . Se tomaron de 0.3 a 0.5 g de tejido placentario a los que se añadieron 250 µL de estándar interno C15 a una concentración de 0.1 mg/ml. La muestra fue homogeneizada con un politrón (Polytron SEV Kinematica, Suiza) durante 1 minuto, añadiendo 3 ml de cloroformo-metanol (2:1) y BHT (1 mg/ml). A continuación, la muestra fue sonicada durante 1 minuto en un baño con ultrasonidos (Ultrasonic cleaner 600 Rotex CO) para volver a pasar el tubo por el politrón y trasvasar el contenido a un nuevo tubo de mayor capacidad. Se lavó el politrón tres veces añadiendo 3 ml de cloroformo-metanol (2:1) con BHT (1 mg/ml) al tubo inicial y se vertió el lavado al nuevo tubo que fue incubado a 55 °C durante 30 minutos.

Tras este periodo de incubación, el contenido del tubo fue filtrado con papel de filtro Whatman del número 6 y el tubo se lavó dos veces con 1 ml de cloroformo-metanol (2:1) y se pasó por el mismo filtro. A continuación se añadieron 4 ml de KCl 0.1 M para el precipitado de las proteínas y se agitó durante un minuto.

Posteriormente se centrifugó 30 minutos a 875xg y a 10 °C y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez que las fases quedaron claramente diferenciadas se aspiró y eliminó completamente la fase superior acuosa y la capa blanca correspondiente a las proteínas con una pipeta Pasteur. La fase lipídica inferior se filtró sobre un embudo con papel de filtro Whatman del número 6 y se añadió una

MATERIAL Y MÉTODOS

pequeña cantidad de sulfato sódico para eliminar los restos de agua. El tubo fue lavado dos veces con 1 ml de cloroformo-metanol (2:1) y pasado por el filtro. Finalmente, los extractos lipídicos obtenidos se llevaron a seco con nitrógeno a 37 °C hasta su posterior metilación como con las muestras de suero.

4.3.3 Metilación de los ácidos grasos

Los extractos lipídicos de las muestras de suero materno, suero fetal y placenta se metilaron por el método de Stoffel (Stoffel et al., 1959).

A los tubos con el extracto seco lipídico se les añadieron 1000 µl de Sustancia Metilante HCl-MeOH 5% (Supelco) y se agitaron en el vortex varias veces. Finalmente se incubaron a 100 °C durante 1 hora para obtener una correcta metilación. Una vez enfriados los tubos, se les añadieron 2 ml de hexano y 1 ml de agua bidestilada. Se agitaron los tubos y se recuperó la fase de hexano con una pipeta Pasteur. Se volvió a añadir 1 ml de hexano y tras agitar y reposar se volvió a recuperar la capa superior de hexano. Los tubos con hexano se juntaron y se secaron con N₂ a 55 °C. Una vez secos los extractos metilados se resuspendieron en 50 µl de hexano y se congelaron a -20 °C hasta el momento del análisis cromatográfico.

4.3.4 Análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

Los ácidos grasos metilados fueron cuantificados mediante cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases HP-6890 (Agilent Technologies, Inc. Palo Alto, CA) con una columna SP-2560 de 60m x 0.25mm id x 0.15 µm (Supelco. SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO). El horno fue programado a una temperatura inicial de 175 °C mantenida durante 30 minutos, que fue aumentando a una tasa de 5 °C/minuto hasta alcanzar 230 °C manteniéndose a esa temperatura durante 17 minutos. El detector y el inyector se fijaron a una temperatura de 240 °C y como fase móvil se usó helio a una presión de 290 kPa.

Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención con estándares de ácidos grasos (SIGMA- Aldrich, St. Louis, MO). El área de los picos fue cuantificada por normalización con el programa informático HPCHEM Station (Agilent, Barcelona, España).

4.4 Cuantificación de lisofosfolípidos (LP)

Los lisofosfolípidos fueron analizados mediante espectrometría de masas con inyección de flujo (FIA-MS/MS). Se añadieron 600 µl de metanol a 50 mg de tejido placentario, para ser homogeneizado con un homogeneizador MINILYS (Precellys). Después de la centrifugación a 1500xg durante 10 minutos, 20µl del sobrenadante fueron transferidos y usados para la preparación de la muestra. 10 µl de suero, 20 µl del extracto placentario y 10 µl de una solución estándar fueron diluidos con metanol conteniendo estándares internos para los diferentes grupos lipídicos. Después de agitar y centrifugar, los sobrenadantes se utilizaron directamente para los análisis FIA-MS/MS.

Las muestras fueron analizadas con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API4000 QTRAP 4000LC/MS/MS System (Sciex, Darmstadt, Germany) con un sistema de electrospray de ionización, el cual fue usado de forma positiva y negativa con un sistema cromatografía líquida (Agilent, Waldbronn, Germany). El análisis MS/MS fue realizado monitorizando una reacción múltiple. El posterior análisis estadístico fue realizado con el *software* Analyst 1.5.1.

4.5 Cuantificación de aminoácidos

Los aminoácidos fueron cuantificados por HPLC con el uso del Método de Pico-Tag (Waters, Milford, MA). Las muestras fueron deproteinizadas por ultrafiltración (Ultrafree; Millipore, Billerica, MA). Se realizó una derivatización con precolumna de los aminoácidos con fenilisotiocianato, seguido de una separación de los aminoácidos derivatizados mediante HPLC en columna de gas inversa. Los aminoácidos fueron detectados mediante medidas de absorbancia del líquido eluido de la columna a 254 nm. El software Millennium 32 (Waters) fue utilizado para la identificación de los aminoácidos y el cálculo de los resultados.

4.6 Análisis de citoquinas

El análisis de las citoquinas se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos y Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada. Para el análisis múltiple de los analitos se utilizaron dos Kits específicos para humanos de la casa comercial LINCOpnex™ (Linco Research, St Charles, MO, USA):

MATERIAL Y MÉTODOS

- TNF α (CV:7.8% y Leptina (CV: 7.9%) (Cat.#HADK2-61K-B).
- Adiponectina (CV:9.2%) y resistina (Cat.#HAD1-67K).

Estos biomarcadores se analizaron en el equipo Luminex*200™System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este equipo utiliza la tecnología X-Map que se desarrolla en base a la citometría de flujo, el láser, las microesferas y el procesamiento de señales digitales.

Los valores de adiponectina se expresan en mg/ml, los de leptina en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y los de TNF α en ng/l.

5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS Y MEDIADORES DE LA INSULINA MEDIANTE WESTERN BLOT

Se extrajeron proteínas del tejido placentario siguiendo métodos descritos anteriormente con algunas modificaciones. Se descongelaron 100 g de placenta en hielo y se homogeneizó el tejido (también en hielo) con un politrón añadiendo 1 ml de tampón de lisis comercial (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton, 2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β -glicerofosfato, 1mM Na₃VO₄, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, de Cell Signaling Technology, INC). A este tampón se le añadió una solución de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) a una concentración final de 1mM. Esta solución se añadió en fresco, justo antes de realizar la lisis. Tras la lisis, los extractos se centrifugaron a 10000xg durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente se tomó el sobrenadante y se guardó a -80 °C hasta la posterior determinación de proteínas y realización del WB. .

5.1 Cuantificación de proteínas

La determinación de la cantidad de proteína presente en las muestras se realizó mediante el ensayo de Bradford (Bradford 1976). Para ello se elaboró una recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) a concentraciones conocidas en un volumen final de 100 μl en solución salina (NaCl) y 1000 μl de reactivo Bradford (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU). Las muestras

problema se diluyeron 1/2 en salino y se tomaron 10 μ l de estas diluciones que se completaron hasta 100 μ l con salino. A estas diluciones se le añadió 1 ml de reactivo de Bradford y se dejó actuar durante 5 minutos, tras los cuales se procedió a la lectura en un espectrofotómetro (6715 UV spectrophotometer, Jenway, Reino Unido). La medida de absorbancia en el espectrofotómetro se realizó a 595 nm. Como blanco se empleó una muestra con 1000 μ l de reactivo de Bradford y 100 μ l de solución salina. En la Figura 12, se muestra un ejemplo de la recta de calibrado obtenida.

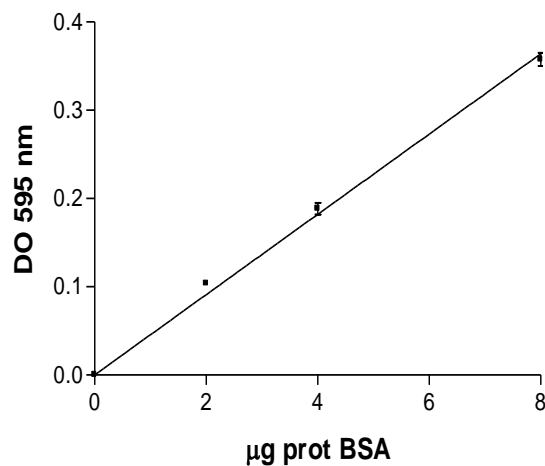


Figura 12. Recta patrón de BSA para cuantificación de proteínas. Se utilizó BSA a las concentraciones de 2, 4 y 8 mg/mL realizando el ensayo por triplicado. La absorbancia para cada concentración de BSA se representa en el eje Y, y fue medida a 595 nm.

5.2 Electroforesis

Las proteínas se separaron mediante electroforesis reductora en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE acrónimo en inglés de *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Para ello se utilizó una cubeta de electroforesis vertical Mini-PROTEAN II (BioRad, Richmond, CA, EEUU). Se preparó y depositó el gel separador en el espacio que queda entre los cristales de la cubeta montados con separadores de 1 mm de espesor (Figura 13). Una vez polimerizado el gel separador, se preparó el gel concentrador y se dispuso sobre el gel separador y rápidamente se introdujo el peine de espesor idéntico al de los separadores, que da forma a los pocillos donde posteriormente se colocan las muestras a separar. Como agentes inductores de polimerización se usaron persulfato amónico (APS) al 10 % y tetrametiletildiamina (TEMED) ambos de BioRad (Richmond, CA, EEUU).

MATERIAL Y MÉTODOS

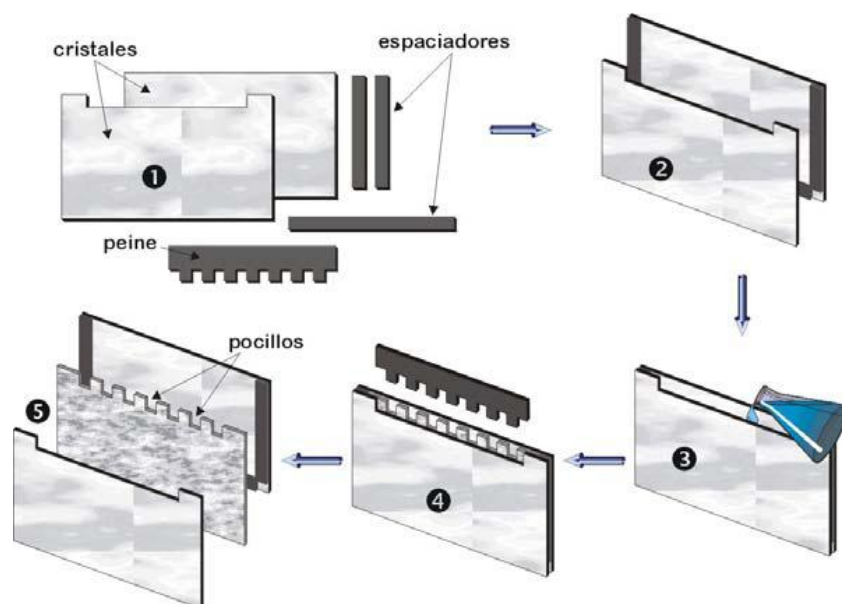


Figura 13. Colocación de los cristales en los que se vierten los geles de electroforesis.

La composición de los geles separador y concentrador se especifica a continuación, en la tabla 3.

Tabla 3. Composición gel separador al 12% de acrilamida.

	VOLUMEN
Acrilamida -bisacrilamida al 30 % (Sigma, EEUU)	2 ml
Tris -HCl 1M, pH 8.8 (Sigma, EEUU)	1.875 ml
SDS 20 % (Sigma, EEUU)	25 μ l
Agua MILIQ	1.050ml
Persulfato amónico 10 % (APS) (Sigma, EEUU)	50 μ l
TEMED (Sigma, EEUU)	4 μ l

Tabla 4. Composición del gel concentrador al 4% de acrilamida.

	VOLUMEN
Acrilamida -bisacrilamida al 30 % (Sigma, EEUU)	0.415 ml
Tris -HCl 1M, pH 6.8 (Sigma, EEUU)	0.315 ml
SDS 20 % (Sigma, EEUU)	12.5 μ l
Agua MILIQ	1.050 ml
Persulfato amónico 10 % (APS) (Sigma, EEUU)	25 μ l
TEMED (Sigma, EEUU)	2 μ l

Seguidamente se montó la cubeta de los geles y se vertió el tampón de recorrido compuesto de (30 g de Tris HCl 50 mM, 144 g de glicina 384 mM BioRad (Richmond, CA, EEUU) y SDS al 0.2 % en un volumen de 1 L de agua destilada) hasta la marca indicada en la cubeta según el número de geles preparados (Figura 14).

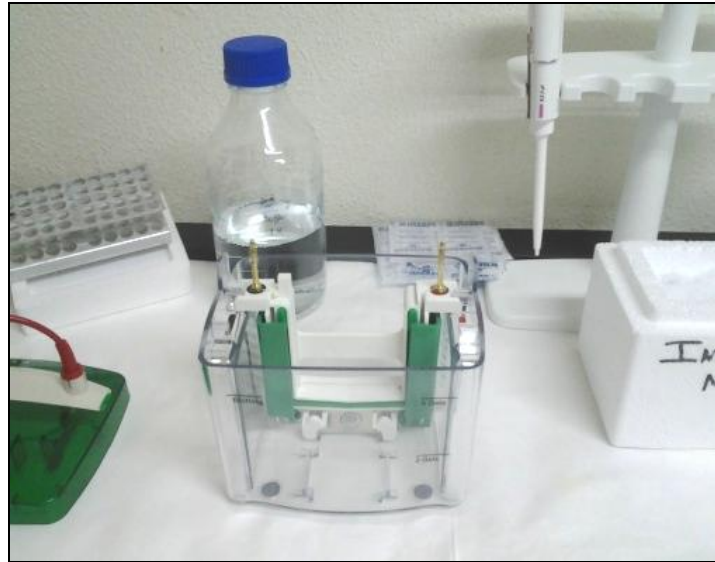


Figura 14. Cubeta de geles de electroforesis con tampón de recorrido. Los cristales montados no se aprecian en la fotografía, pero se encuentran en el soporte que tiene los bordes verdes.

Se prepararon las muestras a la misma concentración de proteína para que los resultados obtenidos fueran comparables. La cantidad de proteína cargada por calle osciló entre 15-30 μg . A las muestras se les añadió el tampón de carga (azul de bromofenol 0.0004%, 20% β -mercaptoetanol, 8% SDS, 40% Glicerol, 250 mM Tris-HCl pH6.8) necesario y se calentaron 5 min a 95 $^{\circ}\text{C}$, para permitir la desnaturalización de las proteínas.

A continuación se depositaron los estándares de peso molecular marcados con color (Dual Color Precision Plus Protein Standards, BioRad, Richmond, CA, EEUU) y las muestras en los pocillos (10-30 μl por pocillo). Los electrodos se conectaron a una fuente eléctrica y se separaron las muestras a voltaje constante (90 V) hasta que abandonaron el gel concentrador y entraron en el gel separador, aumentando entonces el voltaje (120 V) para una óptima separación de las muestras. La separación se detuvo en el momento que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.3 Transferencia de proteínas y detección inmunoquímica

Tras su separación en gel, las muestras se transfirieron mediante un sistema húmedo a membranas de Millipore™ de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (0.45µm de Millipore Corporation, Bedford, MA, EEUU), previamente humedecidas y activadas en metanol durante 5 min (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) y posteriormente lavadas en agua MILIQ. La transferencia se realizó en frío, a 90 V durante 90 min en una cubeta de transferencia Mini Trans-Blot de BioRad, utilizando un tampón de transferencia preparado para un volumen final de 700 ml: 490 ml de agua destilada, 140 ml de metanol (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) y 70 ml de tampón de transferencia 10X (30,3 g de Tris-HCl y 136,75 g de glicina en 1 L de agua destilada).

Una vez concluida la transferencia se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS-T con un 2% de BSA y en agitación. Finalizado el bloqueo se incubó la membrana con el primer anticuerpo a la concentración adecuada en PBS-T + BSA al 2% a 4 °C durante toda la noche en agitación. Los **anticuerpos primarios** utilizados fueron:

- **IgG policlonal de conejo** que reconoce específicamente las proteínas humanas: **ERK 1/2** fosforilado en los residuos Thr202/Tyr204; **Akt** fosforilado en el residuo Ser473; **IRS 1 e IRS 2**, ambos fosforilados en el residuo Tyr 612; **EL** contra el extremo N-terminal de la proteína; **FATP-1** contra los aminoácidos 250-350 de la proteína humana; **MFSD2a**, contra un fragmento peptídico de 18 aminoácidos próximos al extremo carboxilo de la proteína humana; **GLUT-1**, contra un fragmento peptídico que engloba los aminoácidos 478-492 de la proteína humana y **β-actina**.

- **IgG monoclonal de ratón** que reconoce específicamente las proteínas humanas: **Proteína ribosomal Humana** fosforilada en los residuos de Ser (235-236); **A-FABP** contra la molécula completa de origen humano; **LPL** contra la molécula completa de origen humano, de ratón o de vaca; **FATP-4** contra la molécula completa de origen humano; **FAT** contra la molécula completa procedente de rata o de origen humano.

Tras la incubación con el primer anticuerpo, se realizaron tres lavados con PBS-T en agitación, a temperatura ambiente, durante 10 min cada uno. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario específico anti-conejo o anti-ratón según el caso,

conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EEUU), y se incubaron durante 1 h en tampón de bloqueo. En la Tabla 5, se especifican las diluciones de trabajo para todos los anticuerpos empleados en Western blot, así como las casas comerciales y los tamaños de las proteínas a las que se unen. Posteriormente se lavó con PBS-T, 5 veces durante 10 min cada lavado.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en Western blot y condiciones de uso

IgG policlonales de conejo				
	Marca	Tamaño proteína	Dilución Ac primario	Dilución Ac secundario
α p-Akt 1/2/3 (Ser 473)	Santa Cruz	60 KDa	1/1000	1/5000
α p-ERK 1/2(Thr 202/Tyr 204)	Santa Cruz	44KDa	1/1000	1/5000
α -p-IRS-1/2 Antibody (Tyr 612)	Santa Cruz	170-185 KDa	1/5000	1/5000
α -EL	Abcam	57 KDa	1/500	1/5000
α -FATP-1	Abcam	75 KDa	1μg/ml	1/5000
α- MFSD2a	Abcam	60 KDa	1μg/ml	1/5000
α - GLUT-1	Abcam	25 KDa	1/10000	1/20000
α-β-actina	Sigma	42 KDa	1/5000	1/20000
IgG monoclonales de ratón				
α -p-Ribosomal Protein S6 (Ser 235/236)	Santa Cruz	28 KDa	1/1000	1/5000
α - A-fabp	Santa Cruz	15 KDa	1/5000	1/5000
α -LPL	Abcam	53 KDa	1/1000	1/5000
α -FATP-4	Santa Cruz	70 KDa	1/1000	1/5000
α -FAT (CD36)	Abcam	80 KDa	1/1000	1/5000

La presencia de la proteína se reveló adicionando un sustrato que en presencia de la peroxidasa, genera un producto quimioluminiscente, mediante el Kit Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Waltham MA, EEUU) empleando 1 mL de

MATERIAL Y MÉTODOS

reactivo para cada membrana. Para la detección de la quimioluminiscencia se empleó el equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU). Las bandas de proteínas obtenidas fueron cuantificadas mediante densitometría usando el software Image J. Como control de carga se empleó β -actina, con respecto a la cual se expresaron los resultados normalizados.

6. LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para estudios in vitro se utilizó una línea celular (BeWo) procedentes de un coriocarcinoma gestacional maligno de placenta humana. Esta línea se adquirió de la colección europea de cultivos celulares (ECACC), y se mantuvo en el Servicio de Cultivos de la Universidad de Murcia, donde además se realizaron los experimentos. Para su conservación, las células se mantuvieron congeladas a -196°C en su medio de cultivo F12 con 20% de suero de ternera fetal (FBS) y con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU).

Esta línea celular se cultivó en medio F12 con un 10% de suero de ternera fetal en frascos para cultivos de 75 cm^2 (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania). Al medio se le añadió glutamina 2 mM, penicilina (100 UI) y estreptomina (100 mg/ml). Las células se cultivaron a la densidad de $80.000\text{ células/cm}^2$, y el medio se cambió cada 48 horas. En el día 5 los cultivos estaban casi confluentes (Figura 15), se realizó el subcultivo y tras ser contadas, y con la viabilidad medida, se sembraron con una densidad celular de $80000\text{ células/cm}^2$.

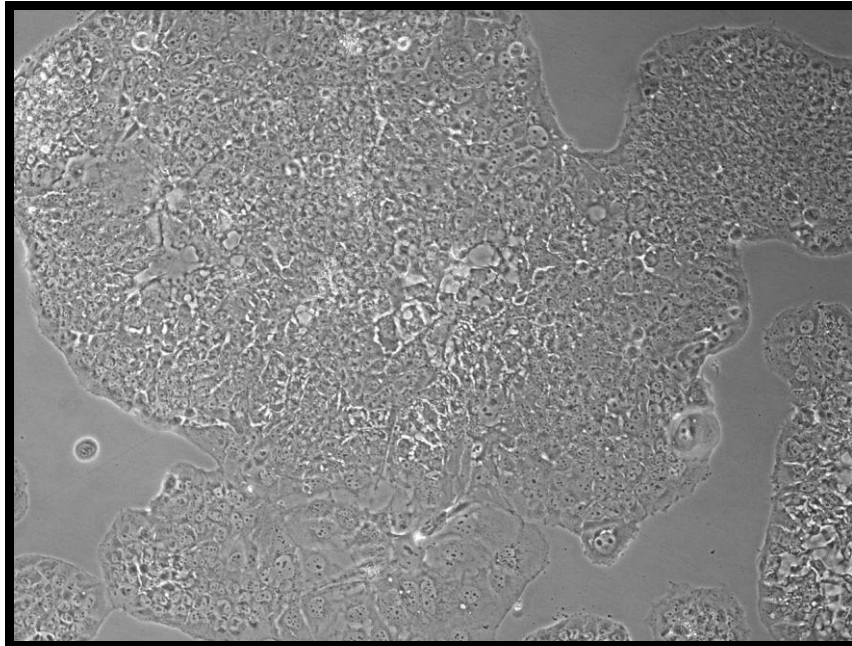


Figura 15. Cultivo de células BeWo en el día 5, antes de ser subcultivadas. Obsérvese la fusión de los citoplasmas de las células, formándose sincitios.

6.1 Subcultivo

Para realizar los subcultivos se utilizó tripsina al 0.25% y EDTA a una concentración de 0.57 mM.

En primer lugar se quitó el medio de las células y se añadió 1-2ml de tripsina con una pipeta Pasteur, para lavar los frascos y eliminar cualquier resto de medio que pudiera quedar, ya que el suero presente en el medio de cultivo inactiva la tripsina.

El contenido de este primer lavado se recogió en tubos de 50 ml que ya llevaban 2 ml de medio. Después se añadieron a cada frasco 2 ml de tripsina y se mantuvieron en una estufa a 37 °C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió medio de cultivo para inactivar la tripsina (como mínimo el doble del volumen de tripsina utilizado), se recogió en contenido en los tubos de 50 ml y se centrifugó a 200xg durante 10 minutos. El *pellet* se resuspendió en 5 ml de medio aproximadamente y se procedió al conteo y determinación de la viabilidad celular.

6.2 Determinación de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul Tripán

Este método se basa en el hecho de que el colorante vital azul tripán es capaz de atravesar las membranas celulares introduciéndose en las células. Este colorante es

MATERIAL Y MÉTODOS

expulsado activamente por las células vivas manteniendo su aspecto brillante y refringente al microscopio, mientras que las células muertas acumulan este colorante en su interior, de tal modo que se observan al microscopio de un color azulado.

Para determinar la viabilidad celular de las muestras biológicas mediante esta técnica, se mezcló en una proporción 1:1 (v:v) la suspensión celular y una disolución de azul tripán (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU). A continuación, el recuento celular se llevó a cabo mediante el uso de un hemocitómetro Neubauer o mediante un contador automático (TC10 Automated Cell Counter, BioRad, Richmond, CA, EEUU).

El contaje en el hemocitómetro se realizó según la ecuación:

$$C = 10^4 \times A \times D$$

Donde C es la concentración expresada en células/ml. A es la medida del número de células determinadas en las cuadrículas del hemocitómetro y D es el factor de dilución empleado.

6.3 Autenticación de la línea celular BeWo

Las células BeWo procedentes del pase 17, fueron autenticadas mediante la obtención de su perfil genético por el análisis de los ocho marcadores STR (Short Tandem Repeats) más amelogenina para la determinación del sexo, recomendados por el *American National Standards Institute* (ANSI) en su documento "Authentication of human cell lines: Standardization of STR profiling" (ANSI/ATCC ASN-0002-2011). El perfil genético de las células analizadas coincidió en un 100% con el perfil de la línea BeWo (CCL-98). El experimento se realizó 3 veces por duplicado.

6.4 Estimulación de células BeWo con insulina e inhibidores de la vía señalización de la insulina

Las células se sembraron en frascos de cultivo de 12cm² (Falcon, Becton Dickinson, NJ, EEUU) a una densidad de 80.000 células/cm². Cuando las células habían alcanzado un 90% de confluencia aproximadamente, estaban preparadas para añadir los estímulos y realizar los experimentos.

Las células fueron sometidas a condiciones de privación de suero (medio sin suero ni glutamina) durante un periodo de 3 horas previo a su estimulación, con el objetivo de disminuir la actividad celular basal. Posteriormente se trataron durante una hora con los inhibidores de moléculas de señalización intracelular PD98059, inhibidor de MEK1, quinasa encargada de fosforilar ERK, y LY294002 inhibidor de PI3K, de la ruta de Akt, ambos de Sigma -Aldrich Co (Saint Louis, MO, EEUU). La concentración usada de estos inhibidores fue 50 μ M. Tras la adición de los inhibidores y transcurrida 1 hora se estimularon las células con una dosis de insulina 10nmol/l (Actrapid, Novo Nordisk, Plainsboro, NJ, EEUU) durante 24 horas, periodo tras el cual se lisaron las células para la extracción de proteína y análisis mediante Western blot de moléculas de señalización de la ruta de la insulina y de transportadores lipídicos. Además se dispuso de placas controles con células con medio de cultivo sólo, y otras con células en el mismo medio de cultivo y con el estímulo de insulina en la dosis de 10nmol/l. En resumen, los tratamientos realizados fueron:

Control: Células en medio de cultivo, sin insulina y sin inhibidores (Figura 16A)

Control + Insulina: Células en cultivo con insulina 10nmol/l, pero sin inhibidores (Figura 16B).

LY: Células en cultivo preincubadas con el inhibidor de Akt (Figura 17A). Como se observa en la fotografía, tras 25 horas de exposición al inhibidor, la mayoría de las células se habían despegado del frasco de cultivo, efecto derivado de la importancia que tiene la ruta de señalización de Akt en la regulación de la proliferación celular la formación y mantenimiento del citoesqueleto de actina. Esto repercutió en el modo de lisis de estas células, como se verá posteriormente.

LY+Insulina: Células en cultivo preincubadas con el inhibidor de Akt y posteriormente estimuladas con insulina (Figura 17B). Como se observa en la fotografía, las células también se despegaron ante la presencia de este inhibidor, a pesar de haber sido estimuladas también con insulina.

PD: Células en cultivo preincubadas con el inhibidor de ERK (Figura 18A). En este caso, no se observan células despegadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

PD + Insulina: Células en cultivo preincubadas con el inhibidor de ERK y posteriormente estimuladas con insulina (Figura 18B).

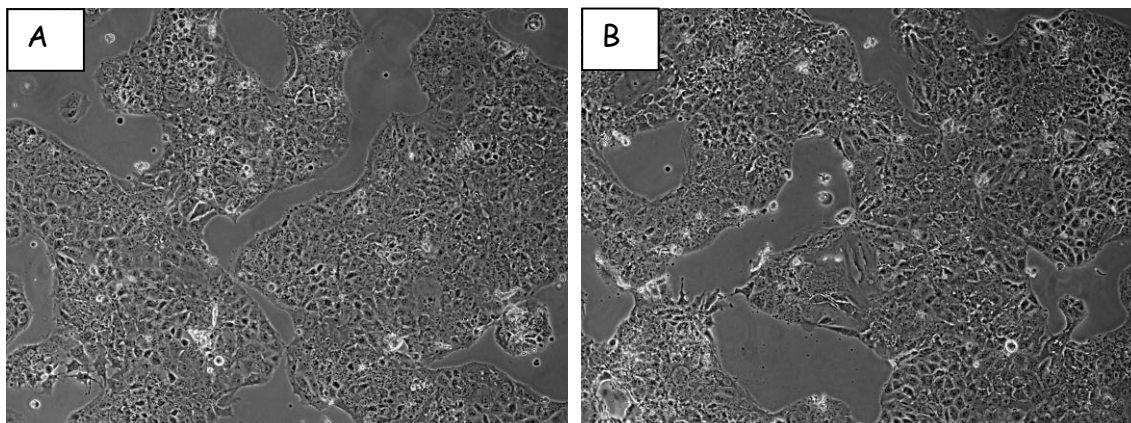


Figura 16. Fotografía de cultivo de células BeWo al microscopio de contraste de fases, aumento 10X. A) Control, Células BeWo sin preincubar con inhibidores y sin insulina, B) Células BeWo sin preincubar con inhibidores, estimuladas con insulina durante 24 horas. Ambas fotografías fueron tomadas en el mismo momento, a las 24 horas de la estimulación con insulina.

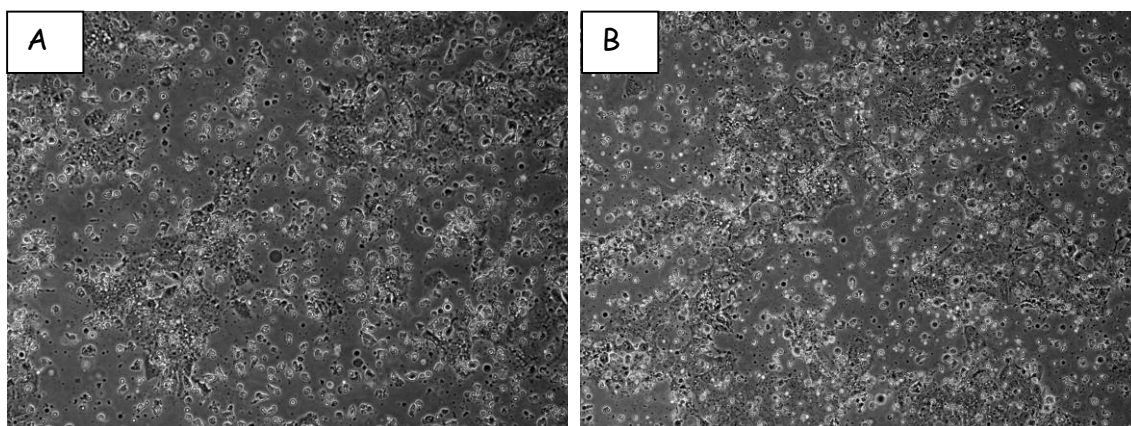


Figura 17. Fotografía de cultivo de células BeWo al microscopio de contraste de fases, aumento 10X. A) LY: Células BeWo preincubadas con LY pero no con insulina. B) LY + insulina. Células BeWo preincubadas con LY durante una hora y posteriormente estimuladas con insulina durante 24 horas. Ambas fotografías fueron tomadas en el mismo momento, a las 24 horas de la estimulación con insulina.

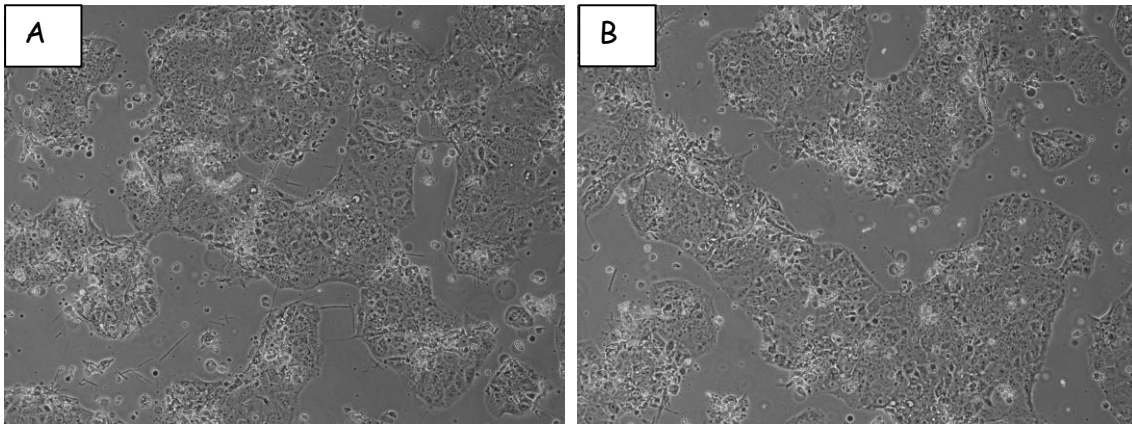


Figura 18. Fotografía de cultivo de células BeWo al microscopio de contraste de fases, aumento 10X. A) PD: Células BeWo preincubadas con PD pero no con insulina. B) PD+ insulina. Células BeWo preincubadas con PD durante una hora y posteriormente estimuladas con insulina durante 24 horas. Ambas fotografías fueron tomadas en el mismo momento, a las 24 horas de la estimulación con insulina.

6.5 Análisis por Western blot de mediadores de la insulina y de proteínas transportadoras de ácidos grasos.

Las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío antes de ser lisadas. Para ello se añadieron a los frascos 100 μ l un tampón de lisis comercial (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Tritón, 2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β -glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptina, de Cell Signaling Technology, INC). A este *buffer* se le añadió una solución de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) a una concentración final de 1mM. Esta solución se añadió en fresco, justo antes de realizar la lisis. Este buffer se dejó actuar unos 10 minutos como mínimo, y 30 minutos como máximo. La ruptura de las células se facilitó mediante el empleo de un raspador celular (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania), y se recogió el contenido con pipeta Pasteur.

En el caso de las células tratadas con el inhibidor de la ruta de Akt LY294002 y las cuales se habían despegado en su mayoría pero aún eran viables, se recogió primero el sobrenadante de los frascos con una pipeta pasteur y fue centrifugado a 200xg durante 10 minutos. Al *pellet* resultante, compuesto por todas las células que se habían despegado, se le añadieron 50 μ l del tampón de lisis, y el contenido se juntó con el lisado obtenido de las células adheridas en los frascos de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estos extractos se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente se tomó el sobrenadante y se guardó a -80 °C hasta la posterior determinación de proteínas y realización del Western blot, tal y como se describe en el apartado 5.

Mediante Western blot se cuantificaron las siguientes proteínas: la lipasa placentaria EL, las proteínas transportadoras FATP-1 y FATP-4 y la proteína de unión a ácidos grasos A-FABP, y los mediadores de la ruta de señalización de la insulina Akt y ERK fosforilados.

7. ESTADÍSTICA

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa informático SPSS versión 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, EEUU).

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (eem). La distribución normal de los datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para evaluar los efectos de los 3 grupos de estudio (control, GDM-dieta, GDM-insulina) se realizó un test de ANOVA de un factor con una prueba post hoc de Bonferroni para la comparación de medias. Las variables cualitativas se analizaron mediante χ^2 . Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

Todas las asociaciones se realizaron mediante correlación de Pearson. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS

2.1 Características antropométricas de la madre

En la Tabla 6 se muestran los datos correspondientes a la antropometría de la madre así como al peso e índice de masa corporal (IMC) tanto en el momento del reclutamiento (3^{er} trimestre) como en el momento del parto.

Tabla 6: Datos antropométricos de la madre.

	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
Edad de la madre (años)	31.1 ± 0.9 ^b	35.2 ± 0.8 ^a	32.5 ± 0.8 ^{ab}	0.003
Edad gestacional (semanas)	39.5 ± 0.15 ^a	38.1 ± 0.3 ^b	38.2 ± 0.2 ^b	0.000
Tasa de cesárea	26%	30%	30%	0.060
Estatura (m)	1.64 ± 0.01	1.64 ± 0.01	1.64 ± 0.01	0.990
IMC Pregestacional (Kg/m ²)	23.2 ± 0.8 ^b	26.2 ± 1 ^{ab}	28.2 ± 1.3 ^a	0.005
IMC 3 ^{er} trimestre (Kg/m ²)	26 ± 0.7 ^a	29 ± 1 ^{ab}	30.6 ± 1 ^b	0.003
IMC parto (Kg/m ²)	27.9 ± 0.71 ^b	30.3 ± 1.01 ^{ab}	31.8 ± 1.31 ^a	0.033
Δ peso total (Kg)	12.7 ± 0.64	11.2 ± 1.07	9.7 ± 1.49	0.152
Cintura reclutamiento (cm)	93.1 ± 1.53	99.9 ± 1.62	99.9 ± 3.65	0.061
Cadera reclutamiento (cm)	98.7 ± 3.89 ^b	109.4 ± 1.96 ^a	111.6 ± 3.54 ^a	0.013
Cintura/Cadera. reclutamiento	1.25 ± 0.34	0.91 ± 0.01	0.89 ± 0.02	0.399
Cintura parto (cm)	100.6 ± 1.38	103.2 ± 1.68	103.9 ± 3.79	0.600
Cadera parto (cm)	107.3 ± 1.59	114.4 ± 2.16	114.6 ± 3.5	0.063
Cintura/Cadera parto	0.94 ± 0.01	0.9 ± 0.01	0.9 ± 0.02	0.060

Resultados expresados como media ± eem. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los tres grupos. IMC, índice de masa corporal.

La edad de las embarazadas con GDM tratadas con dieta fue significativamente mayor que la edad de las embarazadas controles aunque no se observaron diferencias con respecto al grupo de embarazadas tratadas con insulina, por lo que no fue un factor clave para el desarrollo de la diabetes (Tabla 1). Por el contrario, la edad gestacional en el momento del parto fue significativamente menor para ambos grupos

RESULTADOS

de GDM con respecto al grupo control, ya que en estos grupos aumentaron los partos inducidos para evitar macrosomía en la descendencia.

Las mujeres con GDM presentaron un índice de masa corporal (IMC) mayor que las controles, especialmente las GDM tratadas con insulina. Estas diferencias se dieron tanto en el IMC previo al embarazo, reclutamiento (tercer trimestre, semana 24-32) y en el momento del parto. El número de sujetos con obesidad pregestacional (IMC > 30) fue similar entre los dos grupos con diabetes gestacional (n=7 GDM-dieta, n=9 GDM insulina).

En cuanto al incremento de peso total durante el embarazo, no detectamos diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. No obstante, las mujeres con GDM tendieron a adquirir menor peso durante el embarazo, pero estos resultados están también potenciados por la menor duración del embarazo en los grupos de GDM con respecto al control; así pues, nuestros resultados parecen reflejar un cierto fracaso en los objetivos en el control del peso en los grupos de gestantes con diabetes gestacional.

El perímetro de la cintura y de la cadera tendieron a ser mayores en las embarazadas diabéticas con respecto a las controles, tanto en el momento del reclutamiento como en el momento del parto, aunque, las diferencias sólo fueron significativas en las medidas de la cadera en el reclutamiento. Sin embargo, la relación cintura/cadera fue muy similar en los tres grupos en el momento del parto. No obstante, la dificultad en la medida de estos perímetros durante la gestación, por la situación y presentación fetal, así como por la cantidad del líquido amniótico, limita la validez de este índice como marcador del grado de obesidad en las madres embarazadas.

2.2 Medidas ecográficas y biometría fetal

Debido a las discrepancias en la edad gestacional en la que se realizaron las ecografías (las gestantes diabéticas que precisaron insulinización se reclutaron a una edad gestacional más avanzada que los controles y que las diabéticas que solo precisaron tratamiento dietético), tuvimos que ajustar los datos de las ecografías en unidades de z-score en el que las medidas se ajustan por edad gestacional de los

sujetos, tal y como se muestra en la Tabla 7 No se observaron diferencias en las medidas de biometría fetal en el reclutamiento, pero sí se observó una tendencia hacia una mayor circunferencia abdominal (CA) en los fetos de las diabéticas, siendo dicha circunferencia abdominal una medida de adiposidad fetal.

Tabla 7. Z-score variables ecográficas reclutamiento

Z-SCORE VARIABLES ECOGRÁFICAS RECLUTAMIENTO	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
Diámetro Biparietal (mm)	0.55 ± 0.16	0.91 ± 0.23	0.91 ± 0.17	0.293
Circunferencia Cefálica (mm)	-0.35 ± 0.23	0.16 ± 1.2	-0.16 ± 1.4	0.351
Circunferencia Abdominal (mm)	-0.03 ± 0.20	0.59 ± 0.2	0.58 ± 1.2	0.075
Longitud de Fémur (mm)	-0.2 ± 0.78	1.26 ± 0.28	0.45 ± 0.29	0.148

Resultados expresados como media ± eem.

En cuanto a la biometría fetal en el momento del parto, se obtuvieron resultados similares al reclutamiento, observándose de nuevo una tendencia hacia mayor z-score de la circunferencia abdominal (Z-CA) en ambos grupos de diabéticas (Tabla 8). Además, si comparáramos directamente mediante t-Student el grupo control con respecto a las GDM tratadas con insulina, las diferencias eran significativas (p=0.02). Este hecho es de gran importancia, ya que la circunferencia abdominal es una medida de adiposidad del recién nacido, siendo un indicador de obesidad en el futuro. Las medidas del z-score del CA tanto de la ecografía del reclutamiento como la del parto, se correlacionaron con el z-score del peso del recién nacido, así como con los pesos pregestacional, reclutamiento y parto de las madres (Tabla 9).

RESULTADOS

Tabla 8. Z-score variables ecográficas parto

Z-SCORE VARIABLES ECOGRÁFICAS PARTO	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
Diámetro Biparietal (mm)	0.15 ± 0.13	0.38 ± 0.25	0.54 ± 0.21	0.433
Circunferencia Cefálica (mm)	-1.36 ± 0.2	-0.81 ± 0.25	-0.66 ± 0.25	0.097
Circunferencia Abdominal (mm)	-0.30 ± 0.22	0.27 ± 0.25	0.43 ± 0.20	0.071
Longitud de Fémur (mm)	0.87 ± 0.23	0.87 ± 0.23	0.93 ± 0.28	0.979

Resultados expresados como media ± eem.

Tabla 9. Correlaciones del z-score de la circunferencia abdominal con parámetros antropométricos maternos

	Z-Score CA reclutamiento		Z-Score CA parto	
	r	p	r	p
Peso materno pregestacional	0.240	0.04	0.197	0.097
Peso materno reclutamiento	0.295	0.011	0.263	0.028
Peso materno parto	0.281	0.019	0.258	0.03
Z-score peso recién nacido	-0.002	0.987	0.281	0.021

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para p < 0.05. CA, Circunferencia abdominal.

2.3 Medidas antropométricas de los recién nacidos

Debido a las anteriormente mencionadas diferencias en la edad gestacional, los valores de peso, talla e IMC del recién nacido se ajustaron por su edad gestacional mediante z-score. El z-score del peso del recién nacido tendió a ser mayor en los nacidos de madres que habían precisado insulina para controlar su diabetes gestacional, aunque las diferencias no fueron significativas entre los tres grupos (p=0,409) debido a que el número de sujetos fue bajo para estimar estas variables

antropométricas (Figura 19). En cuanto a la macrosomía (peso al nacer mayor de 4000g), en este estudio sólo encontramos un niño con peso superior a 4000g, debido a la menor edad gestacional de las mujeres con GDM, ya que la tasa de cesárea aumenta en estas mujeres, para evitar precisamente la macrosomía. Aún así, el z-score del peso se correlacionó significativamente con la circunferencia abdominal fetal en el momento del parto (Tabla 9). Además, el peso al nacimiento de estos niños se correlacionó directamente con el peso materno (Figuras 20a, 20b, 20c).

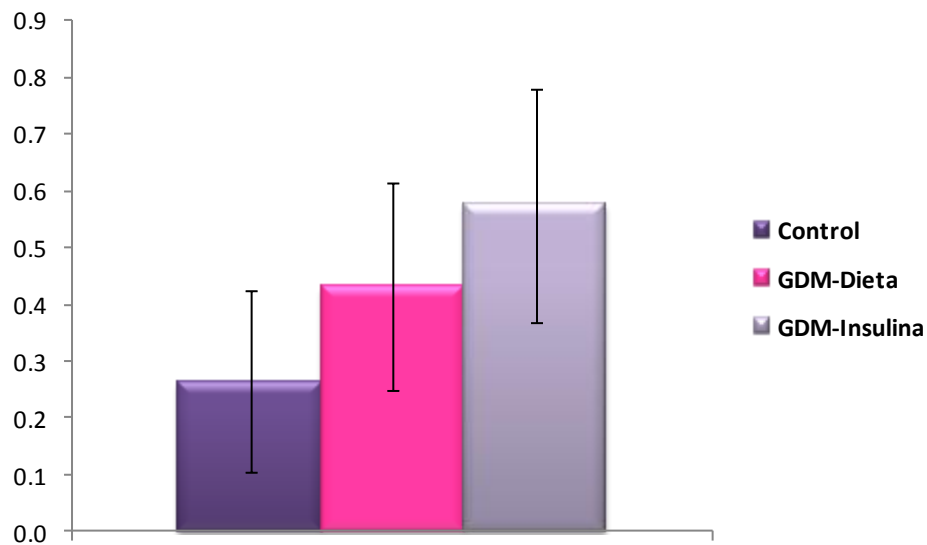


Figura 19. Z-score peso del recién nacido (media \pm eem).

RESULTADOS

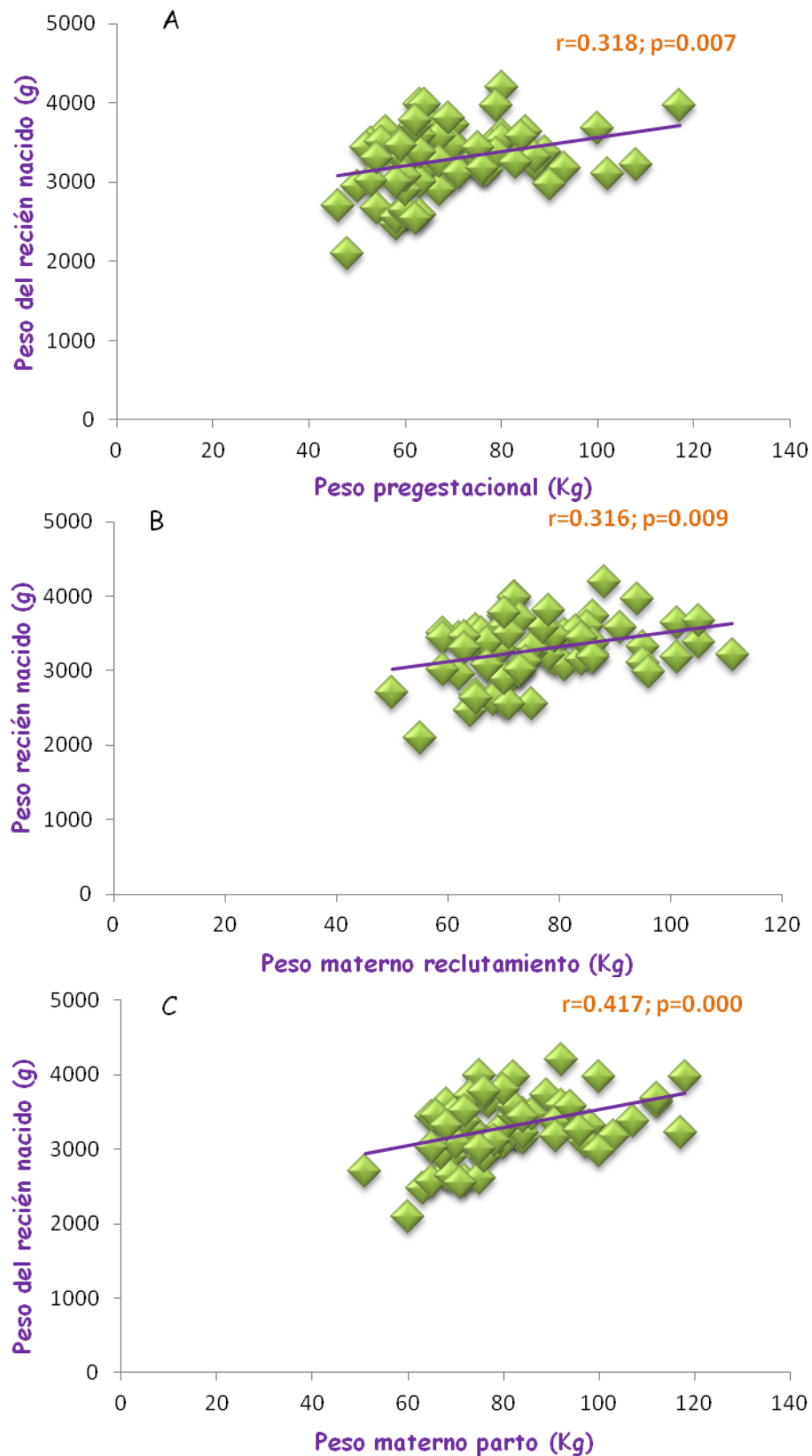


Figura 20. Correlación entre peso del recién nacido y A) peso pregestacional; B) peso materno en el reclutamiento; C) Peso materno parto.

En relación al índice de masa corporal (IMC) del recién nacido, no se encontraron diferencias debido a que los recién nacidos de madres diabéticas tendieron a tener no sólo más peso, sino también más talla que los recién nacidos del grupo control (Figuras 21 y 22). Sin embargo, la talla al nacimiento está más determinada por factores genéticos que por otros factores del ambiente intrauterino como puede ser el control glucémico de la madre.

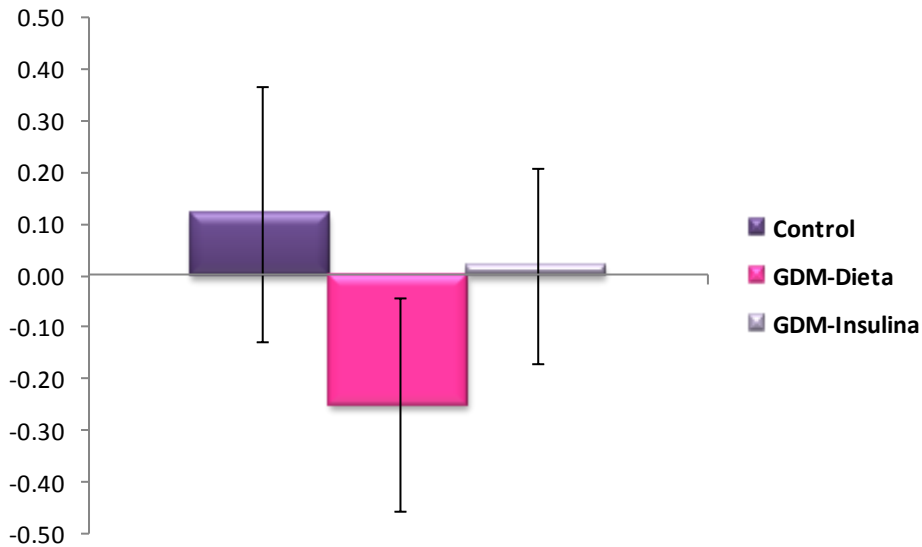


Figura 21. Z-score índice de masa corporal del recién nacido (media ± eem). Diferencias no significativas

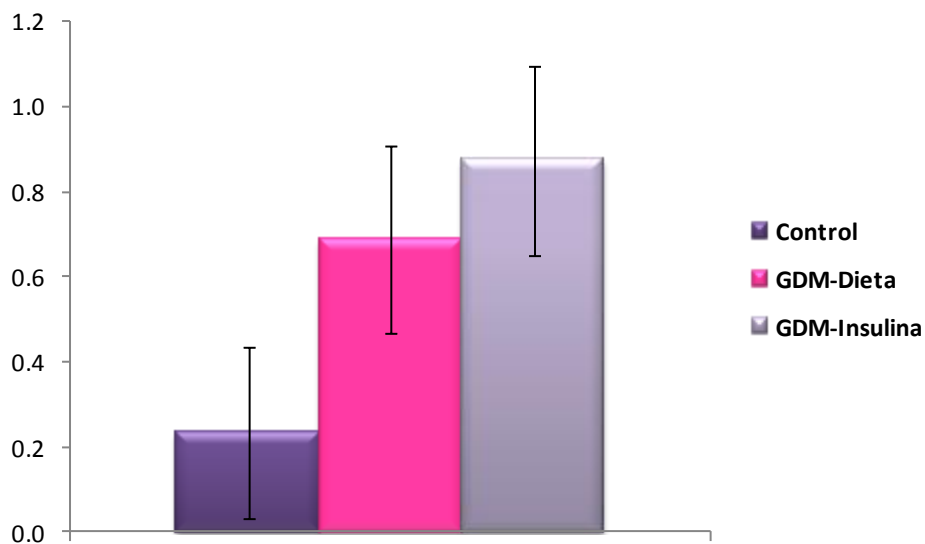


Figura 22. Z-score de la longitud del recién nacido (media ± eem). Diferencias no significativas.

RESULTADOS

2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LA MADRE (RECLUTAMIENTO Y PARTO) Y DEL RECIÉN NACIDO

2.1 Parámetros glucídicos

En la Figura 23 se muestran las cifras de glucosa en suero materno (reclutamiento y parto) y en suero del recién nacido (suero venoso umbilical). Como era de esperar, en el tercer trimestre (momento del reclutamiento), antes del inicio de cualquier tratamiento, las cifras de glucosa en suero materno fueron significativamente mayores en las diabéticas que posteriormente precisaron tratamiento con insulina para controlar su glucemia ($p=0.007$). En el momento del parto, y a pesar de que las mujeres diabéticas habían sido tratadas, los valores de glucosa siguieron manteniéndose mucho más altos en los dos grupos de gestantes con GDM con respecto a las controles ($p=0.002$), aunque en todos los casos se encontraban dentro de la normalidad para la glucemia en adultos. Estos resultados reflejan que las gestantes diabéticas que inicialmente tenían más dificultad para conseguir los objetivos de control glucémico, siguieron presentando glucemias más elevadas a pesar del tratamiento con insulina (Figura 23).

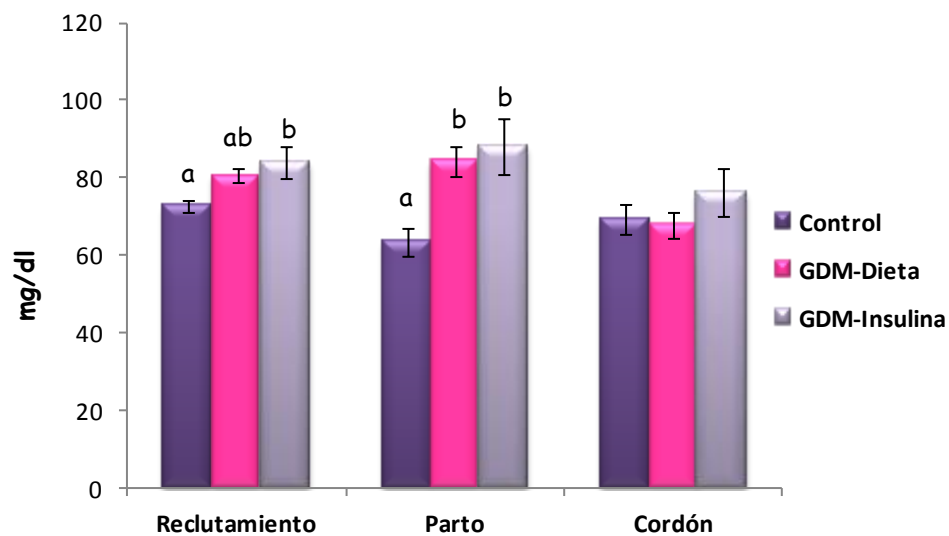


Figura 23. Glucosa en suero materno (reclutamiento y parto) y en suero venoso umbilical en el momento del parto (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los recién nacidos fueron capaces de regular su propia glucemia, ya que los valores de glucosa, medidos en suero venoso umbilical, no presentaron diferencias

significativas entre los grupos. Los valores sólo fueron ligeramente superiores en el grupo de recién nacidos cuyas madres habían recibido insulina (Figura 23).

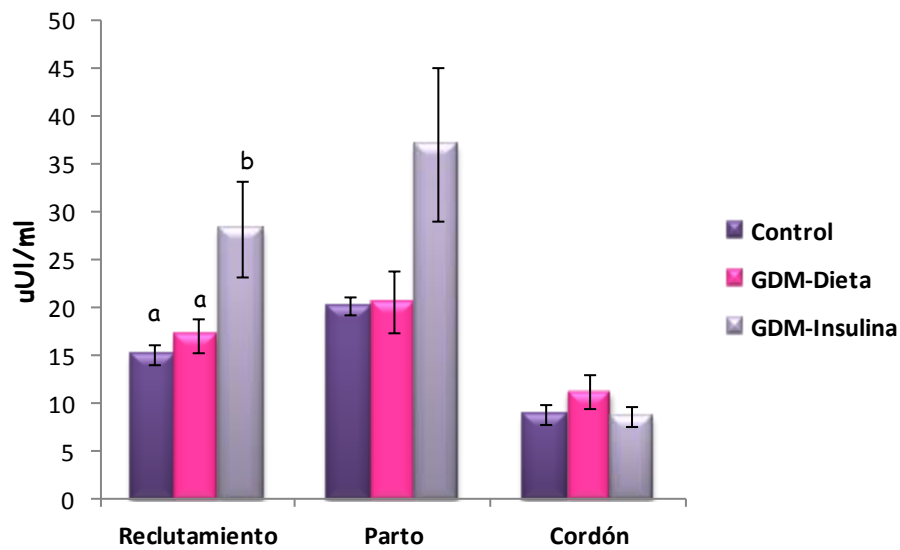


Figura 24. Insulina en suero materno (reclutamiento y parto) y en suero venoso umbilical del en el momento del parto (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los valores de insulina en suero fueron mayores en el reclutamiento en el grupo de mujeres que posteriormente requirieron tratamiento con insulina exógena para poder controlar sus glucemias, a pesar de que estas todavía no habían comenzado con el tratamiento (Figura 24). Esto es debido a que dichas mujeres presentan una alta resistencia a la insulina, como podemos ver reflejado en el índice HOMA (Figura 25). Sin embargo, en el momento del parto no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, aunque se mantuvo una tendencia de mayor insulina ($p = 0.067$), lo que concuerda con el elevado índice HOMA en el momento del parto (Figuras 24 y 25).

RESULTADOS

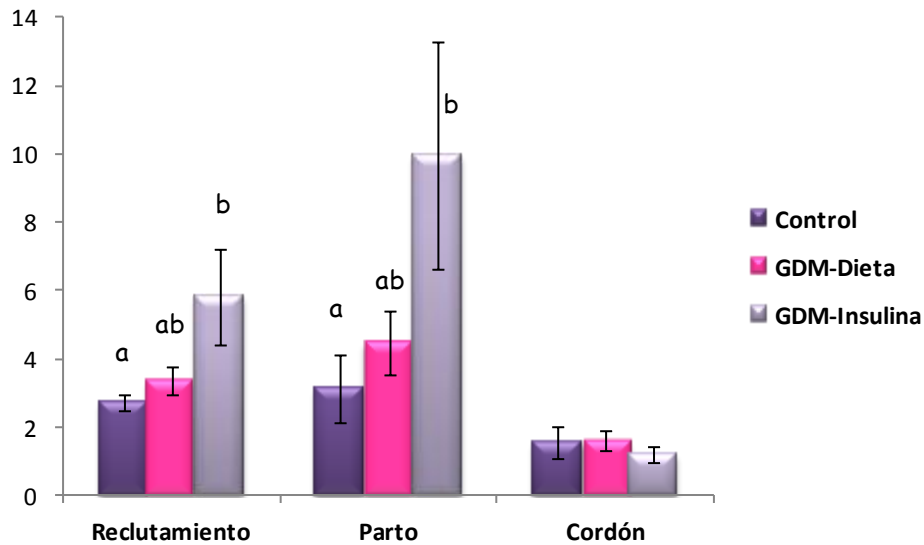


Figura 25. Índice HOMA en madres (reclutamiento y parto) recién nacidos (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los valores de insulina en el recién nacido no siguieron la misma tendencia que en sus madres. Se observaron valores más altos en los recién nacidos de madres tratadas con dieta, pero las diferencias no fueron significativas, siendo los valores muy similares entre los tres grupos. Esto podría deberse principalmente a que la insulina no es capaz de atravesar la placenta y los fetos son capaces de regular su propia glucemia sintetizando en el páncreas las cantidades necesarias de esta hormona para su metabolismo, independientemente del metabolismo materno (Figura 24). Tal y como se observó en los valores de glucosa y de insulina en los recién nacidos, tampoco se observaron diferencias en el índice de resistencia a la insulina (HOMA) entre los tres grupos (Figura 25), corroborándose de nuevo el hecho de que los fetos autorregulan su propia glucemia independientemente de las fluctuaciones maternas.

2.2 Parámetros lipídicos

Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos totales

En las figuras 26 a 28 se pueden observar los valores de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos totales tanto en suero materno (momento reclutamiento y parto) como en suero venoso umbilical.

Tanto en el reclutamiento como en el momento del parto, la concentración plasmática de colesterol total fue similar en los tres grupos de gestantes. En la figura 26

se puede evidenciar la hipercolesterolemia fisiológica materna asociada al embarazo, con valores superiores a 200 mg/dl en los tres grupos. En los recién nacidos, tampoco se encontraron diferencias en los valores de colesterol total entre los tres grupos estudiados.

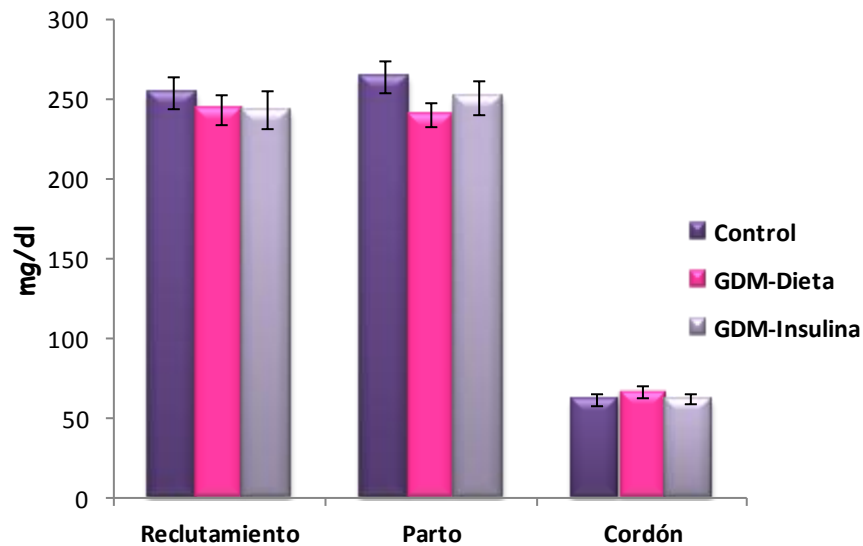


Figura 26. Colesterol total en suero materno (reclutamiento y parto) del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media \pm eem). Diferencias no significativas.

Los valores de triglicéridos plasmáticos en el momento del reclutamiento fueron mucho mayores en las madres que posteriormente recibieron insulina como tratamiento ($p=0.028$) con respecto a las controles. No obstante, en el momento del parto, no se detectaron diferencias en los niveles de triglicéridos en estos tres grupos (Figura 27), aunque de nuevo se observó una tendencia a niveles más elevados en el grupo de gestantes tratadas con insulina ($p=0.187$).

Sorprendentemente, en los recién nacidos de madres tratadas con insulina, los valores de triglicéridos fueron significativamente menores con respecto a los controles ($p=0.015$) y en los niños procedentes de madres tratadas con dieta fueron intermedios a los otros dos grupos (Figura 27). Estos valores de triglicéridos en los niños de madres diabéticas podrían ser el resultado de la captación de triglicéridos por parte del tejido adiposo fetal, tal como nos indican los datos de circunferencia abdominal fetal. También podrían ser explicados por una transferencia placentaria deficitaria de ácidos grasos, o por una acumulación de ácidos grasos en estas placentas.

RESULTADOS

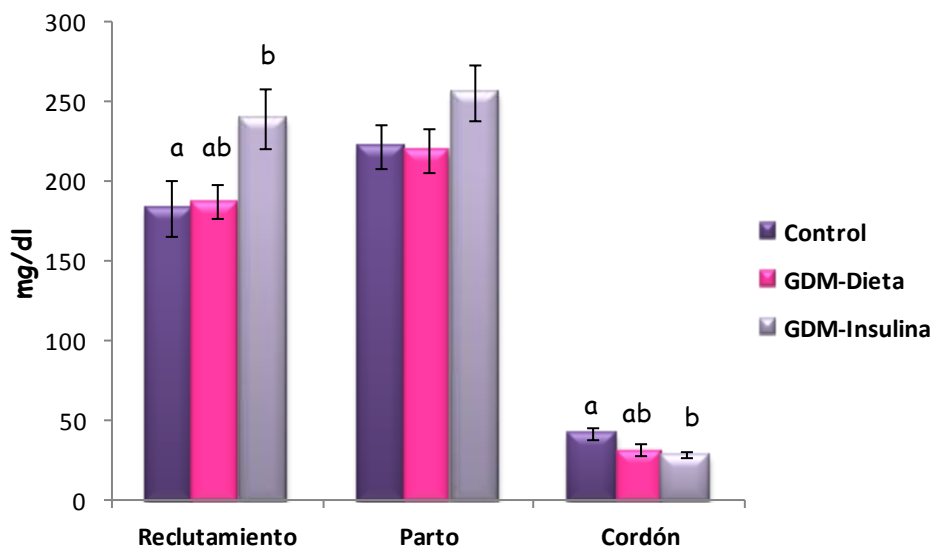


Figura 27. Triglicéridos en suero materno (reclutamiento y parto) y del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los ácidos grasos totales medidos en el plasma materno se comportaron de forma similar a los triglicéridos tanto en el reclutamiento como en el parto (Figura 28). Así pues, los valores fueron mucho más altos en el grupo de mujeres que posteriormente fueron tratadas con insulina, si los comparamos tanto con las tratadas con dieta como con las controles ($p=0.003$). Aunque en el momento del parto no se detectaron diferencias significativas entre los tres grupos de embarazadas, sí que se observó de nuevo una tendencia a valores más altos en el grupo de mujeres tratadas con insulina ($p=0.121$). Por el contrario, la cantidad total de ácidos grasos en el plasma venoso umbilical fue mucho menor en los hijos de madres que habían sido tratadas con insulina ($p=0.001$) (Figura 28), reafirmandose las hipótesis de la posible acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo de recién nacidos de diabéticas y/o, la captación deficitaria por parte de la placenta.

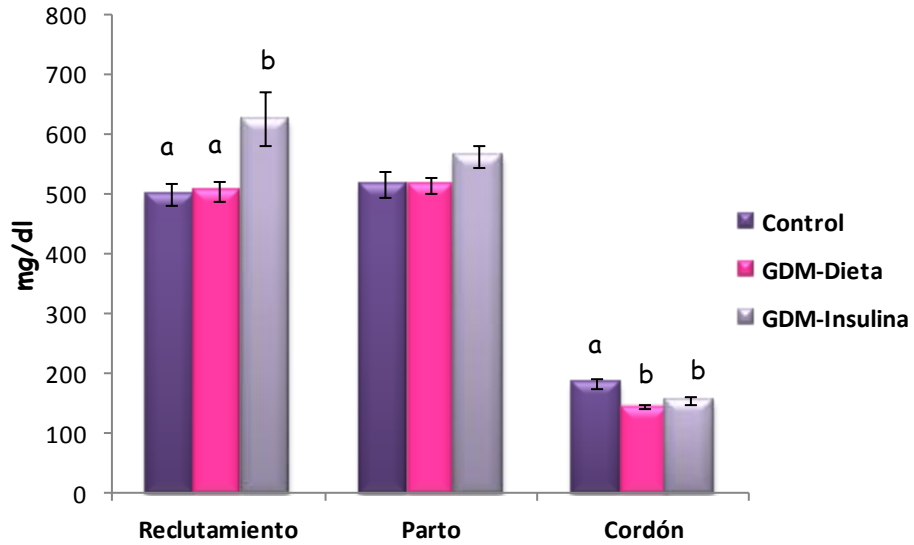


Figura 28. Cantidad total de ácidos grasos en plasma materno (reclutamiento y parto) y del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media ± eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En relación a los ácidos grasos saturados y poliinsaturados (Tabla 10), en el suero materno no se encontraron diferencias en el porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados entre los tres grupos de embarazadas en el momento del parto. En la placenta, tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de ácidos grasos saturados y poliinsaturados entre los tres grupos cuando se comparaban con los controles. Sin embargo, en los recién nacidos (Tabla 10) los ácidos grasos saturados fueron significativamente mayores en ambos grupos de diabéticas con respecto a los controles mientras que los ácidos grasos poliinsaturados tales como EPA (ácidos grasos poliinsaturados esenciales) y LC-PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga) estaban disminuidos en niños de madres con GDM, lo cual indicaría un transporte alterado en estas pacientes.

RESULTADOS

Tabla 10. Porcentajes de ácidos grasos en lípidos totales de suero materno, placenta y suero venoso umbilical.

	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
PARTO				
Saturados	33.53 ± 0.51	33.72 ± 0.42	33.45 ± 0.54	0.925
Monoinsaturados	25.41 ± 0.61	25.25 ± 0.64	25.52 ± 0.72	0.959
Poliinsaturados	40.64 ± 0.69	40.62 ± 0.7	40.67 ± 1	0.999
EPA				
PUFA				
PLACENTA				
Saturados	37.55 ± 0.19 ^{ab}	36.90 ± 0.25 ^b	37.91 ± 0.28 ^a	0.016
Monoinsaturados	11.87 ± 0.26 ^{ab}	12.71 ± 0.57 ^a	11.24 ± 0.28 ^b	0.046
Poliinsaturados	50.27 ± 0.27	50.11 ± 0.51	50.59 ± 0.4	0.709
EPA				
PUFA				
CORDÓN				
Saturados	37.44 ± 0.42 ^b	39.66 ± 0.34 ^a	40.44 ± 0.66 ^a	0.000
Monoinsaturados	22.72 ± 0.44 ^{ab}	23.88 ± 0.51 ^b	21.68 ± 0.6 ^a	0.019
Poliinsaturados	39.08 ± 0.52 ^a	35.79 ± 0.61 ^b	37.24 ± 0.54 ^{ab}	0.000
EPA				
PUFA				

Resultados expresados como media ± eem. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos. EPA: Ácidos grasos poliinsaturados esenciales; LC-PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

En cuanto a los ácidos grasos que contribuyen de forma esencial al desarrollo de estos niños, el % de DHA disminuyó en los niños de las gestantes diabéticas, a pesar de que aumentó en suero materno de las gestantes tratadas con dieta, tanto en el momento del reclutamiento como del parto (Figura 29).

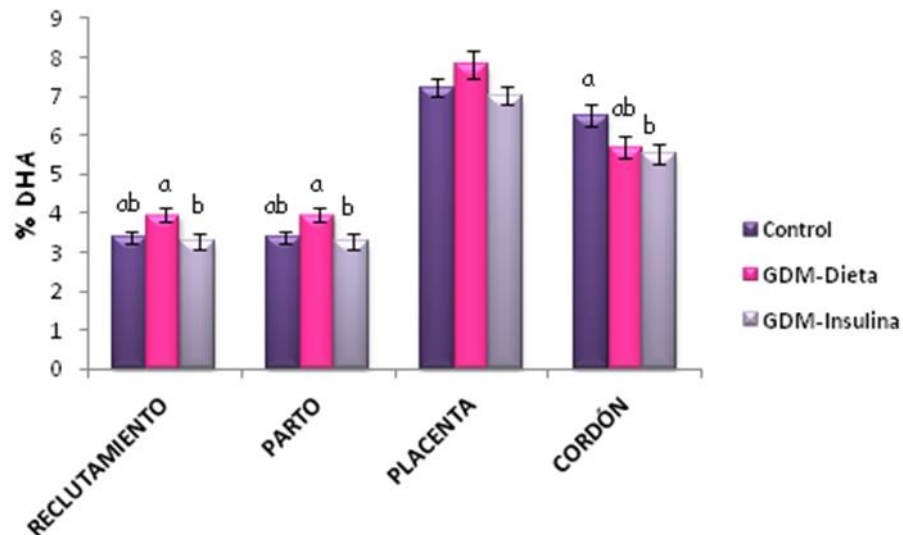


Figura 29. % de DHA en suero materno, placenta, y suero venoso umbilical (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Lisofosfolípidos (Liso-PL)

Recientemente se ha postulado que los lisofosfolípidos podrían ser una fuente de DHA en placenta, y dada la importancia de este ácido graso para el desarrollo neurológico de los niños, en este estudio decidimos analizar los niveles de estos lípidos, tanto en el suero materno (en el reclutamiento y en el momento del parto) como en la placenta y en el suero venoso umbilical (Figura 30).

RESULTADOS

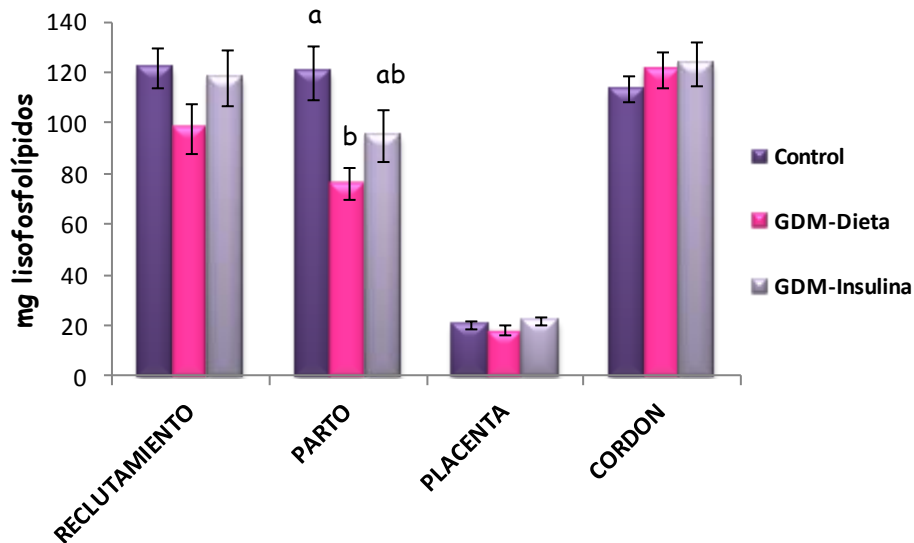


Figura 30. Valores absolutos (en mg) de lisofosfolípidos en suero materno, placenta, y suero venoso umbilical (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los niveles de liso-PL disminuyeron significativamente en el momento del parto en las gestantes diabéticas tratadas con dieta con respecto a las controles. A pesar de esta disminución, en suero venoso umbilical no hubo diferencias en los valores de liso-PL entre los tres grupos (Figura 30).

Sin embargo, tal y como se muestra en la figura 31, el % de DHA en los liso-PL fue mayor en las gestantes tratadas con dieta (en el reclutamiento, y se mantuvieron estos niveles en el momento del parto) (Figura 31). A pesar de ello, en placenta y cordón de los recién nacidos el % de DHA en liso-PL tendió a disminuir ($p=0.152$) en las gestantes diabéticas, lo cual podría ser debido a un incorrecto transporte placentario. Es de gran importancia destacar que no solo el % de DHA sino también las concentraciones absolutas de DHA en liso-PL de cordón tendieron a disminuir (Figura 32). Es muy interesante observar que la concentración de DHA en liso-PL de cordón son mucho mayores que en suero materno (Figura 32). Este hecho podría corroborar el transporte placentario preferencial de DHA al feto, también conocido como biomagnificación, lo cual pone de manifiesto la importancia de este ácido graso.

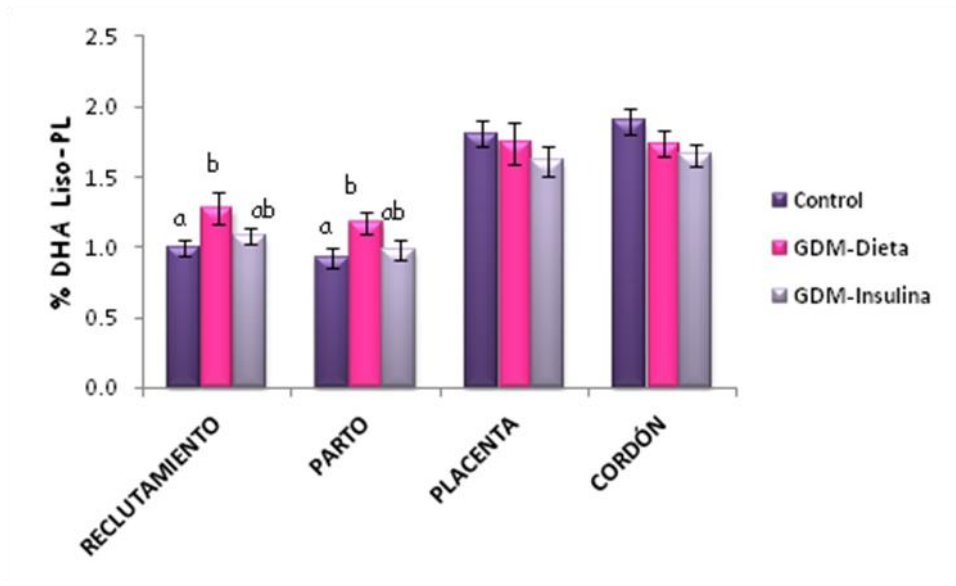


Figura 31. %DHA en lisofosfolípidos de suero materno (reclutamiento y parto), placenta, y suero venoso umbilical (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

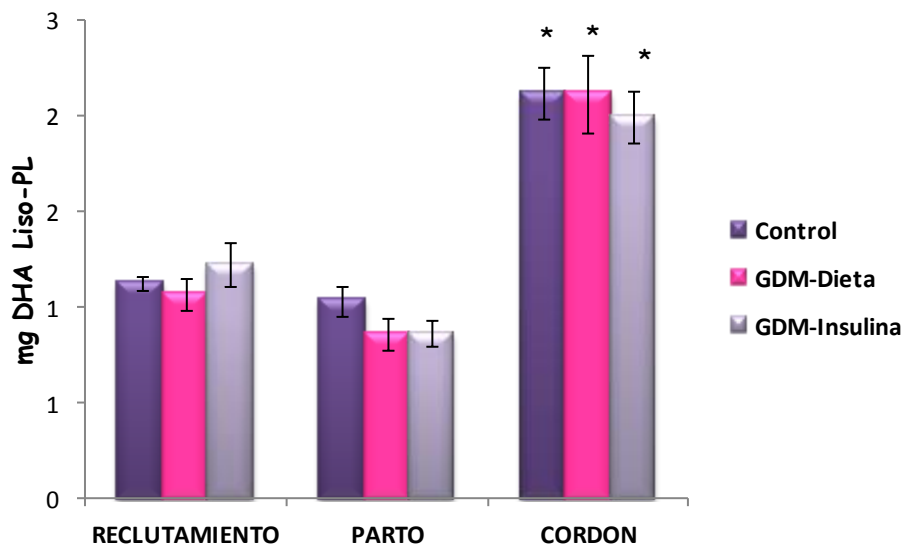


Figura 32. Valores absolutos (mg) de DHA en suero materno (reclutamiento y parto) y en suero venoso umbilical (media \pm eem). * indica diferencias significativas en los distintos compartimentos.

En cuanto al resto del perfil de ácidos grasos en lisofosfolípidos no se encontraron diferencias en las principales familias de AG (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, solo aumentaron los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) a nivel materno (Tabla 11).

RESULTADOS

Tabla 11. Perfil de lisofosfolípidos % en suero materno en el momento del reclutamiento, parto, en placenta y en suero venoso umbilical.

	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
RECLUTAMIENTO				
LISO SFA	74.46±0.74	73.16±0.93	73.83±0.82	0.559
LISO MUFA	11.2±0.38	11.26±0.4	10.37±0.35	0.207
LISO PUFA	14.35±0.47	15.58±0.81	15.8±0.62	0.155
LISO LC-PUFA	4.85 ^a ±0.16	6.21 ^b ±0.44	5.95 ^b ±0.29	0.002
PARTO				
LISO SFA	75.12±0.77	74.02±1.05	72.98±1.09	0.297
LISO MUFA	10.81±0.33	10.87±0.37	10.56±0.28	0.791
LISO PUFA	14.07±0.63	15.11±0.88	16.46±0.99	0.131
LISO LC-PUFA	4.96±0.19	5.74±0.27	5.62±0.31	0.061
PLACENTA				
LISO SFA	61.44±0.69	61.97±0.99	63.43±0.63	0.163
LISO MUFA	10.32±0.31	10.47±0.35	10.1±0.21	0.705
LISO PUFA	28.24±0.66	27.56±0.97	26.47±0.62	0.230
LISO LC-PUFA	19.09±0.58	18.88±0.89	18.17±0.65	0.717
CORDÓN				
LISO SFA	59.51±1.14	56.76±1.4	57.42±0.76	0.210
LISO MUFA	13.44±0.42	15.47±0.56	14.18±0.36	0.009
LISO PUFA	27.05±0.97	27.78±1.09	28.4±0.62	0.614
LISO LC-PUFA	17.21±0.62	17.88±0.75	18.06±0.49	0.616

Resultados expresados como media ± eem. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los tres grupos.; MUFA Acido graso monoinsaturado; SFA Acido graso saturado; LC PUFA Acido graso poliinsaturado de cadena larga.

2.3 Adipoquinas

Numerosos estudios revelan el importante papel que juegan las adipoquinas en el desarrollo de la resistencia a la insulina y su fisiopatología. Es por ello que en este estudio decidimos medir los niveles de algunas de ellas.

Los niveles de adiponectina en el reclutamiento fueron significativamente más bajos en las madres con GDM con respecto a las controles ($p=0.026$). Aunque en el momento del parto no existieron diferencias entre los tres grupos de gestantes, sí pudo observarse una tendencia hacia valores más bajos en las madres diabéticas, sobre todo en las tratadas con insulina ($p=0.082$) (Figura 33). Esto confirma que la adiponectina está disminuida en la diabetes gestacional, estando fuertemente relacionada con la resistencia a la insulina. Sin embargo, en este estudio no se encontraron correlaciones entre los niveles de adiponectina y el índice de resistencia a la insulina, ni en el reclutamiento ni en el parto.

Los niveles de adiponectina de los recién nacidos fueron muy superiores a los de sus madres, no observándose diferencias significativas entre ellos.

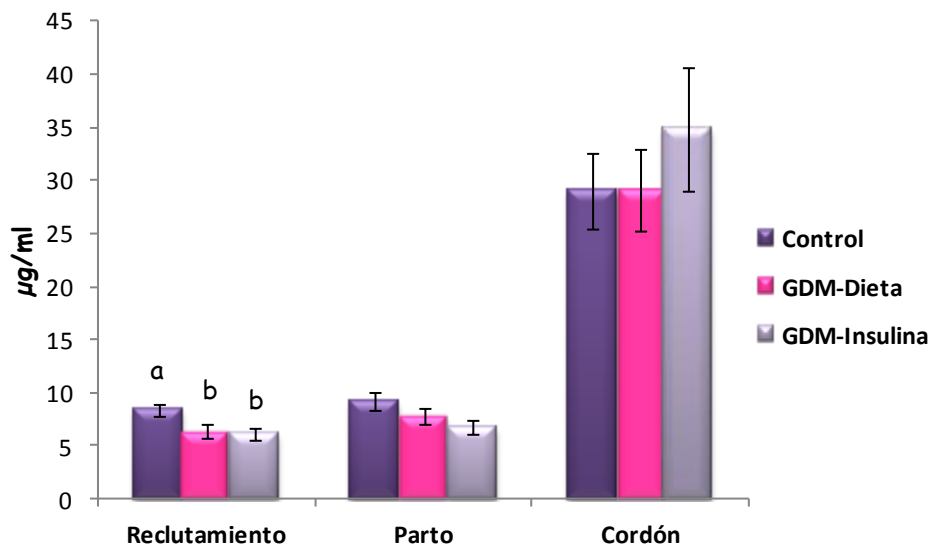


Figura 33. Concentraciones de **adiponectina** en suero materno (reclutamiento y parto) y del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media \pm eem). Letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Con respecto a la leptina (Figura 34), no se detectaron diferencias en las concentraciones de esta hormona entre los grupos, ni en suero materno (tanto en el

RESULTADOS

reclutamiento como en el parto), ni en los recién nacidos. A pesar de que existe controversia, la mayoría de los estudios de esta hormona en el embarazo apuntan hacia niveles más altos en GDM, utilizándola incluso como marcador de posible desarrollo de GDM en estados tempranos del embarazo. Nuestros resultados no concuerdan con estos estudios, quizá debido a que en nuestro caso las mujeres con GDM más severa están tratadas con insulina.

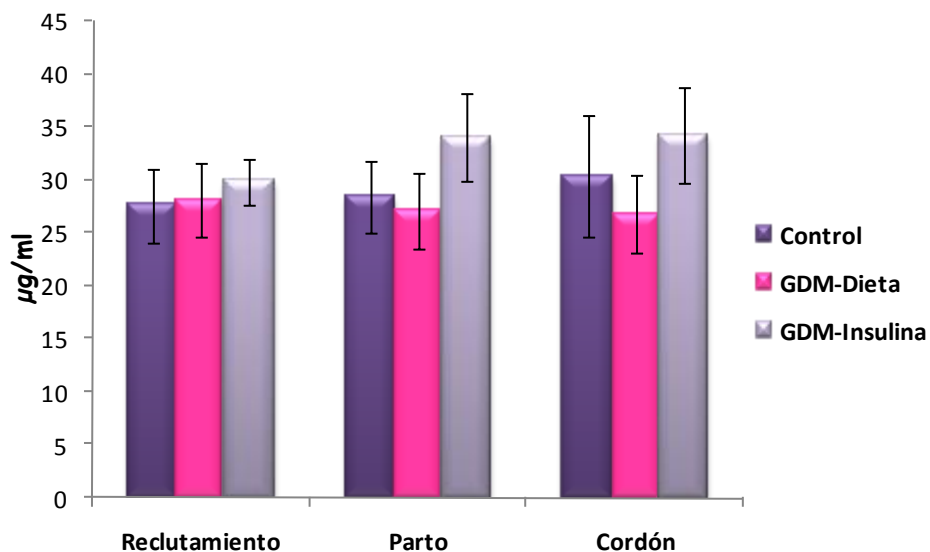


Figura 34. Concentraciones de **leptina** en suero materno (reclutamiento y parto) y del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media \pm eem). Diferencias no significativas.

En cuanto a los valores de resistina en madres y en recién nacidos (Figura 35), no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, aunque aumentaron a lo largo del tercer trimestre, probablemente debido a que esta hormona está asociada a la resistencia a la insulina, la cual aumenta en este periodo de la gestación. Sin embargo, en el reclutamiento se observó un aumento casi significativo ($p=0.068$) en el grupo de diabéticas que posteriormente fueron tratadas con dieta, aunque no en las tratadas con insulina, lo cual no tiene mucho sentido, ya que estas últimas tienen una diabetes más severa y por tanto una resistencia a la insulina mayor. En nuestro estudio los valores de resistina en suero materno y de recién nacido no se correlacionaron con el índice de resistencia a la insulina ni en el tercer trimestre ni en el momento del parto.

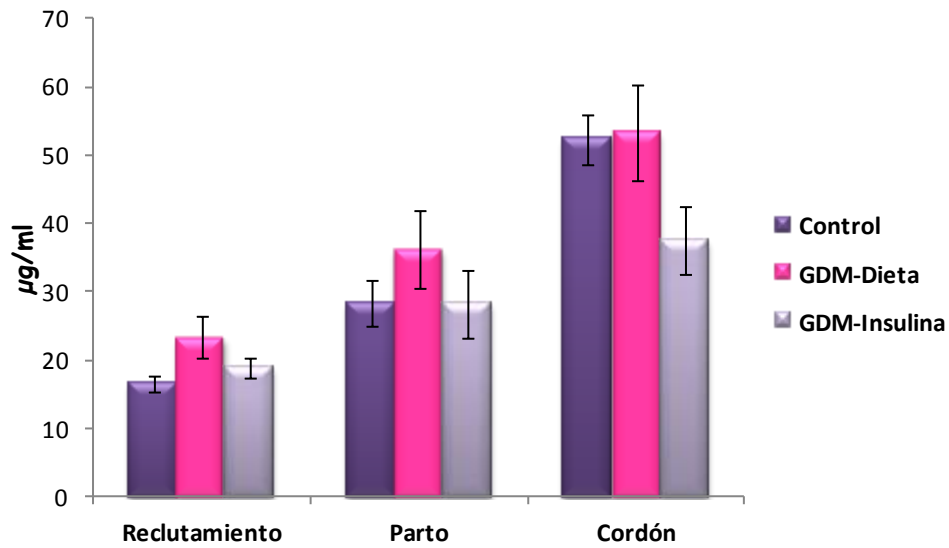


Figura 35. Concentraciones de **resistina** en suero materno (reclutamiento y parto) y del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media \pm eem). Diferencias no significativas.

Finalmente los niveles de TNF α (factor de necrosis tumoral) se mantuvieron estables a lo largo del tercer trimestre de la gestación, no observándose diferencias entre los tres grupos de gestantes. Sin embargo, los niveles de TNF α en los recién nacidos fueron mucho mayores que los de sus madres, aunque tampoco se observaron diferencias entre los tres grupos. (Figura 36). Estos resultados no fueron los esperados, ya que se ha descrito un aumento en los niveles circulantes de TNF α en mujeres con GDM. A pesar de que esta molécula se ha relacionado con la resistencia a la insulina, en nuestro estudio no se ha correlacionado con los valores de HOMA ni de insulina en las madres gestantes.

RESULTADOS

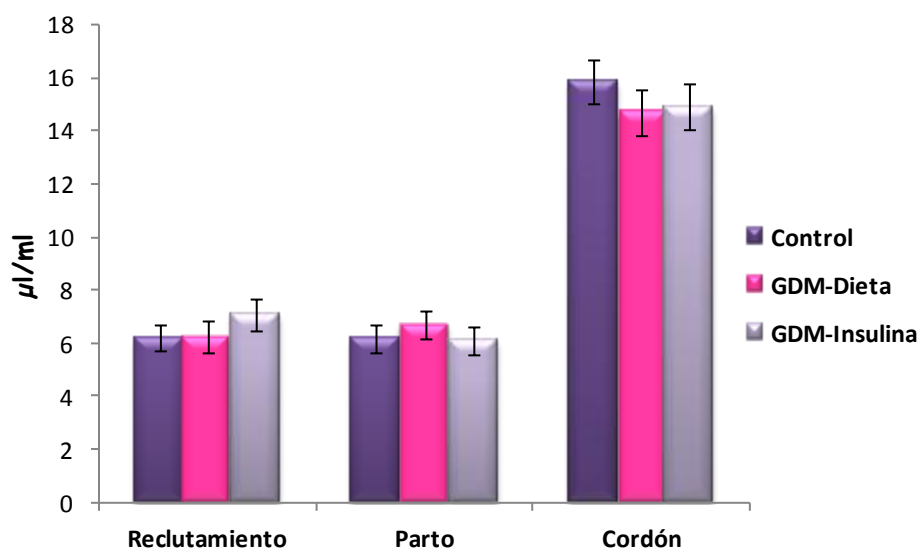


Figura 36. Concentraciones de **TNF α** (factor de necrosis tumoral) en suero materno (reclutamiento y parto) y del recién nacido (suero venoso umbilical) en el momento del parto (media \pm eem). Diferencias no significativas.

3. PLACENTA

3.1 Estructura placentaria

Para valorar el estado placentario, utilizamos fundamentalmente dos parámetros: la medida ecográfica de su grosor o espesor máximo, que se midió en las ecografías del reclutamiento y del momento próximo al parto (Figura 37), y el peso de la placenta tras el parto (Figura 38).

Aunque el grosor placentario ecográfico en el reclutamiento fue similar en todos los grupos de pacientes, tendió a ser mayor en ambos grupos de diabéticas. En el momento del parto sí se encontraron diferencias significativas ($p=0.002$), siendo mayor en los dos grupos de gestantes diabéticas con respecto a los controles.

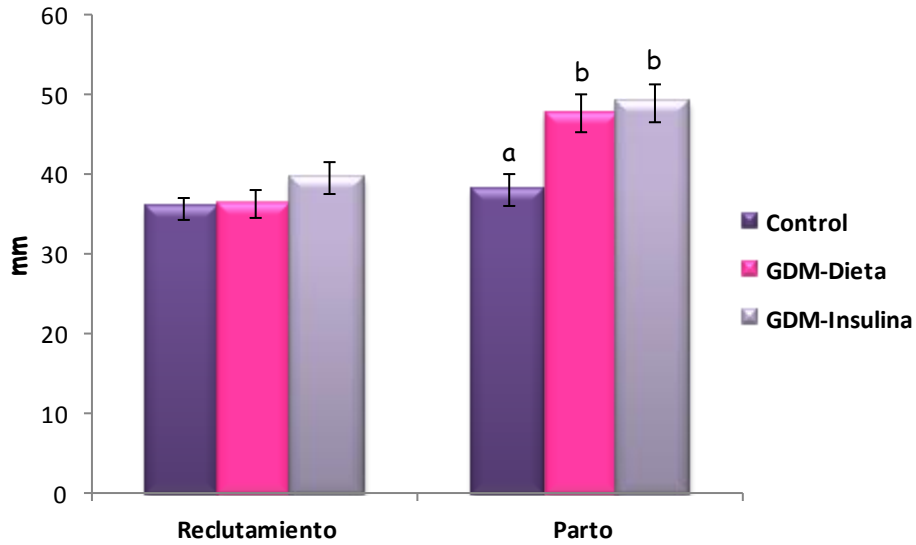


Figura 37. Medida ecográfica del **grosor placentario** (mm) en el reclutamiento y previa al parto. Las letras distintas dentro del mismo periodo gestacional indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

En cuanto al peso de la placenta, tal y como ha sido descrito clásicamente, fue mayor en las gestantes diabéticas tratadas con insulina (Figura 20).

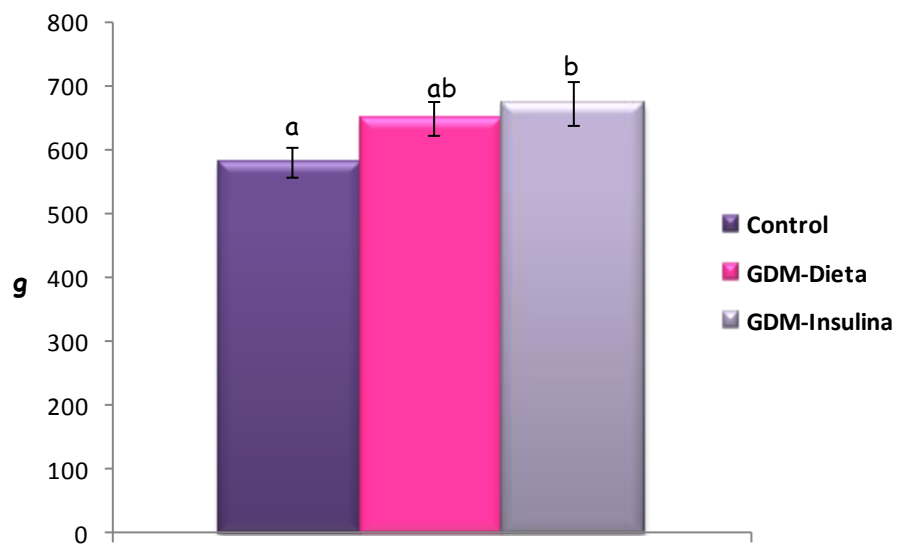


Figura 38. **Peso** de la placenta (g) (media \pm eem). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Así mismo, el peso placentario se correlacionó significativamente con el peso del recién nacido y con la medida de la circunferencia abdominal en el momento del parto, tanto en valor absoluto como con su z-score (Tabla 11).

RESULTADOS

Tabla 12. Correlaciones del peso placentario con la biometría fetal y peso del recién nacido.

	r	p
Peso recién nacido	0.546	<0.001
CA parto	0.409	0.001
Z-score CA parto	0.512	<0.001

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$. CA, Circunferencia abdominal

3.2 Proteínas transportadoras de ácidos grasos en placenta

Para determinar si la diabetes gestacional afecta al transporte de lípidos en la placenta, y cómo este transporte puede estar modificado por el tratamiento con insulina exógena, en este estudio se midió la expresión, mediante Western blot, de las lipasas placentarias EL Y LPL, así como de las proteínas transportadoras de ácidos grasos FATP-4, FATP-1, FAT y A-FABP (Figura 39).

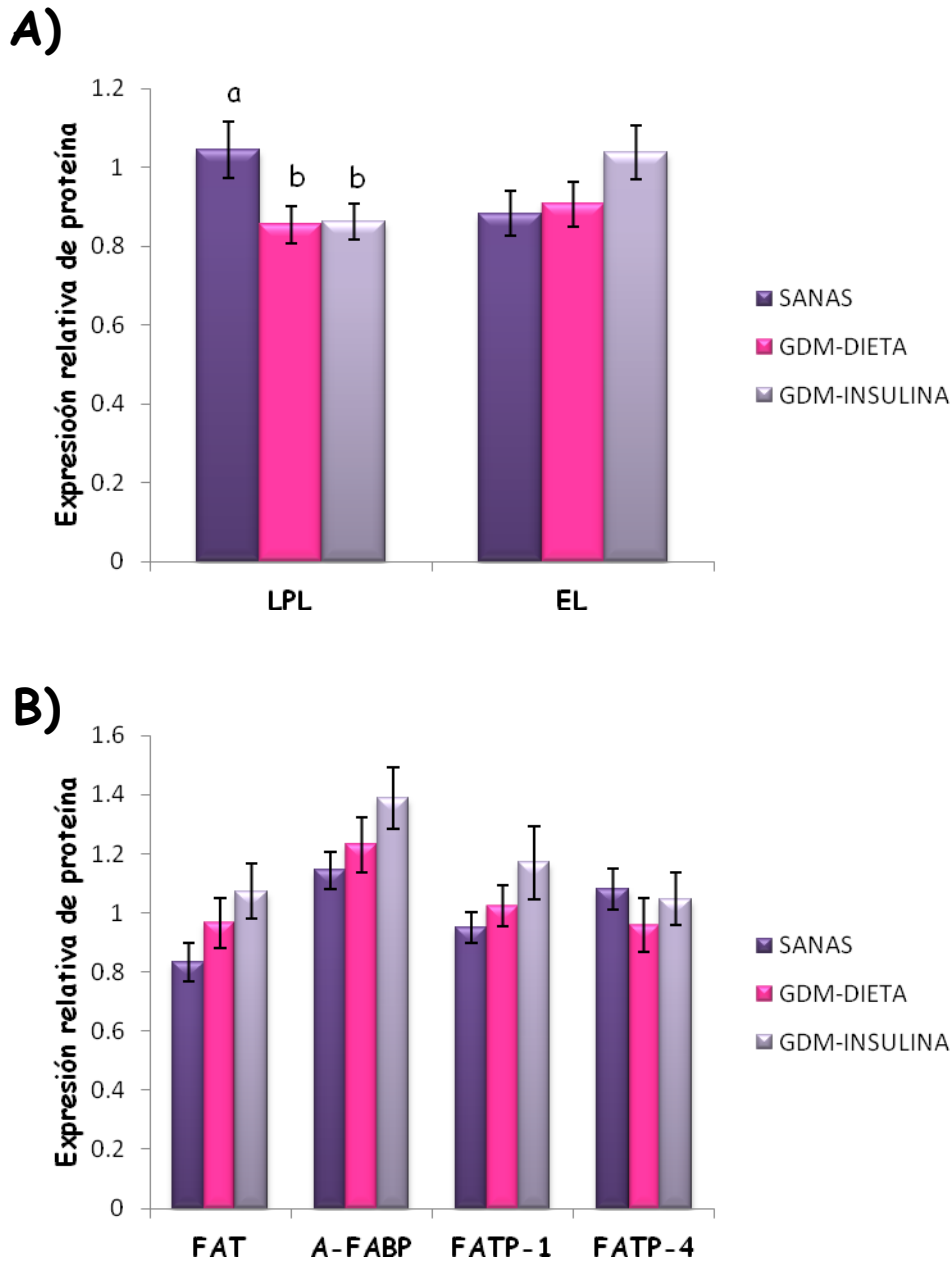


Figura 39. Expresión relativa de A) lipasas placentaria y B) proteínas transportadoras de ácidos grasos en placenta (media ± eem). Los valores fueron normalizados con B-actina. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los resultados en las lipasas placentarias no fueron concluyentes y las lipasas placentarias endotelial lipasa (EL) y lipoprotein lipasa (LPL), se comportaron de manera opuesta. Mientras que los niveles de LPL disminuyeron significativamente ($p = 0.030$) en los grupos de diabéticas (dieta e insulina) con respecto a los controles, la expresión de EL tendió a aumentar en estos grupos, dándose los valores más altos en el grupo de diabéticas tratadas con insulina (Figura 39a).

RESULTADOS

Al igual que EL, las proteínas transportadoras de ácidos grasos FATP-1 ($p=0.244$), FAT ($p=150$) y A-FABP ($p=0.167$), que son transportadores generales de ácidos grasos, tendieron a aumentar progresivamente su expresión en los grupos de gestantes diabéticas, dándose de nuevo los valores más altos en las tratadas con insulina exógena. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de FATP-4 entre los tres grupos de gestantes. FATP-4 es una proteína que se ha asociado al transporte de DHA y parece funcionar de forma diferente (Figura 39B).

El transportador citosólico A-FABP se correlacionó positivamente con dos proteínas transportadoras de membrana, FAT (Figura 40) y FATP-1 (Figura 41) lo cual sugiere una actividad coordinada de estos transportadores para el tráfico de ácidos grasos en la placenta. Esta correlación fue mayor para FAT. Este transportador está implicado en la captación de grasa no solo en la placenta, sino también en el tejido adiposo y otros tejidos.

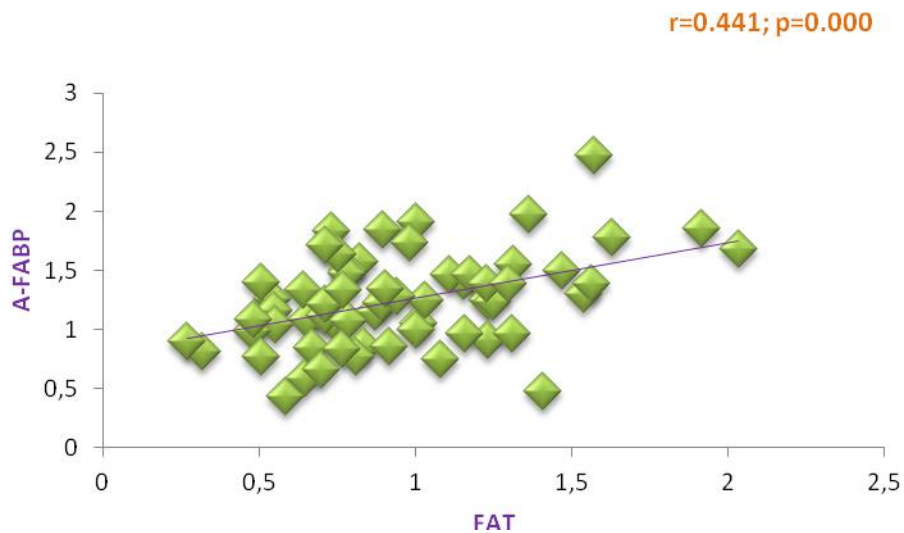


Figura 40. Correlación entre la proteína de unión a ácidos grasos A-FABP y la proteína transportadora de ácidos grasos FAT en placenta. r : coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

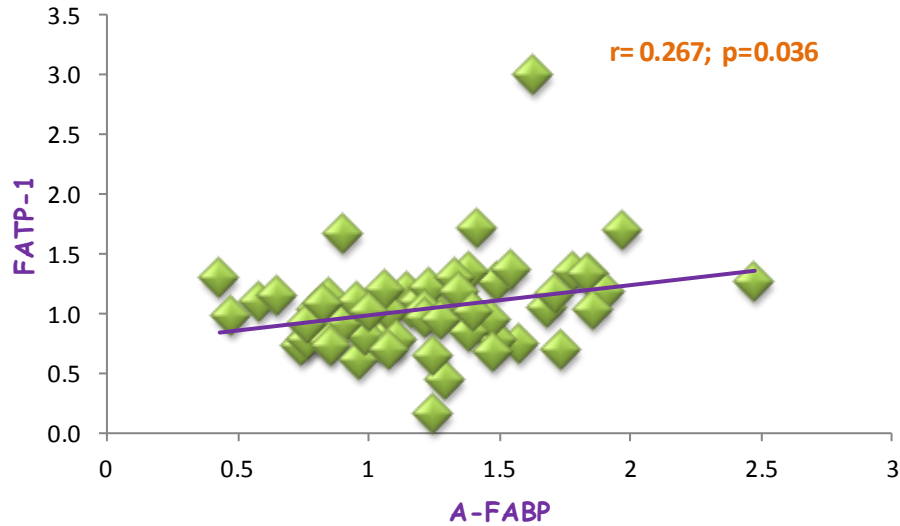


Figura 41. Correlación entre la proteína de unión a ácidos grasos A-FABP y la proteína transportadora de membrana FATP-1 en placenta. r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

3.3 MFSD2a

Dado el reciente descubrimiento del transportador de DHA en cerebro de ratas, decidimos estudiar los niveles de este transportador en placentas de gestantes diabéticas. Los niveles de MFSD2a disminuyeron de forma significativa en las gestantes diabéticas con respecto a las controles (Figura 42).

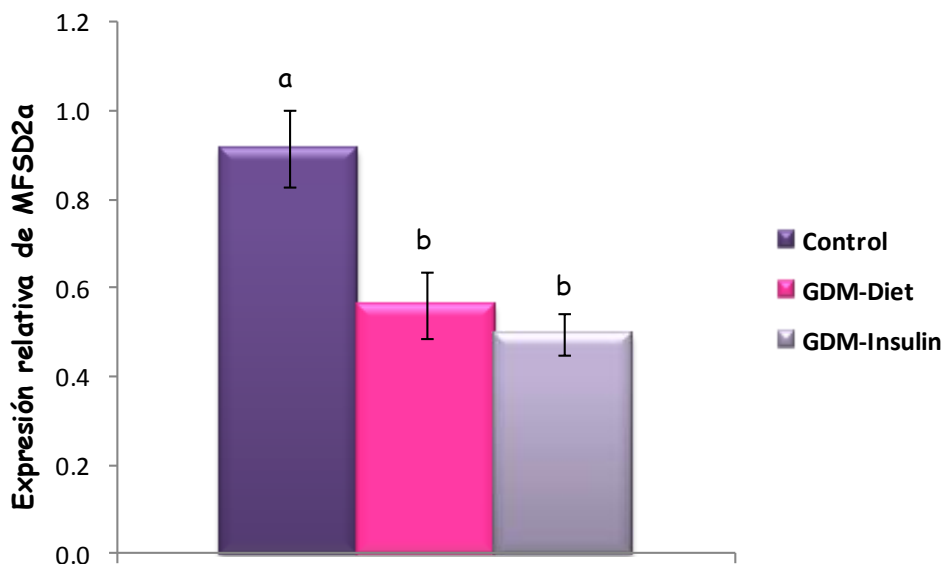


Figura 42. Expresión relativa del transportador MFSD2a (media \pm eem) en placenta. Los valores fueron normalizados con B-actina. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Además, MFSD2a en la placenta se correlacionó con el DHA (en %) del cordón (Figura 43), lo cual explicaría la disminución de los niveles de DHA en los niños de estas madres mostrados en la Figura 29.

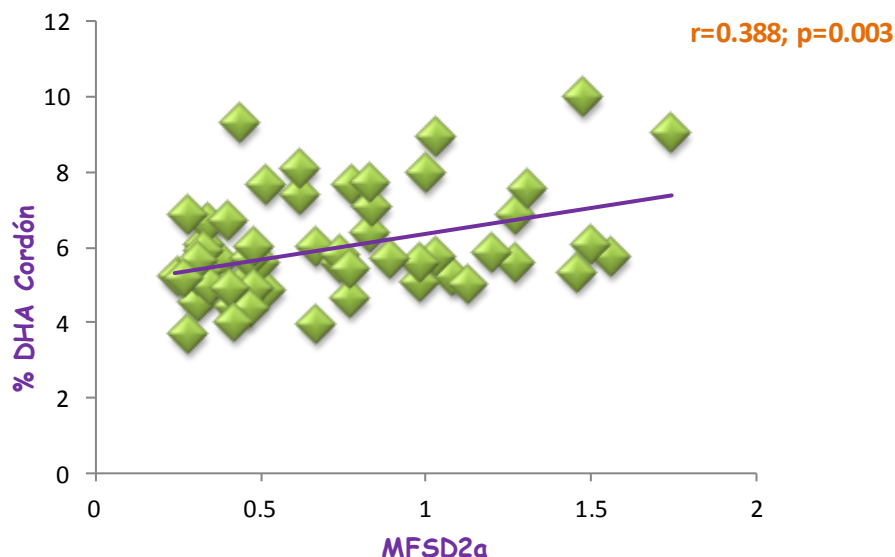


Figura 43. Correlación entre el DHA en suero de cordón (%) y el transportador de DHA MFSD2a. r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

FATP-4 no se correlacionó con el % de DHA de cordón, pero sí con la concentración de DHA en liso-PL de la placenta (Figura 44), lo cual confirmaría que este transportador también podría estar involucrado en el transporte de este ácido graso, quizá de una forma menos específica que MFSD2a. No obstante, MFSD2a y FATP-4 no mostraron correlación entre ellas, a pesar de estar ambas relacionadas con el transporte de DHA.

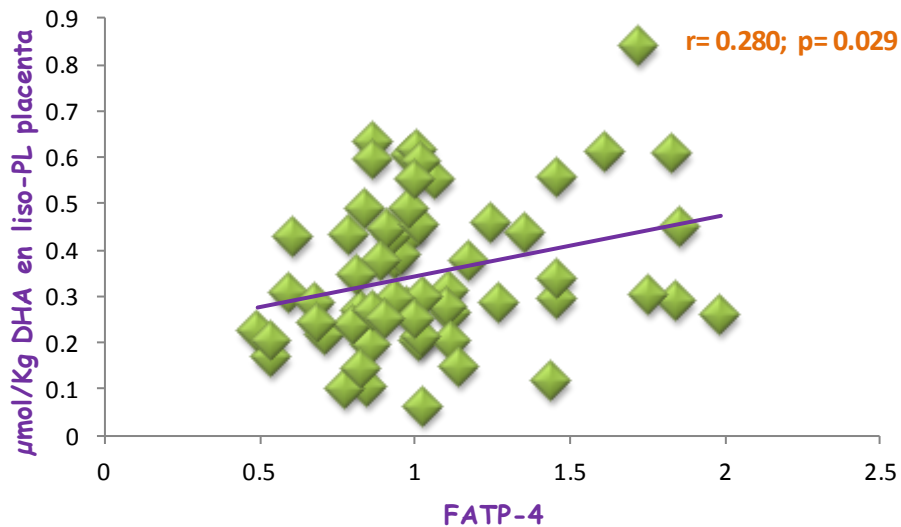


Figura 44. Correlación entre DHA ($\mu\text{mol/Kg}$) y FATP-4 en placenta. r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

3.4 Asociación de transportadores placentarios con peso materno, parámetros de adiposidad fetal y grosor placentario

Dado que el peso de las madres (antes del embarazo y en el momento del parto) se correlacionó con el peso de los recién nacidos, decidimos investigar las correlaciones entre el peso materno y los transportadores de ácidos grasos placentarios como posibles responsables de la adiposidad de los recién nacidos (Tabla 12). FAT se correlacionó con el peso antes del embarazo, mientras que EL se correlacionó positivamente con el peso antes del embarazo, en el reclutamiento y en el momento del parto. Estos resultados ponen de manifiesto la gran influencia que tiene el peso de la madre antes y durante la etapa de la gestación en el ambiente uterino y en la estructura de la placenta, afectando así a la captación y metabolismo de los ácidos grasos y por consiguiente, a la adiposidad de los recién nacidos.

RESULTADOS

Tabla 13. Correlaciones proteínas transportadoras de ácidos grasos y pesos maternos.

	EL		FAT	
	r	p	r	P
IMC Pregestacional	0.301	0.019	0.268	0.035
IMC reclutamiento	0.271	0.038	0.118	0.368
IMC parto	0.238	0.065	0.208	0.104

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

El IMC pregestacional se asoció con menores valores de adiponectina tanto en el reclutamiento ($r=-0.286$, $p=0.024$) como en el parto ($r=-0.283$, $p=0.026$), aunque la adiponectina no se asoció con ningún otro transportador más. Así pues, esta adipocitina no parece ser el principal mediador del IMC materno sobre los transportadores de ácidos grasos de la placenta.

Tras observar la relación existente entre el peso materno y los niveles de expresión de los transportadores, decidimos analizar la asociación entre estos transportadores placentarios y las medidas de adiposidad fetal (circunferencia abdominal) y peso de los recién nacidos, pero lamentablemente, estos transportadores no se correlacionaron ni con la circunferencia abdominal fetal ni con el peso de los recién nacidos en el momento del parto.

Tanto A-FABP como MFSD2A se correlacionaron con el grosor placentario en el momento del parto y en el reclutamiento (Tabla 13), lo cual indica que en la diabetes gestacional se altera la estructura placentaria, afectando así a algunos transportadores y por consiguiente al metabolismo. A-FABP, que es un transportador citosólico, se asoció positivamente al grosor placentario, mientras que MFSD2A, que es un transportador de membrana, lo hizo de forma negativa. Así pues, la alteración estructural de la placenta estaría relacionada con la menor expresión de esta proteína en la GDM, y podría explicar el menor DHA en estos niños.

Tabla 14. Correlaciones del grosor de la placenta y algunos transportadores placentarios.

	A-FABP		MFSD2A	
	r	P	r	P
Grosor placenta reclutamiento	0.237	0.073	-0.299	0.020
Grosor placenta parto	0.295	0.023	-0.299	0.019

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para p <0.05.

3.5 Asociación de transportadores placentarios lipídicos y metabolismo glucídico

Tanto el peso como el grosor placentario se asociaron de forma importante tanto con la glucosa como con la insulina materna en el momento del reclutamiento, lo que indica que al principio de la gestación estas moléculas son importantes para determinar la estructura placentaria, pero conforme se acerca el parto la placenta pierde sensibilidad a los mismos. (Figura 45).

RESULTADOS

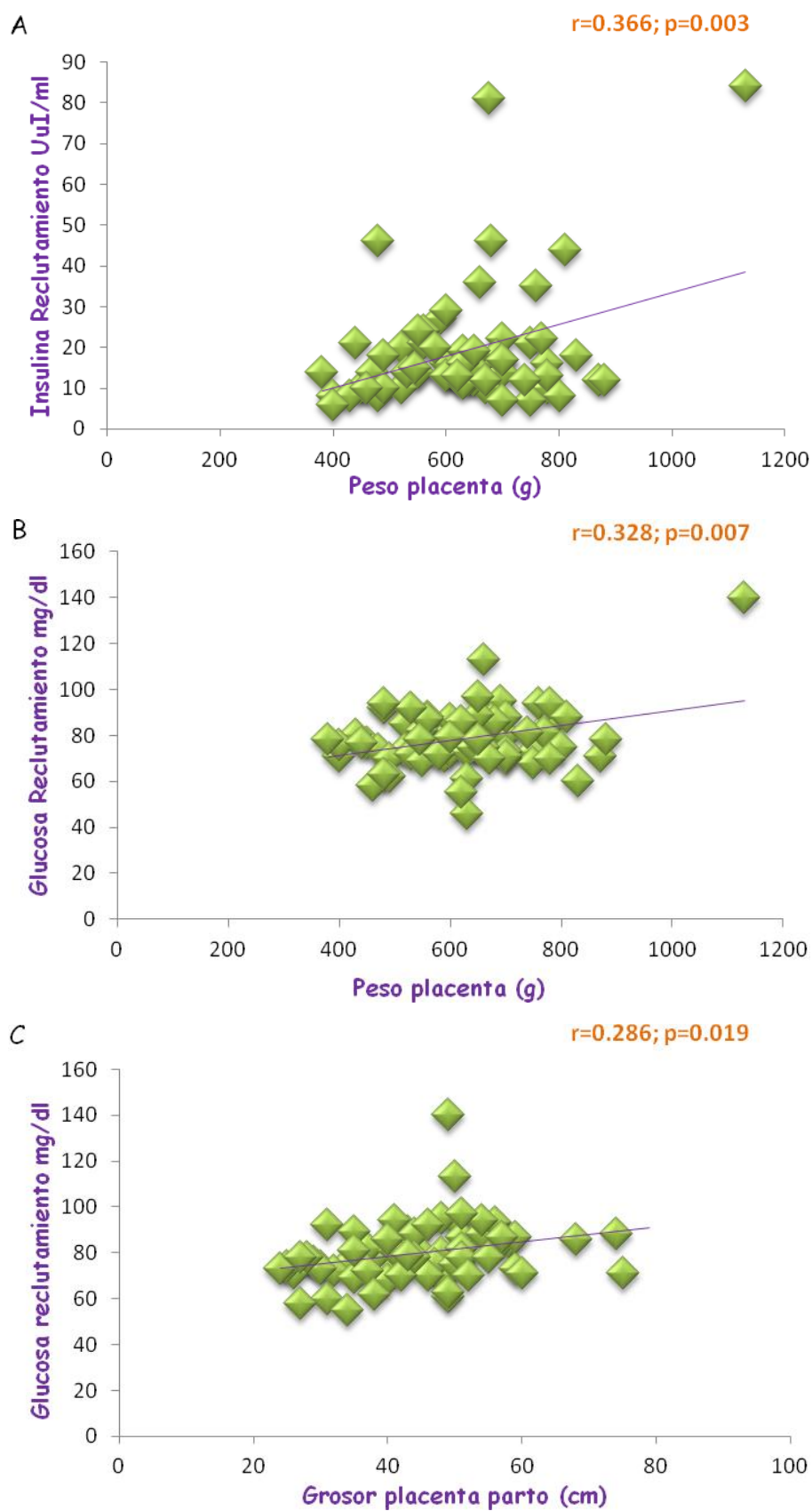


Figura 45. Correlaciones entre el peso de la placenta con a) insulina en el reclutamiento y b) glucosa en el momento del reclutamiento, así como correlación presente entre el grosor placentario en el momento del parto y la glucosa en el reclutamiento. r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

El z-score del CA del niño en el momento del parto se correlacionó con los niveles de insulina en el reclutamiento ($r=0.275$; $p=0.023$), pero no con los niveles de insulina en el momento del parto, lo cual pone nuevamente de relevancia la mayor sensibilidad a la insulina en la fase temprana del embarazo, de acuerdo con Catalano *et al.*, que observaron una fuerte correlación entre la sensibilidad a la insulina antes de la concepción y la adiposidad fetal (Catalano *et al.*, 1995).

Aunque la insulina no puede atravesar la placenta, sí puede unirse a su receptor IR en este órgano, y modificar la estructura de la placenta mediante la activación de las rutas RAS-ERK y la ruta IRS-PI3K-m-Tor que afectan a la proliferación celular. Para valorar el estado de activación de estas dos rutas en placentas de gestantes con GDM, analizamos mediante Western blot los niveles de expresión de diferentes mediadores moleculares de dichas rutas (p-ERK de la ruta RAS-ERK; p-IRS1-2, p-Akt, p-S6 de la ruta PI3K). En la Figura 46 se observa una activación de ambas rutas en el grupo de mujeres tratadas con insulina. Sin embargo, los niveles p-Akt fueron ligeramente menores en el grupo de gestantes tratadas con dieta, lo cual puede indicar cierto grado de resistencia a la insulina en estas placentas que es revertida mediante el tratamiento exógeno de insulina.

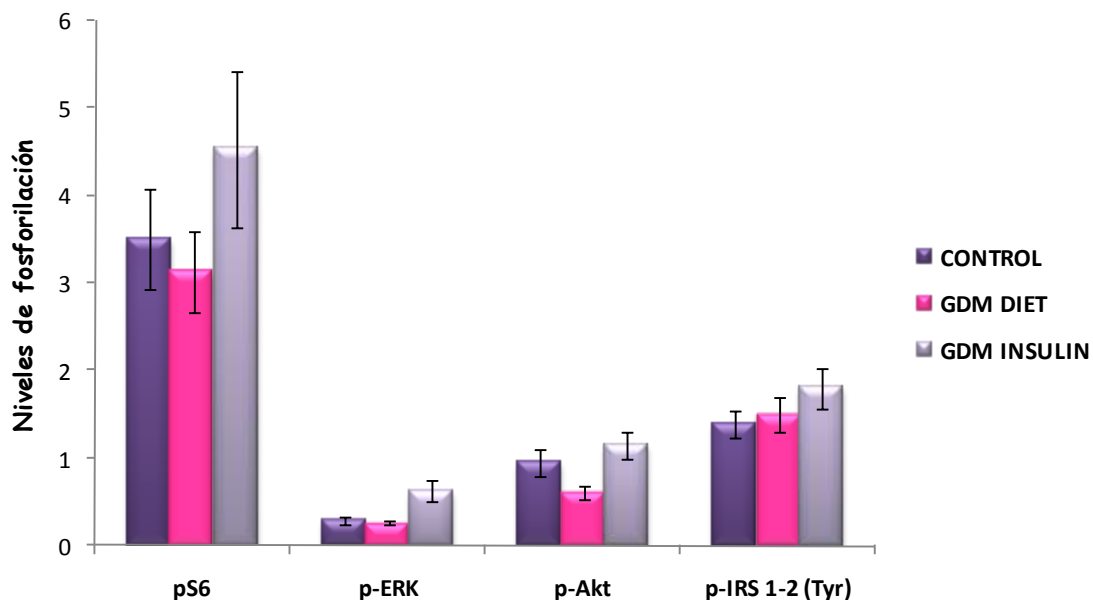


Figura 46. Niveles de fosforilación de mediadores de la ruta de la insulina en placenta (media \pm eem). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

RESULTADOS

IRS 1 y de IRS 2 fosforilados en tirosina tendieron a aumentar en el grupo de las diabéticas, aunque las diferencias no fueron significativas. Esto conduciría a la fosforilación y consecuente activación de Akt. p-S6, que se encuentra en la ruta de señalización de la insulina, por debajo de Akt y m-TOR, tendió a aumentar en el grupo de diabéticas tratadas con insulina, aunque las diferencias no fueron significativas, por la gran variabilidad mostrada debido probablemente a que esta ruta también puede ser activada por otros mediadores. (Figura 46).

También analizamos los niveles de expresión del transportador de glucosa (GLUT-1) en la placenta, que es independiente de insulina, pero no encontramos diferencias significativas entre los grupos (Figura 47).

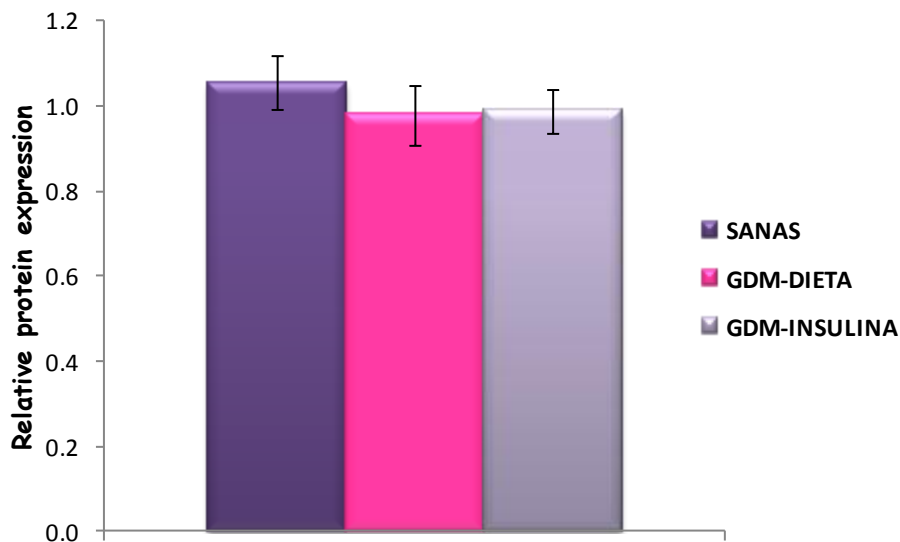


Figura 47. Expresión relativa del transportador GLUT-1 en placenta.

Los mediadores de la ruta de la insulina en la placenta, se asociaron además con el peso materno durante todo el embarazo, lo que refuerza la idea de que la activación de la insulina es clave para entender las relaciones entre el IMC materno y la transferencia de nutrientes al feto en la diabetes (Tabla 15)

Tabla 15. Correlaciones entre el peso materno y los mediadores moleculares de la insulina en tejido placentario.

	p-Akt		p-ERK	
	r	p	r	p
IMC Pregestacional	0.407	0.001	0.272	0.032
IMC reclutamiento	0.346	0.007		
IMC parto	0.372	0.003		

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

Los triglicéridos maternos que se sabe que aumentan en situaciones de alto IMC y resistencia a la insulina, aumentaron también en el grupo de GDM con insulina (Figura 27). Tanto p-ERK como p-Akt en la placenta se asociaron con los triglicéridos maternos y también con los triglicéridos en sangre de cordón. (Tabla 16). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre la activación de las rutas de la insulina y parámetros de biometría fetal tales como circunferencia abdominal fetal o el peso del recién nacido (Resultados no mostrados). Quizá el número de sujetos de este estudio no haya sido suficiente para encontrar asociaciones con variables antropométricas que tienen gran variabilidad, pero sí con variables bioquímicas como los triglicéridos en sangre de cordón.

Tabla 16. Correlaciones existentes entre los TG maternos y los mediadores moleculares de la insulina p-ERK y p-Akt.

	p-ERK		p-Akt	
	r	p	r	p
Tg madre reclutamiento	0.276	0.032	0.294	0.023
Tg madre parto				
Tg niño (cordón)			0.269	0.041

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$. TG: Triglicéridos.

RESULTADOS

Ya que el grupo de diabéticas tratadas con insulina tuvieron los niveles más altos en la mayoría de los transportadores lipídicos (Figura 39) decidimos analizar el efecto de la insulina sobre los transportadores de ácidos grasos en la placenta. Tal y como muestra la Tabla 16, tanto A-FABP como FAT se correlacionaron con p-Akt y p-ERK, poniendo de manifiesto la regulación de estos transportadores por parte de la insulina. Además, EL se correlacionó con p-Akt, y curiosamente, también se correlacionó con la insulina materna en el momento del reclutamiento ($r=0.325$, $p=0.014$) e inversamente con la resistina, tanto en el reclutamiento ($r=-0.219$, $p=0.112$) como en el parto ($r=-0.292$, $p=0.034$). Así pues, la activación de la ruta de la insulina podría ser unos de los mecanismos que promueven la macrosomía fetal, contribuyendo así a la programación fetal de la obesidad.

Tabla 17. Correlaciones entre moléculas mediadoras de insulina y transportadores de ácidos grasos en placenta.

	p-Akt		p-ERK	
	r	p	r	p
EL	0.374	0.003	0.082	0.527
FAT	0.312	0.013	0.480	<0.001
A-FABP	0.297	0.019	0.369	0.003

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

El transportador MFSD2A que fue determinante en la reducción de los niveles de DHA en sangre de cordón en las mujeres diabéticas (Figura 43), se afectó por la resistencia a la insulina. De hecho, MFSD2A se asoció inversamente a los niveles de resistina maternos ($r=-0.278$, $p=0.040$) y a los niveles de p-S6 en la placenta ($r=-0.315$, $p=0.012$), pero no con el resto de señales de la insulina. No debemos olvidar que MFSD2A se asoció además con el peso y la estructura placentaria (Tabla 14).

Así pues, decidimos realizar un estudio in vitro de estimulación de células placentarias con insulina, para dilucidar el efecto de la insulina en los transportadores placentarios de ácidos grasos. Para ello utilizamos una línea celular (BeWo) que

mantiene todas las características de los trofoblastos, siendo por ello un buen modelo de estudio del metabolismo placentario.

4. ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO DE LA INSULINA SOBRE LOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS GRASOS.

Para estudiar el papel de la insulina sobre los transportadores placentarios preincubamos las células trofoblásticas BeWo con insulina durante 24 horas con y sin tratamiento con inhibidores de las rutas de señalización de la insulina, MEK-ERK (inhibidor de p-ERK, PD) e IRS-PI3K (inhibidor de la ruta de Akt, LY). En primer lugar analizamos el efecto de la insulina sobre la activación de su ruta de señalización. Así pues, tras la estimulación con esta hormona, la expresión de p-Akt se elevó, lo cual indica una activación de la ruta. Sin embargo, cuando se añadió el inhibidor de Akt (LY), los niveles de p-Akt disminuyeron drásticamente, lo cual indica un bloqueo de esta ruta (Figura 48).

Esto indica que en estas células la insulina activa la ruta IRS-PI3K, además del correcto funcionamiento de estos inhibidores en estas células.

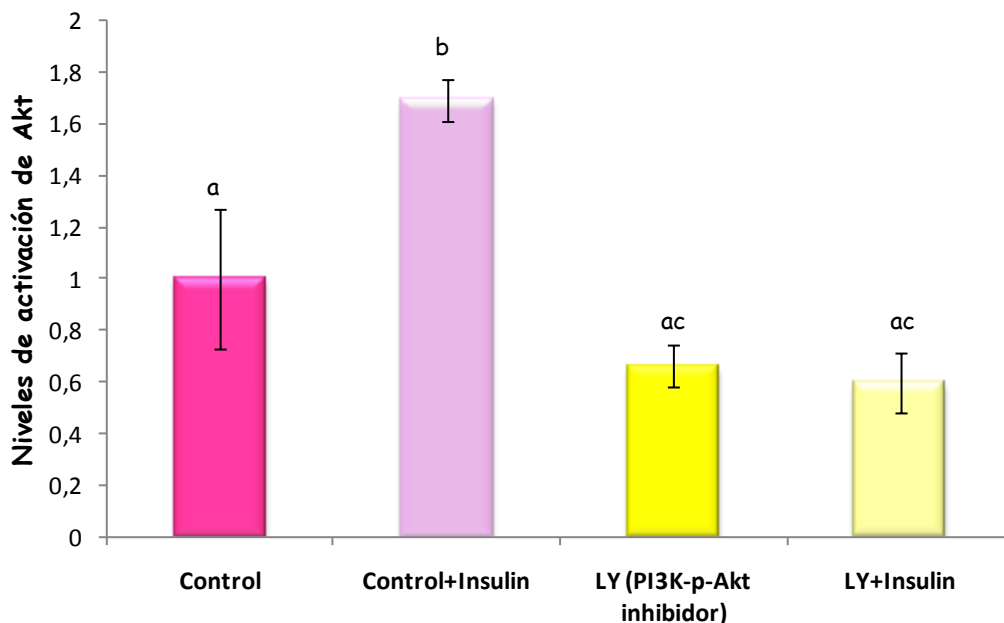


Figura 48. Niveles de activación de Akt normalizada con B-actina en células BeWo que fueron preincubadas con inhibidores de las rutas PI3K (inhibidor de Akt, LY) Y MEK-ERK (inhibidor de ERK, PD) (50 μ M) y posteriormente estimuladas con insulina (10 nmol/l) durante 24 horas (media \pm eem). Se usó t-Student para analizar las diferencias entre grupos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

RESULTADOS

De igual forma los niveles de p-ERK disminuyeron de manera drástica cuando las células fueron tratadas con el inhibidor de la ruta MEK-ERK (PD) (Figura 49). Sin embargo, no se observó un aumento en los niveles de p-ERK en las células estimuladas con insulina con respecto a los controles, lo cual puede ser debido al largo tiempo de exposición con insulina (24 horas), tras el cual no se puede apreciar su pico de activación.

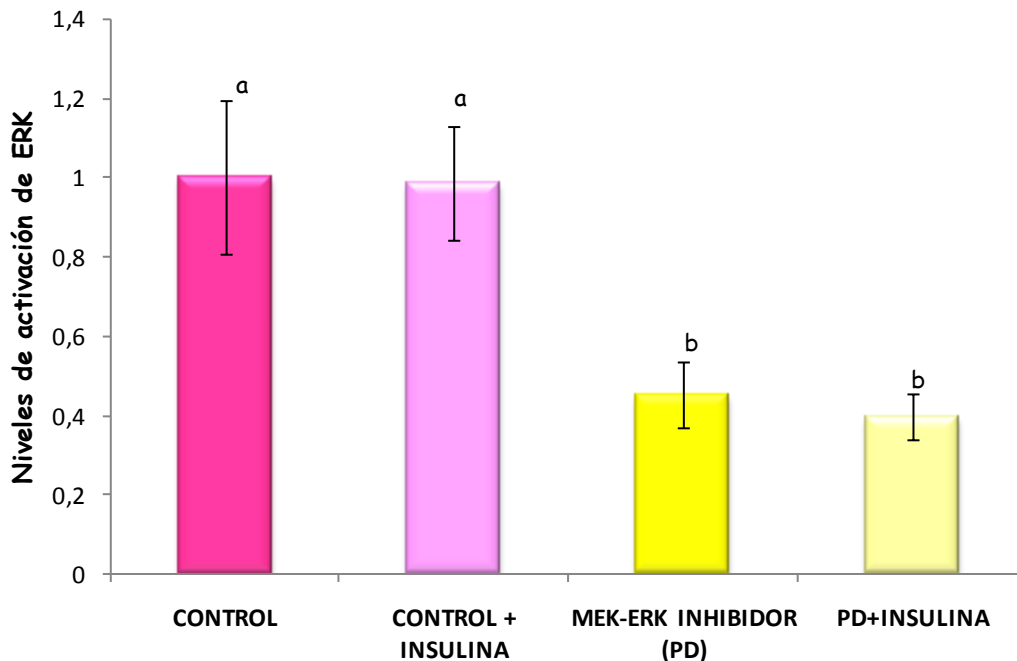


Figura 49. Niveles de activación de ERK normalizada con B-actina en células BeWo que fueron preincubadas con inhibidores de las rutas PI3K (inhibidor de Akt, LY) Y MEK-ERK (inhibidor de ERK, PD) (50 μ M) y posteriormente estimuladas con insulina (10 nmol/l) durante 24 horas (media \pm eem). Se usó t-Student para analizar las diferencias entre grupos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Una vez demostrado que la insulina administrada sobre las células BeWo activaba sus rutas de señalización, se estudió el efecto de la insulina sobre la expresión de los transportadores de AG. Tal y como se observa en la Figura 50, la insulina estimula la expresión de A-FABP en células BeWo. Además, la expresión de este transportador disminuye drásticamente en células tratadas con el inhibidor de Akt, aunque no con el de ERK, lo cual indica que la insulina podría regular A-FABP mediante la activación de Akt. Estos resultados corroborarían los resultados de asociación encontrados entre A-FABP y p-Akt, mientras que no demuestran los encontrados entre A-FABP y p-ERK.

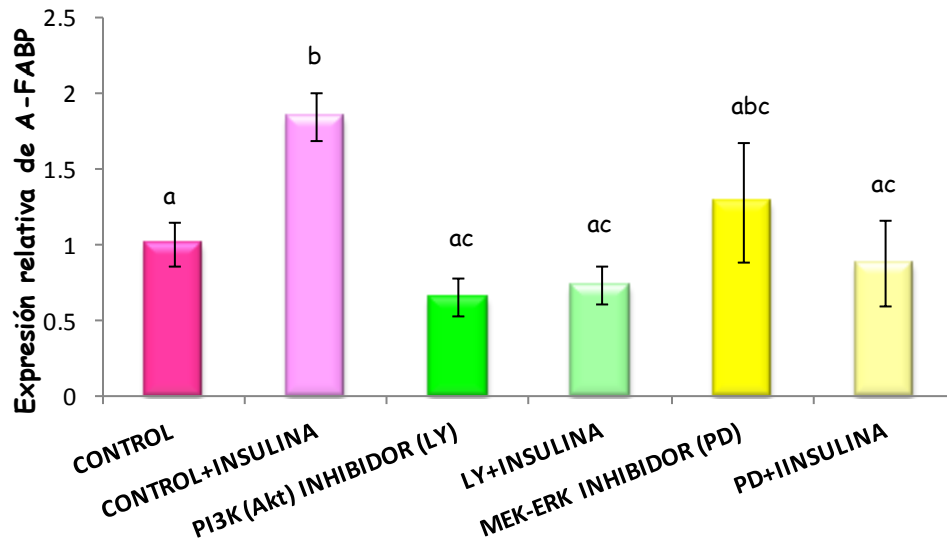


Figura 50. Expresión relativa la proteína de unión a ácidos grasos A-FABP, en células BeWo que fueron preincubadas con inhibidores de las rutas PI3K (inhibidor de Akt, LY) Y MEK-ERK (inhibidor de ERK, PD) (50 μ M) y posteriormente estimuladas con insulina (10 nmol/l) durante 24 horas (media \pm eem). Se usó t-Student para analizar las diferencias entre grupos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Al igual que A-FABP, los niveles de EL (Figura 51) disminuyeron significativamente en células preincubadas con el inhibidor de Akt, lo cual indica, que la insulina podría regular estos transportadores también mediante la activación de Akt. No obstante, el aumento de EL en células tratadas con insulina no fue significativo, probablemente debido al largo tiempo de exposición a esta hormona.

En cuanto a FATP-1, sus niveles (Figura 52) disminuyeron drásticamente en células preincubadas con ambos inhibidores, lo cual indica que las dos rutas principales de la insulina podrían estar implicadas en la regulación de este transportador.

Así pues, en la placenta, la activación de la ruta de la insulina vía Akt eleva los niveles de transportadores de AG, lo que podría favorecer la transferencia de grasa al feto. Sin embargo, la ruta de ERK no mostró esta relación con todos los transportadores de AG y su papel debe de ser estudiado en mayor profundidad.

RESULTADOS

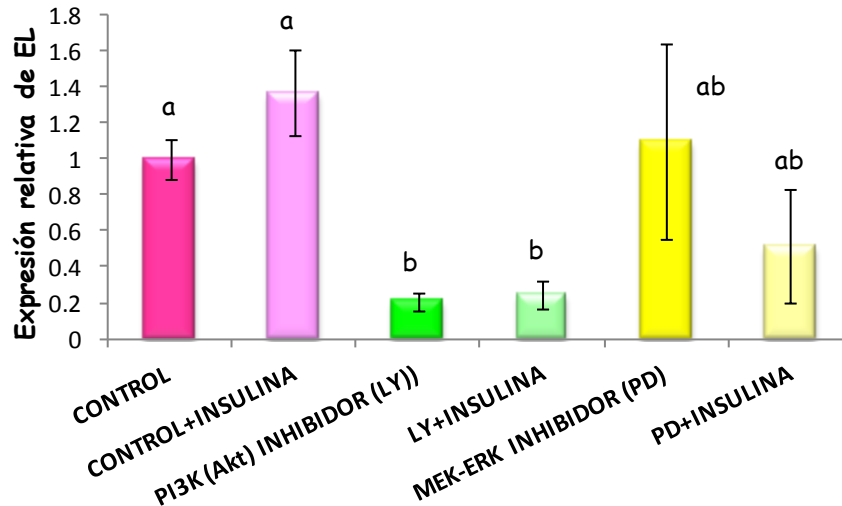


Figura 51. Expresión relativa de la lipasa EL en células BeWo que fueron preincubadas con inhibidores de las rutas PI3K (inhibidor de Akt, LY) Y MEK-ERK (inhibidor de ERK, PD) (50 μ M) y posteriormente estimuladas con insulina (10 nmol/l) durante 24 horas (media \pm eem). Se usó t-Student para analizar las diferencias entre grupos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

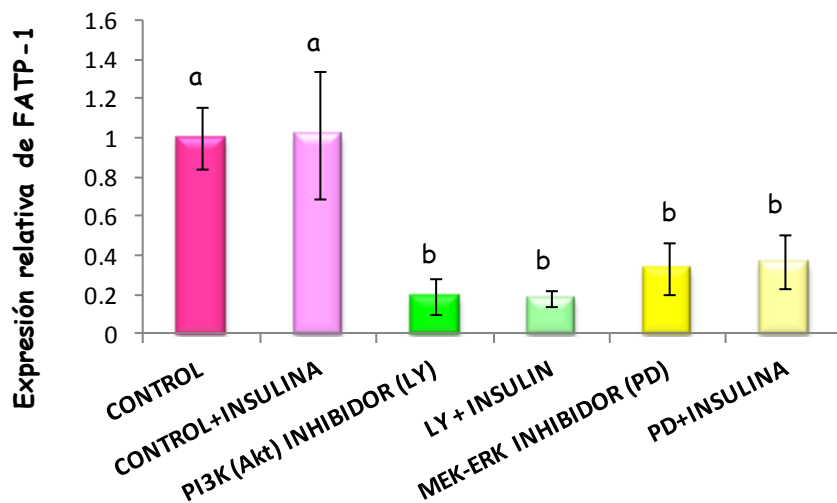


Figura 52. Expresión relativa de la proteína transportadora de ácidos grasos FATP-1 en células BeWo que fueron preincubadas con inhibidores de las rutas PI3K (inhibidor de Akt, LY) Y MEK-ERK (inhibidor de ERK, PD) (50 μ M) y posteriormente estimuladas con insulina (10 nmol/l) durante 24 horas (media \pm eem). Se usó t-Student para analizar las diferencias entre grupos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Dado que la GDM altera los niveles del transportador MFSD2A y el transporte de DHA al feto, estudiamos el papel de la insulina en la expresión de este transportador. Tal y como muestra la Figura 53, el transportador MFSD2a no aumentó en las células tratadas con insulina, lo que indica que probablemente la regulación de este transportador no dependa de la insulina, sino que más bien está relacionado con la

alteración de la estructura de la placenta que se observa en los sujetos con GDM. Esto concuerda con los niveles de dicho transportador en las gestantes diabéticas tratadas con insulina, iguales que los niveles en las gestantes tratadas con dieta, lo cual indica que en condiciones fisiológicas la insulina no regula este transportador. Sin embargo, los niveles de este transportador cayeron drásticamente en las células tratadas con inhibidores, tanto de la ruta PI3K como de la ruta MER-ERK. Ya que la ruta PI3K controla un gran número de procesos celulares, su inhibición podría mediar la caída de estos transportadores mediante otras moléculas diferentes a la insulina. En cualquier caso, serían necesarios más estudios, para averiguar qué moléculas están implicadas en la regulación de este transportador.

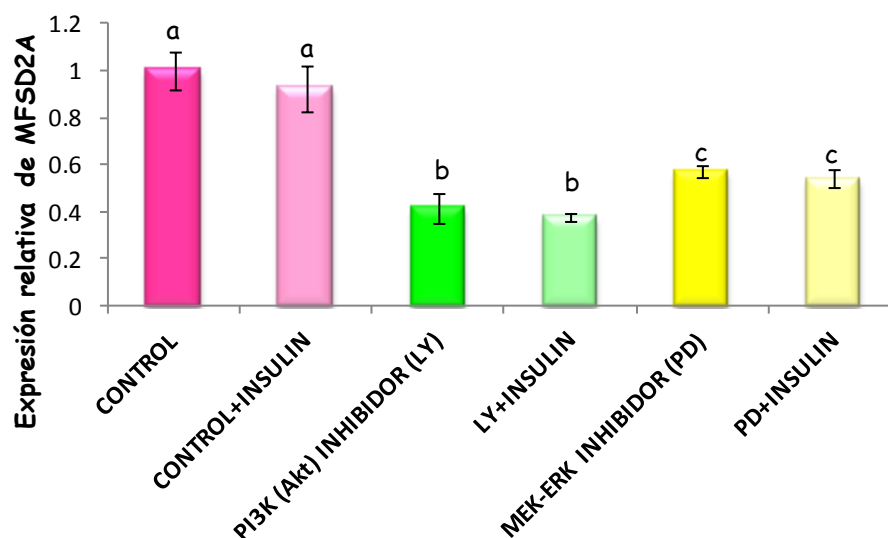


Figura 53. Expresión relativa del transportador MFSD2a placentario normalizado con B-actina en células BeWo que fueron preincubadas con inhibidores de las rutas PI3K (inhibidor de Akt, LY) Y MEK-ERK (inhibidor de ERK, PD) (50 μ M) y posteriormente estimuladas con insulina (10 nmol/l) durante 24 horas (media \pm eem). Se usó t-Student para analizar las diferencias entre grupos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

5. EFECTOS EN LA TRANSFERENCIA MATERNO-FETAL DE AA

5.1 Perfil de aminoácidos en suero materno en el momento del parto

En la diabetes gestacional se ha documentado clásicamente un sobrecrecimiento fetal, debido principalmente al exceso de nutrientes en suero materno y a la activación del transporte placentario de dichos nutrientes. Es por ello

RESULTADOS

que decidimos analizar el perfil de aa en las madres, en los niños, así como en la placenta.

En la Tabla 17 se muestra el perfil de aminoácidos en suero materno en el momento del parto. Los niveles de aminoácidos totales tendieron a disminuir en el suero materno en el grupo de diabéticas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.180$) Estos datos no concuerdan con la bibliografía general, que apunta hacia un aumento en los niveles de aa en suero de gestantes diabéticas, favoreciendo así la transferencia al feto y contribuyendo por tanto a la macrosomía de estos niños.

Tabla 18. Perfil de aminoácidos en suero materno en el momento del parto

	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
Total aa	3054 ±136	2791±107	2799 ± 86	0.180
Aa esenciales	1028 ± 46	1007 ±49	979 ±35	0.740
Aa semiesenciales	1038 ± 39	966 ± 27	967 ± 26	0.190
Aa acidos	183±20	150±15	151±20	0.363
Aa basicos	331±13	345±15	341±11	0.731
Neutros	1436 ± 57	1313 ± 42	1318 ± 63	0.199
Aa Ramificados	391 ± 19	339 ± 15	360 ±17	0.113
Alanina	486 ^a ±20	415 ^b ±20	444 ^{ab} ±15	0.030
Arginina	91±5	95±5	93±4	0.811
Aspartato	54±3	52±3	50±3	0.648
Asparagina	51±5	38±4	38±4	0.063
Citosina	18±1	21±2	20±2	0.355
Cisteína	25±2	29±3	29±2	0.346
Glutamato	446±16	429±15	433±15	0.714
Glutamina	135±16	112±12	113±16	0.466
Glicina	230±14	213±15	200±16	0.360
Histidina	101±4	101±5	98±3	0.885
Isoleucina	54±3	46±2	50±3	0.095
Leucina	123 ^a ±7	100 ^b ±4	109 ^{ab} ±6	0.021
Lisina	156±7	173±8	166±7	0.237
Metionina	23±1	21±1	22±1	0.228
Ornitina	58±7	42±4	53±7	0.187
Fenilalanina	89±5 ^a	73 ^b ±4	76 ^{ab} ±4	0.034
Prolina	177 ^a ±8	146 ^b ±5	164 ^{ab} ±7	0.009
Serina	161±11	138±10	134±10	0.134
Treonina	215±10	233±17	214±12	0.531
Triptófano	43±2	43±2	43±1	0.921
Tyrosina	53±3	48±3	48±2	0.385
Valina	214±11	193±10	201±10	0.321

Resultados expresados como media ± eem. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los tres grupos. Aa aminoácido; KG cetoglutarato; CoA coenzima A

RESULTADOS

Los aminoácidos del suero materno se correlacionaron de forma inversa con la glucosa materna lo que corroboraría el descenso de aa en ambos grupos de diabéticas descrito anteriormente (Tabla 18).

Tabla 19. Correlaciones entre aminoácidos en suero materno y parámetros glucídicos en el momento del parto

	Insulina materna parto		Glucosa materna parto	
	r	p	r	p
Aspartato			-0.422	0.0001
Asparagina			-0.455	0.0001
Glutamato	-0.298	0.017		
Glutamina			-0.452	0.0001
Glicina	-0.284	0.024	-0.375	0.002
Leucina			-0.327	0.008
Metionina			-0.247	0.046
Ornitina			-0.454	0.0001
Fenilalanina			-0.422	0.0001
Serina	-0.257	0.041	-0.459	0.0001
Aa semiesenciales	-0.281	0.025	-0.279	0.023
Aa acidos			-0.468	0.0001
Aa neutros pequeños			-0.315	0.010
Total aa			-0.339	0.005

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Aa aminoácido. KG cetoglutarato

5.2 Perfil de aminoácidos en el niño (aa en suero venoso umbilical)

Para ver si el descenso de aa en el suero materno de las diabéticas podría ser debido además a una mayor transferencia materno-fetal se analizó el perfil de aa en

sangre de cordón. No se observaron diferencias en los niveles de aa del cordón entre los diferentes grupos (Tabla 19)

Tabla 20. Perfil de aa en suero venoso umbilical

	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
Todos los aa	3702±86	3682±109	3641±115	0.917
Aa esenciales	1424±32	1540±43	1459±52	0.122
Aa semiesenciales	1262±28	1244±42	1263±41	0.920
Aa acidos	112±13	99±15	112±20	0.804
Aa basicos	562±17	621±18	599±24	0.089
Neutros	1715±48	1678±58	1646±57	0.671
Aa Ramificados	484±16	495±23	473±21	0.757
Arginina	94±5	105±4	98±8	0.337
Aspartato	49±2	45±2	47±3	0.538
Asparragina	23±2	21±3	20±3	0.725
Citosina	12±1	14±1	14±1	0.286
Cisteína	19±3	24±3	26±4	0.352
Glutamato	577±17	552±33	586±26	0.643
Glutamina	87±10	69±7	80±14	0.437
Glicina	315±11	312±16	297±12	0.599
Histidina	118±4	121±5	121±7	0.886
Isoleucina	74±2	73±4	66±4	0.308
Leucina	143±5	142±6	133±6	0.445
Lisina	346 ^a ±11	397 ^b ±13	377 ^{ab} ±18	0.031
Metionina	31±1	30±1	31±1	0.823
Ornitina	103±7	94±8	98±8	0.705
Fenilalanina	88±3	91±4	91±3	0.812
Prolina	186±5	179±6	188±9	0.613
Serina	190±7	185±8	184±9	0.806
Treonina	281±11	313±19	288±21	0.373
Triptófano	76±2	82±2	79±4	0.227
Tyrosina	71±3	72±3	69±4	0.826
Valina	267±10	280±14	274±12	0.729

Resultados expresados como media ± eem. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los tres grupos. Aa aminoácido.

RESULTADOS

Las distintas familias de aa se correlacionaron entre madre e hijo, aunque llama la atención que la correlación más baja fue encontrada para los aa esenciales, lo que sugiere que la placenta podría modular el transporte de estos aa (Tabla 20).

Tabla 21. Correlaciones entre aa en suero materno en el momento del parto y aa de cordón

AA SUERO MATERNO PARTO	TODOS		ácidos		Neutros		Esenciales		Ramificados	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
aa cordón										
todos	0.254	0.078								
aa ácidos			0.468	0.001						
neutros					0.444	0.001				
esenciales							0.290	0.043		
ramificados									0.443	0.002

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Aa aminoácido. KG cetoglutárico

Además, algunos aa del suero materno también se relacionaron con el grosor placentario de forma negativa, lo que indica que el crecimiento placentario con la diabetes se debe en parte a la captación de aa maternos (Tabla 21). Sin embargo, los aa de cordón no se asociaron con el grosor y peso placentario.

Tabla 22. Correlaciones entre algunos aa en suero materno en el momento del parto y el grosor placentario.

	Grosor placentario	
	r	p
Alanina	-0.257	0.039
Isoleucina	-0.432	0.0001
Leucina	-0.379	0.002
Prolina	-0.279	0.024
Tirosina	-0.299	0.015
Valina	-0.375	0.002
Aa neutros grandes	-0.384	0.002
Aa neutros	-0.280	0.024
Aa ramificados	-0.402	0.001
Aa Cetogénicos via acetilCoA	-0.423	0.001

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Aa aminoácido.

5.3 Perfil de aminoácidos en placenta

En cuanto al perfil de aa placentarios (Tabla 22), tampoco se observaron diferencias entre los diferentes grupos, aunque los aa esenciales y los ramificados tendieron a ser menores en el grupo de gestantes tratadas con insulina. De hecho, si solo se compararan los niveles de aminoácidos entre las embarazadas controles y las diabéticas tratadas con insulina mediante t-Student, el descenso de aminoácidos fue significativo o casi significativo para muchos de los grupos que antes no lo eran: aa esenciales $p=0.056$, neutros grandes $p=0.031$, ramificados $p=0.024$ y aminoácidos glucogénicos via succinilCoA $p=0.058$.

RESULTADOS

Tabla 23. Perfil de aminoácidos en placenta.

	Control (n=25)	GDM- Dieta (n=23)	GDM- Insulina (n=20)	P
Todos los aa	2468 ± 127	2335 ± 172	2207 ± 108	0.369
Aa esenciales	501 ± 26	506 ± 37	432 ± 21	0.130
Aa semiesenciales	667 ± 36	642 ± 48	591 ± 32	0.347
Aa acidos	703±53	610±65	658±41	0.477
Aa basicos	116±7	121±11	108±9	0.547
Neutros	961 ± 48	940 ± 71	832 ± 74	0.193
Aa Ramificados	198 ± 12	217 ± 24	162 ± 9	0.051
Arginina	33±2	37±4	31±3	0.316
Aspartato	42 ± 3	47 ± 6	36 ± 3	0.137
Aspargina	234 ± 17	217 ± 24	220 ± 15	0.765
Citosina	7 ± 0	7 ± 1	7 ± 0	0.682
Cisteína	11 ± 1	11 ± 2	9 ± 2	0.662
Glutamato	250 ± 13	233 ± 17	228 ± 13	0.516
Glutamina	469 ± 38	394 ± 44	438 ± 30	0.385
Glicina	248 ± 17	243 ± 24	223 ± 17	0.617
Histidina	36 ± 1	35 ± 2	31 ± 1	0.084
Isoleucina	28 ^a ± 2	33 ^a ± 4	22 ^b ± 2	0.040
Leucina	75 ± 5	81 ± 9	60 ± 4	0.065
Lisina	63 ± 4	66 ± 6	61 ± 5	0.751
Metionina	22 ± 2	23 ± 3	18 ± 1	0.140
Ornitina	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	0.816
Fenilalanina	45 ± 3	50 ± 5	37 ± 2	0.058
Prolina	84 ± 6	78 ± 6	66 ± 3	0.058
Serina	287 ± 16	295 ± 26	269 ± 22	0.685
Treonina	138 ± 8	137 ± 9	123 ± 7	0.355
Triptófano	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	0.911
Tyrosina	40 ± 3	44 ± 4	34 ± 2	0.096
Valina	93 ± 5	93 ± 8	78 ± 4	0.094

Resultados expresados como media ± eem. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos. Aa aminoácido; KG cetoglutarato; CoA coenzima A

Para dilucidar si la insulina ejercía un efecto directo sobre los niveles de aminoácidos placentarios, estudiamos las correlaciones entre éstos y la insulina, (tanto

la insulina materna en el reclutamiento y en el parto) así como la insulina del recién nacido. Sorprendentemente, ningún aminoácido de la placenta se correlacionó ni con la insulina materna (ni en el reclutamiento ni en el parto) ni con la glucosa materna en el momento del parto. Sólo arginina ($r=0.263$; $p=0.041$), Triptófano ($r=-0.268$; $p=0.038$) y el grupo de aa básicos ($r=0.283$, $p=0.028$) se asociaron con la glucosa materna en el momento del reclutamiento. Por el contrario, la mayoría de los aa placentarios se asociaron positivamente con la insulina del cordón, (Tabla 23), dejando este hecho en evidencia el posible efecto regulador de la insulina del cordón en el metabolismo placentario de aa.

Tabla 24. Correlación entre diferentes aminoácidos placentarios e insulina de cordón en el momento del parto.

	INSULINA CORDÓN	
	r	p
Todos los aminoácidos	0.306	0.021
Aa esenciales	0.291	0.028
Aa semiesenciales	0.399	0.002
Aa básicos	0.305	0.021
Cisteína	0.314	0.017
Glicina	0.475	0.0001
Histidina	0.284	0.032
Metionina	0.318	0.015
Prolina	0.317	0.016
Aa esenciales	0.291	0.028
Aa semiesenciales	0.399	0.002
Aa básicos	0.305	0.021
Todos los aminoácidos	0.306	0.021

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Aa aminoácido.

Los aa de la placenta se asociaron de forma importante con los niveles de glucosa en la placenta (Tabla 24). Además, al estudiar la asociación existente entre los

RESULTADOS

aminoácidos placentarios y los mediadores moleculares de la ruta de la insulina, la mayoría de ellos se asociaba inversamente con la activación del mediador de la ruta RAS-MEK-ERK (Tabla 24), pero no con la ruta de Akt. Así pues, la activación de ERK podría disminuir la biodisponibilidad de aa libres en la placenta y probablemente estimular la proteogénesis en este órgano.

Tabla 25. Correlacion entre los niveles de aminoácidos placentarios y la glucosa placentaria.

	Glucosa placenta		p-ERK placenta	
	r	p	r	p
Todos los aa	0.413	0.001	-0.304	0.018
Aa esenciales	0.394	0.002	-0.423	0.001
Aa semiesenciales	0.400	0.001	-0.333	0.009
Aa ácidos	0.368	0.003		
Aa básicos			-0.430	0.001
Aa neutros	0.353	0.005	-0.365	0.004
Aa ramificados	0.338	0.007	-0.353	0.005
Alanina	0.328	0.010		
arginina			-0.484	0.0001
aspartato			-0.384	0.002
Citosina	0.357	0.005	-0.322	0.013
cisteína	0.335	0.008		
Glutamato	0.400	0.001		
Glutamina	0.368	0.003		
Glicina	0.287	0.024	-0.316	0.014
Histidina	0.319	0.011		
Isoleucina	0.265	0.037	-0.375	0.003
Leucina	0.328	0.010	-0.375	0.003
Lisina			-0.345	0.007
Metionina			-0.408	0.001
Serina			-0.321	0.012
Triptófano			-0.388	0.002
Tirosina			-0.409	0.001
Ornitina	0.284	0.025		
Fenilalanina	0.361	0.004	-0.375	0.003
Prolina	0.329	0.009	-0.358	0.005
Treonina	0.397	0.001	-0.364	0.004
Valina	0.343	0.006	-0.356	0.005

r: coeficiente de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas para p <0.05. Aa aminoácido.

RESULTADOS

Curiosamente en este estudio no observamos asociación alguna entre los aminoácidos placentarios y p-S6, que se encuentra por debajo de mTOR en su ruta de señalización, pero la gran variabilidad obtenida en la medida de p-S6 podría limitar la realización de correlaciones con este parámetro.

V. DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos implicados en la transferencia de nutrientes en la GDM es de gran importancia. La obesidad y la GDM tienen graves consecuencias para la descendencia, tanto a corto como a largo plazo, pudiendo promover la macrosomía y la adiposidad fetal. Esto a su vez aumenta la probabilidad de padecer diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico en la descendencia en el futuro.

Dado que la placenta es el órgano que comunica a la madre con el feto, y que media por tanto el transporte de nutrientes y sustancias de desecho entre ambos, son muchos los estudios que analizan los efectos de la GDM sobre la estructura placentaria y por tanto sobre el transporte de nutrientes al feto. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no tienen en cuenta el modo de tratamiento (dieta vs insulina), lo cual podría estar influyendo en los resultados obtenidos, los cuales muestran una gran controversia. De hecho, la insulina juega un papel muy importante en el metabolismo celular, y a pesar de que no es necesaria para la transferencia placentaria de glucosa mediante GLUT-1, puede unirse a su receptor en placenta y activar sus rutas de señalización, lo cual puede afectar al transporte y metabolismo de nutrientes, y por tanto al desarrollo fetal.

Por todos estos motivos, en este estudio hemos tratado de analizar los posibles efectos de la insulina exógena sobre el transporte de nutrientes, y por tanto, su papel sobre el incremento de adiposidad en fetos de madres con GDM. Es de gran importancia identificar los factores que afectan al transporte de nutrientes para regular la macrosomía fetal y evitar así problemas en el futuro.

No obstante, somos conscientes de que la insulina es sólo uno de los eslabones en una red compleja de estímulos y rutas metabólicas que podrían estar regulando el metabolismo placentario y la transferencia de nutrientes al feto. Nos referimos en este caso a factores de crecimiento, citoquinas y adipocinas tales como leptina, adiponectina, TNF α , otras moléculas proinflamatorias así como moléculas propias del estrés oxidativo. Todas ellas juegan un papel en la fisiopatología de la GDM, por lo que han de ser consideradas en este contexto y no hay que obviar su presencia y su acción. Sin embargo, la insulina podría ser considerada el "gold estándar" en la diabetes, y es

DISCUSIÓN

muy importante analizar su mecanismo de acción en placenta, sobre todo en casos de GDM.

1. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LA MADRE Y DE LOS FETOS

El reciente estudio HAPO demuestra que tanto la GDM como la obesidad materna están estrechamente relacionadas con resultados adversos en el embarazo, y que la combinación de ambas puede agravar la situación (Catalano *et al.*, 2012). En ambas patologías se modifican las características antropométricas de la madre, por lo que es muy interesante analizar la relación entre dichas características maternas y el desarrollo fetal, ya que la influencia materna podría tener consecuencias para la descendencia en el futuro.

Las características antropométricas de la madre más estudiadas son el peso y el BMI antes del embarazo, y su evolución a lo largo del mismo. No obstante, en ambos grupos de diabéticas había el mismo número de obesas (n=7 en el grupo GDM-dieta y n=9 en el grupo GDM-insulina). Todos los datos de peso y BMI de nuestras pacientes (pregestacional, reclutamiento y parto) fueron significativamente mayores en las pacientes con GDM, especialmente en aquellas que precisaron insulina (Tabla 6).

En numerosos estudios se ha correlacionado el peso materno pregestacional con el peso del recién nacido y se ha demostrado asociación entre una excesiva ganancia de peso durante el embarazo con un elevado peso neonatal, macrosomía y fetos grandes para su edad gestacional (Catalano *et al.*, 1998; Ouzounian *et al.*, 2011; Viswanathan *et al.*, 2008) . En nuestro estudio, peso pregestacional, peso en el reclutamiento y en el parto están todos correlacionados con el peso de los recién nacidos, lo que demuestra la importancia de las características maternas sobre el desarrollo fetal y sus posibles implicaciones en el futuro. De hecho, un estudio reciente ha demostrado una correlación entre la obesidad materna y alteraciones en la actividad mitocondrial placentaria, en concreto, una disminución en la respiración mitocondrial placentaria de mujeres obesas, lo cual podría desencadenar alteraciones placentarias que tendrán consecuencias sobre el desarrollo de los fetos (Mele *et al.*, 2014).

En cuanto al peso de los recién nacidos, está establecido en la bibliografía el riesgo de niños macrosómicos y niños grandes para su edad gestacional (LGA) en casos de GDM y obesidad (Bowers *et al.*, 2013; Metzger 2007; Sacks 2007). Además, en la mayoría de estos estudios se asocian los niveles de glucosa materna con dicha macrosomía. No obstante, Catalano *et al.* demostraron un aumento en la adiposidad fetal en niños de madres con GDM, aún cuando no presentaban macrosomía, lo que indica que las alteraciones en la adiposidad fetal es un proceso clave para entender el fenotipo de la GDM. Por todo ello, la adiposidad fetal ha cobrado mucha importancia y ha pasado a ser un factor de riesgo a tener en cuenta para diagnosticar la GDM (Catalano *et al.*, 2003).

En el presente estudio, los pesos de los niños al nacer no fueron mayores en las madres con GDM, (Figura 19), ni en valores absolutos ni en valores de z-score en función de la edad gestacional, probablemente porque en estas mujeres se practicaban cesáreas para evitar precisamente la macrosomía. No obstante, estos niños presentaron una tendencia hacia una mayor circunferencia abdominal fetal, que es medida de adiposidad fetal, tanto en el momento del reclutamiento ($p=0.075$) como en el momento del parto ($p=0.071$), en concordancia con el estudio de Catalano mencionado anteriormente. Así pues, la medida ecográfica de la circunferencia abdominal fetal (CA) es una herramienta importante en la evaluación y seguimiento obstétrico de pacientes con GDM, tal y como ya postularon Landon *et al.* (Landon *et al.*, 1989).

Además, la circunferencia abdominal fetal en el momento del parto se correlacionó con el peso de los recién nacidos, y lo que es más importante, con la obesidad materna, tanto en el tercer trimestre (reclutamiento) como en el momento del parto (Tabla 9), lo cual vuelve a demostrar el efecto de la obesidad materna sobre el desarrollo de los fetos.

Según algunos estudios, el tratamiento de la hiperglucemia disminuiría el riesgo de macrosomía y de otros efectos adversos que se producen en la GDM. De hecho existe una relación inversa entre el control glicémico materno y el riesgo de padecer complicaciones (Crowther *et al.*, 2005; Langer *et al.*, 2005). Incluso han sido propuestos tratamientos tempranos de la GDM con insulina para reducir la tasa de macrosomía

DISCUSIÓN

fetal (Shushan *et al.*, 1997). Todos estos datos podrían explicar el hecho de que en nuestro estudio no encontremos diferencias entre los pesos de los recién nacidos, quizá debido al tratamiento. No obstante, existe controversia en cuanto a los beneficios del tratamiento de la glucemia materna, y algunos estudios han demostrado la presencia de macrosomía aun en embarazos con glucemias bien controladas (Aman *et al.*, 2011). De hecho, el estudio HAPO demostró una fuerte correlación entre el aumento de los niveles de glucosa materna y la adiposidad fetal (HAPO 2009), aún con valores de glucosa por debajo de los límites patológicos, lo cual pone de manifiesto que otros factores, además de la glucemia materna, contribuyen al desarrollo fetal, especialmente al peso de los recién nacidos y a la adiposidad fetal.

2. GLUCEMIA E INSULINA EN LA MADRE Y EN LOS RECIÉN NACIDOS

Según la hipótesis de Pedersen, la hiperglucemia materna conduce a la hiperglucemia fetal, y por consiguiente, a la hiperinsulinemia fetal, que es la responsable del crecimiento fetal exagerado (Pedersen 1952). Para conocer el estado glucémico de nuestras gestantes a lo largo del tercer trimestre, realizamos una determinación de glucosa en ayunas en el momento del reclutamiento y otro en el momento del parto. Las cifras de glucosa materna fueron significativamente mayores en ambos grupos de diabéticas con respecto a los controles, tanto en el tercer trimestre (reclutamiento) como en el momento del parto, a pesar de haber sido tratadas clínicamente. No obstante, es de importancia destacar que los niveles de glucosa de estas mujeres diabéticas estaban dentro del límite de normalidad, aunque siendo sus cifras significativamente mayores que la de los controles. Sin embargo, en nuestro estudio no obtuvimos correlaciones entre los niveles glucémicos y resultados neonatales adversos tales como circunferencia abdominal fetal, peso de los niños al nacer ni ningún otro.

En cuanto a las glucemias fetales hay que tener en cuenta la imposibilidad de medir cualquier parámetro bioquímico del feto durante su vida intrauterina, por lo que estos valores no pueden ser estudiados fácilmente. La bioquímica obtenida del cordón umbilical, sólo refleja el estado fetal en un momento concreto y los valores pueden

estar afectados por otras variables imposibles de controlar como las horas de ayuno de la madre, la duración del parto, la vía del mismo, así como el estrés que el feto experimenta en este proceso. Sin embargo estos datos son la única forma que tenemos de aproximarnos al conocimiento del metabolismo fetal.

Las glucemias obtenidas en suero venoso umbilical fueron muy parecidas entre los tres grupos de nuestro estudio, aunque ligeramente superiores en los recién nacidos de madres con GDM tratadas con insulina (Figura 23). Este hecho pone de manifiesto que los fetos tienen capacidad para regular su propia glucemia, mediante la producción de insulina, tal y como postulaba Pedersen (Pedersen 1952), o mediante la producción de ácidos grasos saturados por la ruta de novo de síntesis de ácidos grasos.

La hiperinsulinemia fetal puede favorecer además el depósito de glucógeno y de ácidos grasos en hígado y otros tejidos. Se ha descrito también la posibilidad de que exista un mecanismo de transporte inverso de glucosa desde el feto hacia la placenta que se pone en marcha tras saturarse los depósitos fetales de glucógeno y que estaría mediado por los transportadores GLUT 1 y GLUT 3. Este exceso de glucosa quedaría depositado en forma de glucógeno en el estroma placentario, entre los capilares y las células del sincitiotrofoblasto. Sería la insulina fetal la que estimularía el transporte inverso de glucosa. Una vez la placenta queda "saturada", el exceso de glucosa continuaría almacenándose en los tejidos fetales causando la macrosomía. Por tanto, un fallo en la capacidad de la placenta de asumir el exceso de glucosa fetal, sería también responsable de la macrosomía y no directamente la hiperglucemia materna (Desoye *et al.*, 2002). Los depósitos de glucógeno en el tejido placentario han sido descritos clásicamente en estudios histológicos de placentas de sujetos con DMG.

Las cifras de insulina materna en el reclutamiento fueron significativamente mayores en el grupo de mujeres que posteriormente recibieron insulina para lograr un control glucémico adecuado, debido a que su estado era más grave y presentaban mayor resistencia a la insulina, tal y como muestra su mayor índice de resistencia a la insulina HOMA (Figura 25). Sin embargo, en el momento del parto, los valores de insulina entre los tres grupos fueron similares, aunque con una fuerte tendencia a ser mucho mayores en el grupo de las diabéticas tratadas con insulina ($p=0.067$) (Figura

DISCUSIÓN

24). De hecho, las diferencias fueron estadísticamente significativas si solo se comparaban entre sí los grupos control vs GDM insulina. Esto podría ser debido al propio tratamiento (insulina exógena), y también a la mayor resistencia a la insulina en estas gestantes. En algunos estudios en los que se ha estudiado el HOMA en la GDM se describe una disminución en la sensibilidad a la insulina en las pacientes con GDM y sobrepeso comparadas con pacientes delgadas sin GDM. Además la sensibilidad a la insulina empeora con el avance de la gestación (Endo *et al.*, 2006). Paradisi *et al.* proponen la utilización del HOMA en el primer trimestre como un parámetro predictor de diabetes gestacional en pacientes embarazadas con alto riesgo de padecer esta patología (Paradisi *et al.*, 2010).

A pesar de estas diferencias en las cifras de insulina y del índice HOMA en las gestantes, los valores de insulina y de HOMA en los recién nacidos se mostraron muy similares entre los tres grupos (Figuras 24 y 25). Esto puede ser debido a que los niveles de insulina en sangre de cordón son difíciles de determinar debido a la hemólisis que suele afectar a un 15% de las muestras que se recogen y que favorece la degradación de la insulina. Además, la insulina materna no es capaz de atravesar y la placenta, y los fetos son capaces de regular su propia glucemia, como se ha mencionado anteriormente.

3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS

En mujeres con GDM se ha descrito un aumento en la inflamación sistémica con una elevación en los niveles de adipoquinas y citoquinas inflamatorias, quizá debido a la acumulación de macrófagos funcionales en el estroma intersticial de la placenta y del tejido adiposo (Klein *et al.*, 2008, Radaelli *et al.*, 2003). De ahí que se postule la hipótesis de que cambios en los niveles de adiponectina, resistina, leptina y TNF α podrían conectar la situación de inflamación con cambios metabólicos que aumentarían la resistencia a la insulina en la madres (Kirwan *et al.*, 2002, Desoye *et al.*, 2007). Además, muchas de estas citoquinas intervienen en la regulación de transportadores de nutrientes, por lo que influirían también en el desarrollo de los fetos.

En el presente estudio, los niveles en suero materno de **adiponectina** fueron menores en el grupo de las mujeres diabéticas en comparación con las controles, y

aunque en el parto estas diferencias no fueron significativas, sí se observó una tendencia hacia valores más bajos en las mujeres con esta patología ($p=0.082$) (Figura 33). Dado que la adiponectina está relacionada con la sensibilidad a la insulina (Diez *et al.*, 2003), lo esperado es que sus niveles sean más bajos en los casos en los que la resistencia a la insulina es mayor, es decir, en las madres diabéticas. Además, nuestros datos están en concordancia con varios estudios, que demuestran niveles reducidos de adiponectina en mujeres con GDM (Heitritter *et al.* 2005; Pala *et al.* 2015; Winzer *et al.* 2004).

En los recién nacidos no se observaron diferencias en los niveles de adiponectina, quizá debido a que estas moléculas no pueden atravesar la placenta (Zaretsky *et al.*, 2004), y a que la inflamación materna no tiene porqué desencadenar un estado de inflamación fetal (Hauguel-de Mouzon y Guerre-Millo 2006). No obstante, las concentraciones de adiponectina fueron significativamente mayores en los recién nacidos en comparación con sus madres. De hecho, algunos estudios han demostrado niveles más altos de adiponectina en los recién nacidos que en sus madres (Chan *et al.*, 2004; Kotani *et al.*, 2004), lo cual podría indicar que dichos niveles provienen de la síntesis fetal, en concreto del tejido adiposo, ya que esta adiponectina no puede venir de la placenta porque esta no es capaz de sintetizarla, aunque sí tenga receptores para ella (Lappas *et al.* 2005).

Numerosos estudios postulan que la **leptina** juega un papel muy importante en el embarazo, ya que los niveles en suero materno son mucho mayores en mujeres embarazadas que en las no embarazadas (Kautzky-Willer *et al.* 2001). En cuanto a los niveles de leptina en suero materno en casos de GDM, la mayoría de los estudios apuntan hacia una hiperleptinemia (Ategbo *et al.* 2006; Guvener *et al.*, 2012), así como un incremento en la producción placentaria de esta adipoquina (Lepercq *et al.*, 1998), pero hay otros estudios que demuestran una disminución en sus niveles (Festa *et al.*, 1999; McLachlan *et al.*, 2006) y otros que no encuentran diferencias en los niveles de esta adipoquina (Simmons y Breier 2002). En el presente estudio no se detectaron diferencias en las concentraciones maternas de esta citoquina entre los grupos, ni en el momento del reclutamiento ni en el momento del parto. Tampoco obtuvimos correlación alguna entre los niveles de leptina y las concentraciones de glucosa,

DISCUSIÓN

insulina o IMC materno, a diferencia de otros estudios que sí encontraron dichas correlaciones (Kautzky-Willer *et al.* 2001).

En cuanto a los recién nacidos, tampoco se observaron diferencias en los niveles de leptina, a diferencia de otros estudios que observaron niveles más bajos de leptina en niños macrosómicos de madres con GDM (Ategbo *et al.*, 2006), siendo los niveles en los recién nacidos similares a los maternos, a diferencia de lo que ocurría con la adiponectina. En estos estudios no se diferencia el tipo de tratamiento, aunque en la mayoría hay un porcentaje de mujeres que no consiguieron el control glucémico con la dieta y recibieron insulina, por lo que en principio la insulina no estaría afectando a los niveles de esta citoquina.

La **resistina** producida en el tejido adiposo está relacionada con la resistencia a la insulina (Steppan *et al.* 2001), aunque esto en humanos todavía no está muy definido (Briana y Malamitsi-Puchner 2009). En nuestro estudio se aprecia una tendencia hacia valores mayores a lo largo del embarazo, lo cual había sido demostrado previamente por otros autores (Ramirez *et al.*, 2012), pero no diferencias entre GDM y controles. Debido a que en la GDM se produce un aumento en la resistencia a la insulina, es lógico que los niveles de resistina estén aumentados, como demuestran algunos estudios (Morisset *et al.* 2011). No obstante, existe controversia a este respecto, y en un estudio de revisión reciente en el que se analizaron 11 trabajos sobre los niveles de resistina en la GDM, no encontraron diferencias en sus niveles normales entre mujeres sanas y mujeres con GDM (Lobo *et al.* 2013). Además, también existe controversia en cuanto a la asociación entre los niveles de resistina y la resistencia a la insulina. Así pues, Kuzmicky *et al.* no encontraron correlación alguna, mientras que otros estudios sí que demostraron esta asociación (Gharibeh *et al.* 2010; Kirwan *et al.* 2002). Es importante mencionar que en el presente estudio, no encontramos relación alguna entre los valores de esta hormona y el índice de resistencia a la insulina (HOMA).

Tampoco encontramos diferencias en los niveles de **TNF α** en las mujeres con GDM con respecto a las controles, a pesar de que existe una evidencia de que esta citoquina está aumentada en casos de GDM, utilizándose en muchos casos como marcador de la GDM (Kirwan *et al.* 2002; Xu *et al.* 2014). En los sueros de los recién

nacidos tampoco se observaron diferencias en los niveles de TNF α con respecto a los controles. No obstante, y al igual que pasaba con la adiponectina, los niveles de TNF α en los recién nacidos eran mucho mayores que en el suero materno. Quizá esto sea debido a la hiperproducción placentaria de TNF α que ha sido demostrada en algunos estudios (Radaelli *et al.* 2003). No obstante, también se ha demostrado la asociación directa entre esta adipoquina y la adiposidad fetal (Radaelli *et al.*, 2003), y la asociación directa con la resistencia a la insulina, ya que TNF α es capaz de bloquear su ruta de señalización (Barbour *et al.* 2007). Lamentablemente, en nuestro estudio no se dieron estas asociaciones.

En definitiva, en GDM tratadas las diferencias en las citoquinas fueron escasas y solo encontramos diferencias en la adiponectina materna que disminuyó, mientras que la resistina tendió a aumentar con la GDM.

4. PARÁMETROS LIPÍDICOS

4.1 Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos totales

El embarazo es el único estado metabólico que se caracteriza por un incremento progresivo de los lípidos circulantes para optimizar la disponibilidad de substratos necesarios para el crecimiento y desarrollo fetal. Se han descrito multitud de alteraciones en los lípidos maternos asociadas a la GDM, existiendo una gran controversia entre los distintos autores en todas las fracciones de lípidos estudiadas. Los resultados tan dispares obtenidos podrían deberse al momento del embarazo estudiado, al tipo de diabetes, al tratamiento empleado y al grado de control glucémico, así como a otras diferencias metodológicas y a tamaños muestrales reducidos (Koukkou *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2015). La hiperlipidemia que ocurre en gestaciones normales es bien conocida y se sabe que está impulsada por el aumento de hormonas esteroideas (Montelongo *et al.* 1992), así como por la situación de resistencia a la insulina. En la GDM se ha descrito una disminución de estas hormonas así como de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (Thadhani *et al.*, 2003), por lo que el grado de control metabólico y de disfunción a nivel de estas hormonas, podría determinar el mayor o menor grado de dislipemia en la GDM (Park *et al.* 2015).

DISCUSIÓN

A pesar de un buen control glucémico, en las pacientes con GDM, los niveles lipídicos de la madre, parecen influir de manera importante en los niveles de lípidos en el feto, así como en su crecimiento, de modo que los recién nacidos que experimentan alteraciones del crecimiento durante la vida fetal parecen estar expuestos a un ambiente intrauterino distinto comparados con aquellos cuyo crecimiento es normal (Schaefer-Graf *et al.*, 2008).

En el presente estudio las cifras de colesterol total en suero materno, fueron muy similares entre los tres grupos de pacientes. Obtuvimos valores de hipercolesterolemia fisiológica en el embarazo, pero en ninguno de los tres grupos se alcanzó la condición patológica de hipercolesterolemia suprafisiológica (>280 mg/dl). En las concentraciones plasmáticas de colesterol total durante el embarazo, es donde más discrepancias encontramos entre los distintos autores (Rizzo *et al.* 2008; Sanchez-Vera *et al.* 2007).

En cuanto al colesterol total en sangre de cordón, se han correlacionado sus niveles con el grado de control glucémico materno en la GDM, obteniendo una asociación entre la hiperglucemia materna y niveles menores de colesterol total en sangre de cordón (Gordon *et al.*, 2009). En nuestro caso, las concentraciones de colesterol total en suero de vena umbilical fueron similares entre los tres grupos, al igual que ocurrió en las madres, y sus niveles no se correlacionaron con la bioquímica materna (resultados no mostrados).

En cambio, tanto las cifras de TG como de AG fueron significativamente mayores en el grupo de gestantes tratadas con insulina en el momento del reclutamiento, cuando sus glucemias no estaban todavía reguladas. En el momento del parto, estos valores tendieron a ser más altos en el grupo de diabéticas insulinizadas ($p=0.187$ para TG; $p=0.121$ para AG) (Figuras 27 y 28). Sin embargo, los valores de TG y de AG, fueron significativamente menores en el suero umbilical de los recién nacidos de madres con GDM tratadas con insulina con respecto a los controles (Figuras 27 y 28). Aunque en sangre de cordón la cantidad total de TG y AG estaba disminuida en niños de mujeres con GDM, los % de ácidos grasos saturados estaban elevados lo que indica claramente que se trata de un mecanismo compensatorio para regular los

niveles de glucemia fetales. Esto podría programar al feto hacia una respuesta cardiovascular adversa. En cambio, los % de ácidos grasos poliinsaturados como los EPA y los LC-PUFA, que dependen del transporte placentario, estaban disminuidos en hijos de mujeres con GDM lo que podría indicar además una alteración en la transferencia de grasa a través de la placenta para evitar la hiperlipidemia en el feto.

La menor concentración de TG y AG en sangre fetal podría indicar un transporte alterado de estos lípidos en la placenta, y/o una acumulación de los AG del suero materno en el tejido adiposo fetal de los recién nacidos, lo que podría explicar la mayor CA en los hijos de las madres con GDM. Schaeffer y Graf ya describieron una disminución en los niveles de TG y AG en suero de cordón de niños de mujeres con GDM que podría estar relacionada con la mayor acumulación de grasa en dichos niños. Sin embargo, esta asociación no se producía en embarazos sin GDM (Schaefer-Graf *et al.* 2008).

En nuestro estudio, los niveles de DHA (en porcentaje) fueron mucho menores en suero fetal en casos de GDM tratados con insulina con respecto a los controles (Figura 11), tal y como ha sido descrito previamente en la bibliografía (Min *et al.* 2005; Wijendran *et al.* 2000) y que nosotros hemos corroborado usando ácidos grasos marcados con isótopos estables en GDM (Pagan *et al.* 2013). No obstante, los niveles de DHA en las madres con GDM fueron mayores que en las controles, por lo que debe existir una alteración en el transporte de este ácido graso en las placentas. En cualquier caso, parece que en la GDM ocurren tanto alteraciones en la transferencia placentaria de algunos ácidos grasos como un aumento de la deposición de grasa en el tejido adiposo fetal. Además, se desconocen los mecanismos responsables del descenso de DHA en estos niños, lo que podría asociarse con un peor neurodesarrollo de los mismos. De hecho, son ya varios los estudios que han mostrado un neurodesarrollo alterado en la capacidad motora y lenguaje en niños de GDM a edad escolar (Dionne *et al.* 2008; Krakowiak *et al.* 2012; Ornoy *et al.* 2001).

4.2 Lisofosfolípidos

El DHA se esterifica principalmente en los fosfolípidos del plasma materno que serán, por tanto, una importante fuente de DHA disponible para el transporte

DISCUSIÓN

placentario (Gil-Sanchez *et al.* 2012). Recientemente se ha publicado en la prestigiosa revista NATURE que los lisofosfolípidos podrían ser transportados selectivamente a través de la membrana hematoencefálica de ratones, produciendo un aporte selectivo de DHA desde lisofosfatidilcolina (LPC) al cerebro. En concreto, el estudio ha mostrado que en cerebro de ratones la principal fuente de DHA para ser transportado a través de la barrera hematoencefálica es la lisofosfatidilcolina (Nguyen *et al.* 2014). Así pues, decidimos analizar los niveles de lisofosfolípidos tanto en las madres como en los recién nacidos en nuestro estudio. Observamos una tendencia a disminuir en los niveles (en valor absoluto) de lisofosfolípidos en las madres diabéticas, especialmente en las tratadas con dieta, lo cual está en concordancia con Barber *et al.* que demostraron una disminución en los niveles de lisofosfatidilcolina en casos de obesidad y diabetes tipo 2 (Barber *et al.* 2012). No obstante, en los recién nacidos de nuestro estudio no se observaron cambios en los niveles de lisofosfolípidos totales, lo cual podría indicar un metabolismo alterado en las gestantes con GDM. Analizamos entonces los niveles de DHA en lisofosfolípidos en suero materno y en suero venoso umbilical. Tanto en el reclutamiento como en el parto, el % de DHA en lisofosfolípidos fue mayor en las mujeres diabéticas tratadas con dieta, mientras que en los recién nacidos y en la placenta, el % de DHA en lisofosfolípidos tendió a disminuir en los casos de GDM ($p=0.152$). Además en concentraciones absolutas el DHA en liso-PL también tendió a disminuir en niños de madres con GDM. Así pues, el transporte de DHA en liso-PL parece estar alterado en la GDM y podría contribuir a la transferencia alterada de DHA en la GDM. A pesar de todo ello, los valores de DHA en lisofosfolípidos fueron mucho mayores en el cordón que en suero materno, lo cual pone de manifiesto del fenómeno de biomagnificación mencionado anteriormente.

5. ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN PLACENTARIAS

Existen varias medidas para valorar el estado placentario en la GDM. Nosotros utilizamos el peso de la placenta tras el parto y la medida de su grosor en la ecografía en el momento del reclutamiento y justo antes del parto. Las pacientes con GDM presentaron placentas significativamente mayores en ambas medidas con respecto a los controles (Figuras 37 y 38). Estos resultados coinciden con la bibliografía en la que

clásicamente se ha descrito que en las pacientes con GDM la placenta tiene un peso y un tamaño mayor que en mujeres sanas (Gauster *et al.* 2012), aun cuando han conseguido un buen control glucémico (Taricco *et al.*, 2003). En la ecografía que realizamos a las pacientes unos días antes del parto, se valoró el grosor placentario máximo y encontramos también diferencias significativas entre los dos grupos de diabéticas con respecto a los controles. El aumento del grosor en las placentas en estas pacientes valorado en la ecografía del tercer trimestre, se ha descrito como un marcador para realizar *screening* ecográfico de la GDM (Perovic *et al.*, 2012), junto a otros parámetros ecográficos.

El peso placentario nos proporciona una medida indirecta de la superficie disponible para el intercambio de nutrientes, por lo que se considera que el peso de la placenta es un determinante del peso y del crecimiento fetal (Roland *et al.*, 2012), y está directamente implicado en el transporte de nutrientes al feto (Fowden *et al.*, 2006). Numerosos estudios muestran una estrecha correlación entre el peso de la placenta y el peso del recién nacido (Roland *et al.* 2012; Salafia *et al.*, 2008; Wallace *et al.* 2012), y la "placentomegalia" se ha correlacionado con la macrosomía (Gauster *et al.* 2012; Jansson y Powell 2007) y con la adiposidad fetal (Friis *et al.*, 2013). En nuestro estudio corroboramos que el peso placentario se correlaciona con el peso del recién nacido ($r=0.546$; $p= 0.000$) y con la medida de la circunferencia abdominal en la ecografía realizada en el momento del parto ($r= 0.409$; $p=\leq 0.001$), demostrándose así la relación entre el peso placentario y la adiposidad fetal, tal y como ha sido propuesto en otros estudios (Friis *et al.*, 2013). Sin embargo, actualmente no se saben las razones del nexo entre el elevado peso fetal y placentario, y no está claro si la placentomegalia es la causa o la consecuencia del excesivo crecimiento fetal y la excesiva acumulación de grasa (Hiden *et al.*, 2009).

Todos estos datos evidencian alteraciones en la placenta que pueden afectar al transporte de nutrientes al feto, por lo que en este estudio decidimos analizar los niveles de expresión de proteínas transportadoras de ácidos grasos en placentas de mujeres con GDM, así como la posible influencia del tratamiento (dieta o insulina) sobre ellas. En la mayoría de los estudios realizados sobre alteración en los transportadores placentarios en casos de GDM, no separan los grupos de diabéticas en

DISCUSIÓN

función de los tratamientos con dieta o con insulina, por lo que no podemos comparar nuestros datos en la mayoría de los casos.

5.1 Transportadores placentarios de ácidos grasos

En cuanto a las lipasas placentarias, existe gran controversia en la bibliografía en cuanto su expresión y actividad en casos de GDM: En el presente estudio, los niveles de LPL disminuyeron de forma significativa en los grupos de diabéticas en comparación con las controles, aunque no observamos diferencias entre las diabéticas tratadas con dieta y tratadas con insulina (Figura 39A). Quizá la reducción de LPL se deba al papel modulador que tiene la placenta, ya que en este caso reduciría la expresión de LPL para contrarrestar el exceso de grasa que se estaría depositando en los fetos, tal y como reportaron previamente otros autores (Radaelli *et al.* 2009). Por el contrario, los niveles de EL tendieron a aumentar, sobre todo en las GDM tratadas con insulina, contribuyendo al aumento del transporte placentario lipídico y a la consiguiente adiposidad fetal, tal y como propuso el grupo de Gauster *et al.* Estos autores además realizaron un estudio *in vitro* con células endoteliales placentarias en las que observaron que la insulina no regulaba la proteína EL, sino que lo hacía TNF α (Gauster *et al.* 2011). Por otro lado, Radaelli *et al.* demostraron un aumento en los niveles de EL en mujeres con GDM tratadas con insulina, por lo que la insulina podría estar jugando en este caso un papel importante activando la liberación de lisofosfolípidos para su captación placentaria. En este estudio también demostraron una disminución en la expresión de LPL en las mujeres GDM tratadas con insulina, lo cual concuerda con nuestros resultados (Radaelli *et al.* 2009). No obstante, otros grupos han demostrado que en casos de GDM la actividad de LPL no se ve alterada (Lindegard *et al.*, 2006; Magnusson *et al.* 2004), aunque tampoco se tuvo en cuenta el tratamiento con dieta o insulina. Así pues, los resultados sobre expresión, actividad y efecto de la insulina sobre estas lipasas placentarias son francamente contradictorios.

En la bibliografía apenas existen datos sobre los niveles de las proteínas transportadoras de ácidos grasos en placentas con GDM. En el presente estudio, prácticamente todas las proteínas transportadoras de ácidos grasos analizadas (A-FABP, FAT y FATP-1), tendieron a aumentar en los grupos de diabéticas, mostrando los valores más altos en las diabéticas tratadas con insulina (Figura 39B), lo cual sugiere

una mayor transferencia de ácidos grasos en la placenta que podría ser el responsable del mayor peso placentario (Gauster *et al.* 2012) y de la mayor adiposidad de los recién nacidos (Figura 38, Tabla 8).

En cuanto a FAT, que es un transportador de grasa bastante inespecífico y que es muy abundante en tejido adiposo, existen pocos datos sobre sus alteraciones en GDM. Radaelli *et al.* no encontraron cambios en la expresión de FAT en placentas de mujeres GDM tratadas con insulina (Radaelli *et al.* 2009), aunque sí se ha demostrado un aumento de este transportador en placentas de mujeres obesas, por lo que también estaría contribuyendo a la mayor transferencia de grasa al feto (Dube *et al.* 2012). Esta proteína se expresa en la membrana microvellositaria (MVM) y basal (BM) de los sincitiotrofoblastos y actúa por tanto en la captación y transferencia de ácidos grasos al feto, al igual que las proteínas transportadoras de ácidos grasos FATP y FABPpm. En el interior de las células los ácidos grasos son transportados por proteínas FABP entre las cuales se encuentra A-FABP (Gil-Sanchez *et al.* 2012). En nuestro estudio A-FABP se correlacionó con FAT ($r=0.441$, $p<0.001$), y con FATP-1 ($r=0.267$, $p=0.036$), lo cual sugiere una actividad coordinada de estos transportadores para el tráfico de ácidos grasos en la placenta. Radaelli *et al.* demostraron también en mujeres con GDM (tratadas con insulina) un aumento en la expresión de A-FABP de dos a 4 veces superior a las controles (Radaelli *et al.* 2009), lo cual sugiere el posible efecto de la insulina en la activación de la expresión de estos genes y su papel por tanto en la activación de la transferencia de lípidos al feto.

A diferencia de FATP-1, FATP-4 se ha relacionado con el transporte selectivo de DHA (Larque *et al.* 2006). Cuando se analizaron los niveles de FATP-4 en las placentas de las mujeres del presente estudio, observamos que, a diferencia del resto de proteínas, este transportador tendió a ser menor en las mujeres diabéticas, hecho que se describe por primera vez en estas pacientes. Esto podría explicar los bajos niveles de LC-PUFA n-3 y DHA encontrados en el cordón de los niños GDM de nuestro estudio (Figura 11). FATP-4 no se asoció con el %DHA de cordón, pero se correlacionó con las concentraciones de DHA en lisofosfolípidos en placenta ($r=0.280$, $p=0.029$) lo cual sugiere que debe existir un mecanismo específico de transporte de DHA esterificado en lisofosfolípidos en el que podría estar implicado FATP-4.

DISCUSIÓN

Dado el reciente descubrimiento del transportador de lisofosfolípidos, MFSD2A, que podría actuar favoreciendo el transporte selectivo de DHA a través de la barrera hematoencefálica de ratas (Nguyen *et al.* 2014), decidimos analizar sus niveles en las placentas de nuestro estudio. De hecho, en la presente tesis se describen por primera vez los niveles de MFSD2A en placentas de mujeres con GDM. Los niveles de MFSD2A fueron significativamente menores en el grupo de mujeres con GDM. Este transportador se correlacionó además con los niveles de DHA (en %) en el suero de cordón ($r=0.388$, $p=0.003$). Por lo tanto, en este estudio demostramos por primera vez el mecanismo implicado en los descensos de DHA en niños de madres diabéticas, mediado por MFSD2a. Es importante mencionar que el descenso de DHA en el presente estudio tuvo repercusiones clínicas y los hijos de madres con GDM tuvieron menor puntuación del test de Bayleys y menor adaptación de los ritmos circadianos de temperatura y actividad motora a los 6 meses de vida ().

Numerosos estudios han establecido que el IMC materno (antes del embarazo y durante éste), determina la macrosomía, presencia de niños LGA y una excesiva adiposidad fetal al nacer, con y sin presencia de GDM (Barnes *et al.*, 2013; Black *et al.*, 2013; HAPO 2010; Ouzounian *et al.* 2011), por lo que decidimos analizar si existían asociaciones entre el peso materno (antes y durante el embarazo) y los transportadores placentarios de ácidos grasos. Los transportadores placentarios EL Y FAT se correlacionaron con el IMC materno, antes del embarazo y durante este, lo cual pone de manifiesto que la influencia del IMC materno sobre el peso al nacimiento podría ejercerse por la mayor expresión de estos transportadores de grasa en la placenta.

El IMC está relacionado con variables biológicas específicas incluyendo factores genéticos, nutricionales y endocrinos, que están relacionados con el crecimiento fetal. De hecho, sustancias liberadas por el tejido adiposo pueden afectar al crecimiento fetal directamente o modificando las funciones placentarias. De hecho, en nuestro estudio niveles más bajos de adiponectina se asociaron con el IMC materno ($r=-0.286$, $p=0.024$), pero estos valores no se asociaron con los transportadores de ácidos grasos ni con el peso placentario, por lo que esta adipoquina no puede ser el mediador del IMC en los transportadores de ácidos grasos.

Algunos estudios proponen la placenta como el principal determinante del peso de los niños al nacer y del crecimiento fetal, teniendo un papel más importante que el propio IMC (Friis *et al.* 2013; Jansson y Powell 2007; Roland *et al.* 2012). En nuestro caso, demostramos una asociación positiva del transportador A-FABP y una asociación negativa del transportador MFSD2A con el grosor placentario (Tabla 13). Así pues, el cambio en la estructura de la placenta favorecería la transferencia general de lípidos vía A-FABP, EL, FATP-1 y FAT pero disminuiría la transferencia de DHA probablemente mediante MFSD2A y FATP-4. De hecho, MFSD2A es una proteína con un papel relevante en la formación del sincitiotrofoblasto, con lo que la estructura placentaria estaría directamente implicada en su expresión. Así pues, cambios en la estructura placentaria provocan cambios en los transportadores de nutrientes, afectando así al crecimiento y desarrollo fetal.

5.2 Mediadores de la ruta de señalización de la insulina en placenta

Aunque la insulina no puede activar la placenta, ni regular el transporte de glucosa mediante la activación de GLUT-1, sí que puede unirse a su receptor específico IR presente en la membrana de los trofoblastos y activar sus rutas de señalización (Desoye *et al.* 1992), influyendo así en el metabolismo placentario y en el transporte de nutrientes al feto. La sensibilidad de la placenta a la insulina materna a lo largo del embarazo es muy controvertida. Algunos estudios postulan que la placenta es más sensible a la insulina materna al principio de la gestación, mientras que al final del tercer trimestre pierde sensibilidad, quizá debido a cambios en la distribución de sus receptores entre el compartimento materno y fetal, ya que se ha visto que al final del embarazo los receptores de insulina son más abundantes en las células del endotelio fetal (Desoye *et al.* 1997). De acuerdo con esto, un estudio reciente ha demostrado que la respuesta a la insulina en etapas tempranas del embarazo se asocia fuertemente con el peso de la placenta a término y con el volumen de esta a mitad de la gestación (O'Tierney-Ginn *et al.* 2015), sugiriendo que la insulina materna al inicio del embarazo tiene un papel muy importante para el desarrollo de la placenta, mientras que al final de éste tiene un papel menos relevante. En nuestro estudio, tanto la insulina como la glucosa materna en el momento del reclutamiento se correlacionaron con el peso de la

DISCUSIÓN

placenta a término (Figura 45), pero esta asociación no se dio con la insulina en el momento del parto, lo cual concuerda con los estudios anteriores. Además, el z-score de la circunferencia abdominal fetal en el momento del parto se asoció con los niveles de insulina en el reclutamiento, lo cual demuestra el importante papel que juega la insulina en el desarrollo feto-placental, aún en etapas tempranas del embarazo, tal y como fue propuesto por el grupo de Catalano y colaboradores (Catalano *et al.*, 1995).

Otros estudios han mostrado una alta expresión del receptor de insulina en la MVM del sincitiotrofoblasto a término lo que sugiere que la insulina materna podría afectar también a la función trofoblástica in vivo al final del embarazo (Ramirez *et al.*, 2012). Además, Friis *et al.* describieron que la insulina materna al final del embarazo se asociaba fuertemente con el peso de la placenta, poniendo de manifiesto el efecto de esta hormona en etapas finales del embarazo (Friis *et al.* 2013).

Por todo ello decidimos analizar en placentas a término el estado de activación de las principales rutas de la insulina (PI3K-Akt-mTOR, MEK-ERK), mediante el estudio del nivel de activación de algunos de sus mediadores, tales como IRS1-2, Akt, ERK, y la proteína ribosomal S6. Con ello podríamos evaluar la presencia de algún defecto en la transmisión de señales intracelulares en placentas de mujeres con GDM que pudieran ser causantes de la resistencia a la insulina, así como el posible efecto del tratamiento (dieta-insulina) en la señalización de la insulina en placenta y en la regulación de los transportadores de ácidos grasos en la misma.

La ruta de PI3K-Akt ha sido ampliamente estudiada en casos de resistencia a la insulina en tejidos periféricos, debido al importante papel que juega en el metabolismo de la glucosa vía activación del transportador GLUT-4. Estudios previos en tejidos periféricos han mostrado alteraciones en la ruta de la insulina en mujeres con GDM (Catalano *et al.* 2002; Colomiere *et al.* 2010; Friedman *et al.* 1999), aunque en algunos de ellos el tratamiento con insulina no fue capaz de solventar esa alteración (Colomiere *et al.* 2010; Tomazic *et al.* 2002). En nuestro estudio, los niveles de activación de Akt (p-Akt) y de ERK (p-ERK) fueron significativamente mayores en el grupo de mujeres tratadas con insulina (Figura 46), mientras que en el grupo de mujeres tratadas con dieta los niveles de p-Akt tendieron a disminuir, lo cual sugiere un estado de resistencia

a la insulina en las placentas de estas pacientes, que es revertido mediante el tratamiento con insulina exógena. Estos estudios concuerdan con otros realizados en placentas, en los que en mujeres tratadas con dieta se observó un aumento en los niveles de la subunidad reguladora de la PI3K (p85 α), lo que se traduce en un bloqueo de la ruta de señalización de PI3K-Akt y en la existencia de resistencia a la insulina en estas pacientes (Alonso *et al.* 2006; Colomiere *et al.* 2009). En cambio en las mujeres tratadas con insulina los niveles de esta subunidad disminuyeron con respecto a las tratadas con dieta, lo cual implica reactivación de la vía de Akt superando la resistencia a la insulina, hecho que concuerda con nuestros resultados (Colomiére *et al.*, 2009). El hecho de que la insulina exógena pueda revertir el estado de resistencia en placenta es de gran relevancia, ya que en tejidos periféricos esto ocurre con mayor dificultad, tal y como han postulado algunos estudios en los que se muestra como la resistencia a la insulina puede llegar a ser irreversible (Tomazic *et al.*, 2002, Colomiére *et al.*, 2010).

En cuanto a los substratos del receptor de la insulina (IRS) de este estudio, cuya fosforilación en residuos de Tyr es necesaria para la propagación de la señal de la ruta de Akt, los niveles de fosforilación en estos residuos (p-Tyr) mostraron una tendencia a aumentar en las mujeres diabéticas, sobre todo en las tratadas con insulina, lo cual concuerda con el incremento de p-Akt en estas mujeres.

Como se ha mencionado anteriormente, en el presente estudio los niveles de p-ERK fueron significativamente mayores en las mujeres tratadas con insulina. Sin embargo, en la bibliografía no hay estudios que hayan analizado esta ruta en placentas de mujeres diabéticas. En un estudio reciente se ha demostrado la alteración de la ruta ERK en músculo esquelético de mujeres obesas, lo cual podría estar relacionado también con la resistencia a la insulina presente en estas mujeres. (Ruiz-Alcaraz *et al.* 2013) No obstante, todavía no se conoce el significado y las consecuencias de alteraciones en esta ruta de señalización de la insulina en la placenta, por lo que sería muy interesante su investigación en profundidad.

El efector que se encuentra aguas abajo de mTOR, p-S6, tendió a aumentar en las mujeres tratadas con insulina, debido al tratamiento con insulina exógena, o debido al exceso de nutrientes que se da en estas mujeres. Esto podría deberse a que mTOR

DISCUSIÓN

puede ser activado por glucosa y por aminoácidos además de insulina puesto que se trata de un sensor de nutrientes (Jansson *et al.* 2012). Estudios recientes demuestran una activación de esta ruta en la placenta en casos de obesidad y GDM, con la consecuente activación del transporte de aminoácidos y el consecuente sobrecrecimiento fetal (Jansson *et al.*, 2013; Jansson *et al.* 2002). Sin embargo, a pesar de que en los niños de nuestro estudio observamos una mayor adiposidad fetal, p-S6 no se asoció ni con el peso ni con la adiposidad fetal.

5.3 Relación entre la insulina y el metabolismo de lípidos en la placenta.

Como se ha mencionado anteriormente, la obesidad materna está fuertemente correlacionada con el peso de los niños al nacer (Black *et al.* 2013; Catalano y Ehrenberg 2006). No obstante, el BMI no es un efector, por lo que no se conocen los mecanismos mediante los cuales el BMI materno puede afectar a la descendencia. En nuestro estudio, los niveles placentarios de p-Akt y p-ERK se correlacionaron con el peso de las madres, tanto antes del embarazo, como en el desarrollo de éste, sugiriendo que el efecto del BMI materno sobre el desarrollo fetal es mediante la ruta de señalización de la insulina. No obstante, tanto el BMI como la GDM estarían contribuyendo a la activación de la ruta de la insulina.

En mujeres con GDM, los TG maternos durante el tercer trimestre de gestación parecen ser mejor predictores del peso de los niños al nacer que los niveles de glucosa y que el propio BMI (Kitajima *et al.* 2001; Knopp *et al.*, 1992; Schaefer-Graf *et al.* 2008). En nuestro caso, los niveles de TG en suero materno en el momento del reclutamiento se asociaron tanto con p-ERK como con p-Akt, sugiriendo pues que esta alteración lipídica está asociada al trastorno de la insulina materna pero también a nivel placentario. Además, los TG del cordón en los niños de nuestro estudio también se asociaron con los niveles de p-Akt placentario, lo cual indica que esta vía de señalización de la insulina juega un papel importante en el transporte de nutrientes al feto. De todos estos resultados podemos deducir que la activación de la ruta de la insulina placentaria está directamente implicada en el crecimiento fetal, más que los propios TG, o incluso que el BMI.

En el presente estudio, como hemos comentado, la mayoría de los transportadores lipídicos tendieron a aumentar en las mujeres diabéticas tratadas con insulina, y además, la ruta de la insulina estaba activada en estas mujeres, por lo que decidimos analizar si existía asociación alguna entre los mediadores moleculares de la ruta de la insulina y dichos transportadores lipídicos. Tanto los niveles de p-Akt como de p-ERK se asociaron con la lipasa endotelial EL y con las proteínas transportadoras de ácidos grasos FAT y A-FABP (Tabla 17), lo cual pone de manifiesto el posible papel que tiene la insulina al final del embarazo sobre la regulación de estos transportadores. Esto concuerda con algunos estudios *in vitro* que han demostrado que la insulina regula el transporte de ácidos grasos en placenta (Elchalal *et al.* 2005; Magnusson-Olsson *et al.* 2006).

Para confirmar la asociación entre los mediadores moleculares de la ruta de la insulina y los transportadores lipídicos, realizamos un estudio *in vitro* en el que incubamos una línea celular de placenta (BeWo) con inhibidores de la ruta de Akt (LY) y de ERK (PD) respectivamente, demostrando que el tratamiento de estas células con estos inhibidores reducía drásticamente los transportadores de ácidos grasos A-FABP, FATP-1 y la lipasa placentaria EL, sugiriendo pues que la insulina está involucrada directamente en la regulación de los transportadores placentarios de ácidos grasos. Sin embargo, el transportador MFSD2a no aumentó en las células tratadas con insulina, lo que indica que probablemente la regulación de este transportador no dependa de la insulina, sino que más bien está relacionado con la alteración de la estructura de la placenta que se observa en los sujetos con GDM. Esto concuerda con los niveles de dicho transportador en las gestantes diabéticas tratadas con insulina, que son iguales que los niveles en las gestantes tratadas con dieta, lo cual pone de manifiesto que en condiciones fisiológicas la insulina no regula este transportador. Sin embargo, los niveles de este transportador cayeron drásticamente en las células tratadas con inhibidores, tanto de la ruta PI3K como de la ruta MER-ERK. Puesto que tanto la ruta PI3K-Akt como la ruta de ERK controlan un gran número de procesos celulares, su inhibición podría mediar la caída de estos transportadores a través de la función de otras moléculas diferentes a la insulina, como podrían ser las citoquinas, que también actúan a través de estas rutas intracelulares. En cualquier caso, serían necesarios más

DISCUSIÓN

estudios, para averiguar qué moléculas están implicadas en la regulación de este transportador.

La línea celular BeWo es un modelo clásico para estudiar el metabolismo y función placentaria, tal y como ha sido demostrado en numerosos estudios de captación y transporte (Johnsen *et al.*, 2009; Tobin *et al.*, 2006; Tobin *et al.*, 2009). En nuestro caso demostramos además que la línea celular BeWo es un buen modelo para el estudio de los efectos de la insulina, ya que esta hormona fue capaz de activar su ruta de señalización mediante fosforilación de Akt, aunque lamentablemente no pudimos detectar la expresión de FAT ni LPL, lo cual hubiera sido muy interesante.

Los resultados del estudio *in vitro* concuerdan con los de Wo *et al.* que demostraron la regulación de FATP-1 por insulina via Akt en adipocitos y músculo esquelético (Wu *et al.* 2006). Chabowski *et al.* también sugirieron la translocación a la membrana plasmática de FAT, mediante la activación de Akt, en cardiomiocitos (Chabowski *et al.* 2004). Todos estos datos indican que el tratamiento con insulina en mujeres con GDM supera la resistencia a la insulina placentaria y activa Akt y, por consiguiente, A-FABP y FAT, contribuyendo así al incremento del transporte lipídico en la placenta, y por tanto a la adiposidad fetal presente en los hijos de estas mujeres. Además, estos datos concuerdan con un estudio *in vitro* realizado en trofoblastos humanos que demuestra que la insulina, junto con los ácidos grasos, aumenta la captación y acumulación de lípidos vía Akt en estas células, medido mediante la expresión de adipofilina, una proteína específica de las vacuolas lipídicas (Elchalal *et al.* 2005). En otro estudio *in vitro* en trofoblastos de mujeres sanas, la estimulación con insulina junto con los ácidos grasos aumentaba significativamente la expresión de A-FABP, sugiriendo una vez más el importante papel de la insulina en el tráfico de ácidos grasos (Scifres *et al.* 2011). La expresión de A-FABP también puede incrementarse en condiciones de hipoxia y/o mediante la vía de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) (Biron-Shental *et al.*, 2007).

En cuanto a la lipasa EL, existe controversia en la bibliografía en cuanto a su regulación: Radaelli *et al.* demostraron un aumento en la expresión de esta lipasa en mujeres con GDM tratadas con insulina (Radaelli *et al.* 2009), mientras que Gauster *et*

al. demostraron *in vitro* que no era la insulina, sino TNF α y leptina los encargados de su regulación en células endoteliales fetales (Gauster *et al.* 2011), sugiriendo que estas citoquinas juegan un papel fundamental la regulación del transporte lipídico en la placenta, como ya fue propuesto en otro estudio en el que se demostró que elevados niveles de leptina aumentaban la expresión de FAT (Mousiolis *et al.* 2012).

En nuestro estudio, sin embargo, no encontramos asociación entre el nivel de citoquinas en suero materno o fetal y los niveles de transportadores de ácidos grasos en la placenta. De hecho, no encontramos diferencias en la mayor parte de las citoquinas (a excepción de adiponectina) entre los tres grupos de estudio. Es posible que los efectos de las citoquinas sobre estos mediadores sea un efecto local debido a la posible inflamación de la placenta en la GDM.

En estudios *in vitro*, Lager *et al.* demostraron en trofoblastos primarios que IL-6 disminuía la expresión de LPL y FATP-4, mientras que no observaron ningún efecto con TNF α (Lager *et al.* 2011). Sin embargo, IL-6 estimulaba la captación de ácidos grasos en estas células. Magnusson *et al.* demostraron que además de la insulina, estradiol, cortisol e IGF-1 eran capaces de disminuir o activar LPL, en función de los periodos de incubación, lo que dificulta la traslación de los resultados de los estudios *in vitro* a los modelos *in vivo* (Magnusson-Olsson *et al.* 2006). Además, lógicamente, algunos estudios postulan que los propios lípidos pueden activar y regular su propio transporte a través de la placenta (Johnsen *et al.* 2009; Magnusson-Olsson *et al.* 2007). En tejidos periféricos también ha sido demostrado el papel regulador de las citoquinas sobre los transportadores de ácidos grasos como LPL (Mead *et al.* 2002). Además, en cultivos de trofoblastos, PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) y estados de hipoxia regulan la expresión de FATP-1, FATP-2 y FATP-4 (Mishima *et al.* 2011; Schaiff *et al.* 2005), y en casos de GDM y de obesidad se ha demostrado una disminución en la expresión de este factor de transcripción, lo que podría estar contribuyendo así a las alteraciones en el transporte lipídico que se producen en estas patologías (Holdsworth-Carson *et al.* 2010; Lappas 2014).

Todos estos datos nos llevan a la conclusión de que la insulina juega un papel importante en la regulación del transporte lipídico en placentas, pero que no actúa de

DISCUSIÓN

forma individual, sino que forma parte de un mecanismo mucho más complejo de regulación en el que participan también las citoquinas, los factores de crecimiento, el estrés oxidativo y la hipoxia, así como los propios ácidos grasos. En cualquier caso, lo que sí parece quedar claro es que el papel de la insulina en un ambiente de hiperlipemia como la GDM favorece el transporte alterado de lípidos hacia el feto

5.4 Transporte de glucosa en placenta

En la placenta humana el transporte de glucosa no depende de la insulina, a diferencia de los tejidos periféricos, ya que este transporte es vía GLUT-1, que es un transportador independiente de insulina. En el presente estudio no obtuvimos diferencias significativas en los niveles de este transportador entre los tres grupos de estudio.

Existe controversia en cuanto a los niveles de este transportador en casos de GDM: Algunos estudios postulan un aumento en la expresión de GLUT-1 en la membrana basal en mujeres embarazadas diabéticas en comparación con controles (Gaither *et al.* 1999; Jansson 2001), así como un aumento de GLUT-1 en placentas de mujeres no obesas con GDM tratadas con insulina (Colomiére *et al.*, 2009)

Por otro lado, algunos autores han descrito una disminución en el transporte de glucosa en placentas de mujeres con GDM (Challier *et al.* 1986; Osmond *et al.* 2000), además de una reducción de los niveles de GLUT-1 en trofoblastos humanos expuestos a condiciones de hiperglicemia (Hahn *et al.* 1998; Illsley *et al.* 1998) y de estrés oxidativo (Araujo *et al.* 2013b; Lappas *et al.* 2012) aunque en muchos casos esta situación se revertía cuando se eliminaba esta condición de exceso de glucosa, por lo que parece existir una cierta regulación *feed-back* para limitar la transferencia de glucosa al feto.

5.5 Transporte de aminoácidos en placenta

Los aminoácidos juegan un papel fundamental en la construcción de tejidos, y son además sustratos energéticos de los fetos (Jansson 2001), por lo que las concentraciones plasmáticas de aa son mucho mayores en la circulación fetal que en la circulación materna (Young y Prenton 1969), lo cual sugiere un transporte activo a través del sincitiotrofoblasto. En el presente estudio, los diferentes grupos de aa en el

suero materno se correlacionaron con los aminoácidos en suero de cordón (Tabla 21), lo cual demuestra este transporte materno-fetal activo. Curiosamente, la correlación más baja se dio en el grupo de los aminoácidos esenciales, lo cual demuestra que la placenta podría modular este transporte en casos de GDM, afectando por tanto al crecimiento fetal.

En el suero materno, desde hace muchos años se ha plasmado la idea de que la hiperaminoacidemia es una característica de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad (Felig *et al.* 1969). Numerosos estudios proponen un aumento en los niveles de aminoácidos ramificados, neutros y aromáticos en suero de sujetos obesos con resistencia a la insulina, estando además estos niveles asociados con el índice de resistencia a la insulina (HOMA) (McCormack *et al.* 2013; Newgard *et al.* 2009). En casos de mujeres con GDM hay pocos resultados disponibles, pero se han observado también niveles altos de lisina, tirosina (aromático) y valina (ramificados) en suero materno, estando estos niveles relacionados con la resistencia y secreción de insulina (Park *et al.* 2015). En este estudio no se diferenció a las mujeres en función del tratamiento, por lo que no sabemos si la dieta, o la insulina, o ambas podrían contribuir a estos niveles. No obstante, en otro estudio se describieron niveles altos de aa aromáticos en mujeres con GDM tratadas con dieta (Pappa *et al.* 2007).

Sorprendentemente, en nuestro estudio, los niveles de aminoácidos en suero materno tendieron a disminuir en las mujeres con GDM. De hecho, algunos ramificados como isoleucina y leucina, y fenilalanina (aromático) lo hicieron de forma significativa. Algunos aa de nuestro estudio se asociaron inversamente con los niveles de insulina y glucosa materna en el momento del parto (Tabla 18), lo cual explicaría los niveles más bajos de aa encontrados en el suero materno.

La GDM y la obesidad se suelen asociar con la activación del transporte de aa, pudiendo ser esta activación uno de los responsables del sobrecrecimiento fetal. De hecho, ha sido ampliamente documentado en la bibliografía que una activación en el transporte de aa en la placenta puede contribuir al acelerado crecimiento fetal característico de los embarazos complicados con diabetes (Jansson *et al.* 2012; Jansson *et al.* 2002). Además, estos estudios sugieren que el incremento en el transporte

DISCUSIÓN

transplacentario de aa se debe a la activación de la vía de mTOR, que puede ser activada en placenta por aminoácidos, glucosa, y por otros factores de crecimiento tales como insulina (Roos *et al.* 2009b). Además, en placentas humanas se ha demostrado que insulina e IGF1 (cuyos niveles están aumentados en casos de GDM), activan la actividad de los transportadores de aa sistema A y sistema L vía mTORC1, lo que es crítico para el transporte de aa al feto (Karl *et al.*, 1992; Roos *et al.* 2007).

El descenso de aa en suero materno también se observó en la placenta, y los niveles de aa en este órgano se asociaron inversamente con los niveles de ERK fosforilado. Este hecho pone de manifiesto la regulación cruzada existente entre las ruta de ERK y de mTOR, como fue propuesto por el grupo de Jeremia Winter *et al.*, que demostraron que p-ERK activaba mTOR mediante la fosforilación directa de mTORC1 (Winter *et al.* 2010). Así pues, la estimulación de ERK por insulina en la placenta favorecería la síntesis proteica y el descenso de aminoácidos en este órgano, promoviendo el mayor tamaño placentario y/o la transferencia de estos aminoácidos al feto. De hecho, algunos aminoácidos de la circulación materna se correlacionaron inversamente con el grosor placentario, sugiriendo la síntesis proteica en este órgano en casos de GDM, tal y como fue propuesto por el grupo de Perez *et al.* que sugieron que la leptina, mediante la activación de mTOR, activa la síntesis proteica en placentas de mujeres con GDM, en comparación con las controles (Perez-Perez *et al.* 2013).

Los niveles de aa en el recién nacido a penas se modificaron (Tabla 14), lo que podría deberse al mayor crecimiento fetal que ocurre en la GDM propuesto en los estudios anteriores. Además, los aminoácidos en el feto estimulan la producción de insulina (Milner *et al.*, 1972) contribuyendo también de esta forma sobrecrecimiento fetal en casos de GDM. De hecho, en nuestro estudio encontramos una asociación positiva entre los aminoácidos totales y la insulina del cordón, corroborando el papel insulinogénico de los aminoácidos.

Para controlar la GDM es necesario lograr un buen control glucémico, para evitar en la medida de lo posible efectos adversos, tanto en las madres como en los niños. En la siguiente figura mostramos a modo de resumen los posibles mecanismos implicados en la alteración de la transferencia de nutrientes al feto en casos de GDM, y

que contribuyen, por tanto, a la programación fetal de la obesidad en la descendencia. (Figura 54). En el reclutamiento puede observarse un ambiente uterino de hiperlipidemia e hiperinsulinemia característico de GDM y obesidad, que se traduce en una alteración de la estructura placentaria con una activación de las principales rutas de la insulina en la placenta. Esto tiene como consecuencia la activación del transporte placentario de lípidos hacia el feto, aumentando por tanto la adiposidad fetal y disminuyendo los niveles de TG en sangre de cordón. Además, la activación de las vías de la insulina en placenta disminuye los niveles de aa placentarios, probablemente debido a la síntesis de proteínas en este órgano, lo cual explicaría el aumento del peso de la placenta en casos de GDM y de obesidad. Por tanto, y para cerrar el círculo, la resistencia a la insulina en etapas tempranas del embarazo alteran la estructura placentaria mediante las vías de señalización de la insulina, teniendo como consecuencia final el aumento de adiposidad en los recién nacidos, contribuyendo a la programación fetal de la obesidad.



Figura 54. Mecanismo mediante el cual GDM y obesidad alteran el transporte de nutrientes al feto, promoviendo la adiposidad fetal en los recién nacidos y por tanto la programación fetal de la obesidad.

DISCUSIÓN

Por otro lado, en el presente estudio hemos demostrado que los bajos niveles de DHA en niños de madres con GDM podrían ser debidos a la disminución en la expresión de MFSD2A, un transportador que realizaría un transporte selectivo de DHA y otros LC-PUFAs hacia el feto. Dada la importancia que estos ácidos tienen para el correcto neurodesarrollo de los fetos, sería de gran interés estudiar la regulación de este transportador de forma pormenorizada, para poder diseñar fármacos específicos que favorezcan su expresión. En este contexto perdería importancia la suplementación con LC-PUFAs durante el embarazo, ya que estos no podrían atravesar la placenta y conseguir el adecuado desarrollo de los fetos, como ha sido sugerido recientemente en un estudio de suplementación con LC-PUFAs en embarazadas con GDM.

CONSIDERACIÓN GENERAL

Numerosos estudios han mostrado presencia de macrosomía y niños grandes para su edad gestacional (LGA) en embarazos con glucemias bien controladas, lo cual indica que otros factores, además de la glucosa, están contribuyendo al transporte alterado de nutrientes. En el presente estudio hemos demostrado que el tratamiento con insulina al final del embarazo podría activar el transporte de nutrientes hacia el feto, promoviendo la adiposidad fetal, contribuyendo así a la programación fetal de la obesidad de estos niños. Sin embargo, un tratamiento temprano con insulina o con dieta quizá podría reducir esta activación del transporte lipídico y disminuir los riesgos, ya que al controlar las glucemias en etapas tempranas, el feto estaría expuesto menor tiempo a un ambiente de hiperglicemia y de hiperlipidemia. En la actualidad se está tendiendo hacia un diagnóstico y tratamiento temprano de la GDM, ya que se ha demostrado que mejoran los resultados obstétricos y disminuyen macrosomía y adiposidad fetal. Nuestros resultados bioquímicos apoyan este tipo de intervención temprana para reducir una programación adversa de la obesidad y neurodesarrollo en estos niños.

VI. CONCLUSIONES

1. Las mujeres con diabetes mellitus gestacional, a pesar de tener un control glucémico entre los valores de referencia, conseguido mediante el tratamiento con dieta o con insulina, presentaron mayores niveles de glucosa y de insulina en suero que las mujeres sanas. Tanto los niveles de insulina como de glucosa en el reclutamiento se correlacionaron con el peso de la placenta y con la circunferencia abdominal fetal (z-CA), lo cual demuestra su importante papel en el desarrollo fetoplacentario en etapas tempranas del embarazo.
2. Las concentraciones de TG y AG maternos fueron significativamente mayores en las diabéticas, especialmente en las tratadas con insulina. Sin embargo, en sangre fetal estas concentraciones aparecen disminuidas, lo que podría apoyar un transporte alterado de lípidos a través de la placenta y/o mayor adiposidad fetal y z-CA en los recién nacidos.
3. En embarazadas con GDM tratadas con dieta se observa cierta resistencia a la insulina en la placenta, mientras que con el tratamiento con insulina exógena se recupera la capacidad de respuesta a la insulina en este órgano, observándose una activación en las rutas de ERK y Akt en las placentas de estas mujeres, lo cual afecta a la estructura placentaria.
4. La GDM promueve un aumento en la expresión de los transportadores generales de lípidos FAT, A-FABP y FATP-1 en la placenta mediante la activación de las rutas de Akt y ERK, tal y como ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto favorecería que la insulina promoviera un mayor transporte de grasa al feto.
5. En esta tesis, se demuestra por primera vez el papel de la proteína transportadora MFSD2A en el transporte selectivo de DHA en la placenta, así como el importante papel de los lisofosfolípidos para el transporte de esta molécula. El transporte selectivo de DHA a través de la placenta se encuentra disminuido en mujeres con GDM, debido a un descenso en la expresión de los transportadores MFSD2A y FATP-4, lo que podría afectar al neurodesarrollo de los niños.

CONCLUSIONES

6. Se observa un descenso de los niveles de aminoácidos tanto en suero materno como en placentas de mujeres con GDM. La activación de la ruta de ERK en la placenta favorece la síntesis proteica y el descenso de aminoácidos en este órgano, promoviendo el mayor tamaño placentario para regular la transferencia de los mismos al feto.
7. El peso pregestacional y la GDM de las mujeres influye en los niveles de glucosa y de insulina maternos, en la respuesta a insulina de la placenta así como en la mayor circunferencia abdominal fetal (CA), promoviendo los efectos adversos de la diabetes en la descendencia.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abouzeid M, Versace VL, Janus ED, Davey MA, Philpot B, Oats J & Dunbar JA 2015 Socio-Cultural Disparities in Gdm Burden Differ by Maternal Age at First Delivery. *PLoS One* **10** e0117085.

ADA 1987 Position Statement on Gestational Diabetes Mellitus. Formulated by the American Diabetes Association, Inc. *Am J Obstet Gynecol* **156** 488-489.

ADA 2014 Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **37 Suppl 1** S81-90.

Alonso A, Del Rey CG, Navarro A, Tolivia J & Gonzalez CG 2006 Effects of Gestational Diabetes Mellitus on Proteins Implicated in Insulin Signaling in Human Placenta. *Gynecol Endocrinol* **22** 526-535.

Aman J, Hansson U, Ostlund I, Wall K & Persson B 2011 Increased Fat Mass and Cardiac Septal Hypertrophy in Newborn Infants of Mothers with Well-Controlled Diabetes During Pregnancy. *Neonatology* **100** 147-154.

Araujo JR, Correia-Branco A, Ramalho C, Goncalves P, Pinho MJ, Keating E & Martel F 2013a L-Methionine Placental Uptake: Characterization and Modulation in Gestational Diabetes Mellitus. *Reprod Sci* **20** 1492-1507.

Araujo JR, Keating E & Martel F 2015 Impact of Gestational Diabetes Mellitus in the Maternal-to-Fetal Transport of Nutrients. *Curr Diab Rep* **15** 569.

Araujo JR, Pereira AC, Correia-Branco A, Keating E & Martel F 2013b Oxidative Stress Induced by Tert-Butylhydroperoxide Interferes with the Placental Transport of Glucose: In Vitro Studies with Bewo Cells. *Eur J Pharmacol*.

Ategbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, et al. 2006 Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* **91** 4137-4143.

Avagliano L, Garo C & Marconi AM 2012 Placental Amino Acids Transport in Intrauterine Growth Restriction. *J Pregnancy* **2012** 972562.

Barber MN, Risis S, Yang C, Meikle PJ, Staples M, Febbraio MA & Bruce CR 2012 Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes. *PLoS One* **7** e41456.

Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL & Friedman JE 2011 Chronically Increased S6k1 Is Associated with Impaired Irs1 Signaling in Skeletal Muscle of Gdm Women with Impaired Glucose Tolerance Postpartum. *J Clin Endocrinol Metab* **96** 1431-1441.

BIBLIOGRAFÍA

Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM & Friedman JE 2007 Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes. *Diabetes Care* **30 Suppl 2** S112-119.

Barnes RA, Edghill N, Mackenzie J, Holters G, Ross GP, Jalaludin BB & Flack JR 2013 Predictors of Large and Small for Gestational Age Birthweight in Offspring of Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabet Med* **30** 1040-1046.

Bartha JL, Comino-Delgado R, Martinez-Del-Fresno P, Fernandez-Barrios M, Bethencourt I & Moreno-Corral L 2000 Insulin-Sensitivity Index and Carbohydrate and Lipid Metabolism in Gestational Diabetes. *J Reprod Med* **45** 185-189.

Baumann MU, Schneider H, Malek A, Palta V, Surbek DV, Sager R, Zamudio S & Illsley NP 2014 Regulation of Human Trophoblast Glut1 Glucose Transporter by Insulin-Like Growth Factor I (Igf-I). *PLoS One* **9** e106037.

Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD & Williams D 2009 Type 2 Diabetes Mellitus after Gestational Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet* **373** 1773-1779.

Berger JH, Charron MJ & Silver DL 2012 Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein 2a (Mfsd2a) Has Roles in Body Growth, Motor Function, and Lipid Metabolism. *PLoS One* **7** e50629.

Bildirici I, Roh CR, Schaiff WT, Lewkowski BM, Nelson DM & Sadovsky Y 2003 The Lipid Droplet-Associated Protein Adipophilin Is Expressed in Human Trophoblasts and Is Regulated by Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-Gamma/Retinoid X Receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 6056-6062.

Biron-Shental T, Schaiff WT, Ratajczak CK, Bildirici I, Nelson DM & Sadovsky Y 2007 Hypoxia Regulates the Expression of Fatty Acid-Binding Proteins in Primary Term Human Trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* **197** 516 e511-516.

Black MH, Sacks DA, Xiang AH & Lawrence JM 2013 The Relative Contribution of Prepregnancy Overweight and Obesity, Gestational Weight Gain, and Iadpsg-Defined Gestational Diabetes Mellitus to Fetal Overgrowth. *Diabetes Care* **36** 56-62.

Blank A, Grave GD & Metzger BE 1995 Effects of Gestational Diabetes on Perinatal Morbidity Reassessed. Report of the International Workshop on Adverse Perinatal Outcomes of Gestational Diabetes Mellitus, December 3-4, 1992. *Diabetes Care* **18** 127-129.

Bowers K, Laughon SK, Kiely M, Brite J, Chen Z & Zhang C 2013 Gestational Diabetes, Pre-Pregnancy Obesity and Pregnancy Weight Gain in Relation to Excess Fetal Growth: Variations by Race/Ethnicity. *Diabetologia* **56** 1263-1271.

Bradford MM 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72** 248-254.

Briana DD, Baka S, Boutsikou M, Liosi S, Vraila VM, Gourgiotis D, Hassiakos D & Malamitsi-Puchner A 2010 Soluble Fas Antigen and Soluble Fas Ligand in Intrauterine Growth Restriction. *Neonatology* **97** 31-35.

Briana DD & Malamitsi-Puchner A 2009 Reviews: Adipocytokines in Normal and Complicated Pregnancies. *Reprod Sci* **16** 921-937.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A & Richelsen B 2003 Regulation of Adiponectin by Adipose Tissue-Derived Cytokines: In Vivo and in Vitro Investigations in Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285** E527-533.

Buckberry S, Bianco-Miotto T, Bent SJ, Dekker GA & Roberts CT 2014 Integrative Transcriptome Meta-Analysis Reveals Widespread Sex-Biased Gene Expression at the Human Fetal-Maternal Interface. *Mol Hum Reprod* **20** 810-819.

Buckley BS, Harreiter J, Damm P, Corcoy R, Chico A, Simmons D, Vellinga A & Dunne F 2012 Gestational Diabetes Mellitus in Europe: Prevalence, Current Screening Practice and Barriers to Screening. A Review. *Diabet Med* **29** 844-854.

Buchanan TA & Xiang AH 2005 Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Invest* **115** 485-491.

Cani PD 2009 Gut Microbiota and Pregnancy, a Matter of Inner Life. *Br J Nutr* **101** 1579-1580.

Carpenter MW 2007 Gestational Diabetes, Pregnancy Hypertension, and Late Vascular Disease. *Diabetes Care* **30 Suppl 2** S246-250.

Carpenter MW & Coustan DR 1982 Criteria for Screening Tests for Gestational Diabetes. *Am J Obstet Gynecol* **144** 768-773.

Catalano PM, Drago NM & Amini SB 1995 Maternal Carbohydrate Metabolism and Its Relationship to Fetal Growth and Body Composition. *Am J Obstet Gynecol* **172** 1464-1470.

Catalano PM & Ehrenberg HM 2006 The Short- and Long-Term Implications of Maternal Obesity on the Mother and Her Offspring. *BJOG* **113** 1126-1133.

Catalano PM, McIntyre HD, Cruickshank JK, McCance DR, Dyer AR, Metzger BE, Lowe LP, Trimble ER, Coustan DR, Hadden DR, et al. 2012 The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Study: Associations of Gdm and Obesity with Pregnancy Outcomes. *Diabetes Care* **35** 780-786.

BIBLIOGRAFÍA

Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L & Friedman JE 2002 Downregulated Irs-1 and Ppargamma in Obese Women with Gestational Diabetes: Relationship to Ffa During Pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282** E522-533.

Catalano PM, Thomas A, Huston-Presley L & Amini SB 2003 Increased Fetal Adiposity: A Very Sensitive Marker of Abnormal in Utero Development. *Am J Obstet Gynecol* **189** 1698-1704.

Catalano PM, Thomas AJ, Huston LP & Fung CM 1998 Effect of Maternal Metabolism on Fetal Growth and Body Composition. *Diabetes Care* **21 Suppl 2** B85-90.

Cetin I, de Santis MS, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzoni S, Spada E, Milani S & Pardi G 2005 Maternal and Fetal Amino Acid Concentrations in Normal Pregnancies and in Pregnancies with Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **192** 610-617.

Cleal JK, Glazier JD, Ntani G, Crozier SR, Day PE, Harvey NC, Robinson SM, Cooper C, Godfrey KM, Hanson MA, et al. 2011 Facilitated Transporters Mediate Net Efflux of Amino Acids to the Fetus across the Basal Membrane of the Placental Syncytiotrophoblast. *J Physiol* **589** 987-997.

Cleal JK & Lewis RM 2008 The Mechanisms and Regulation of Placental Amino Acid Transport to the Human Foetus. *J Neuroendocrinol* **20** 419-426.

Colomiere M, Permezel M & Lappas M 2010 Diabetes and Obesity During Pregnancy Alter Insulin Signalling and Glucose Transporter Expression in Maternal Skeletal Muscle and Subcutaneous Adipose Tissue. *J Mol Endocrinol* **44** 213-223.

Colomiere M, Permezel M, Riley C, Desoye G & Lappas M 2009 Defective Insulin Signaling in Placenta from Pregnancies Complicated by Gestational Diabetes Mellitus. *Eur J Endocrinol* **160** 567-578.

Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, Cetin I, Cortelazzi R, Beck-Peccoz P & Spada A 2007 Maternal and Foetal Resistin and Adiponectin Concentrations in Normal and Complicated Pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66** 447-453.

Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS & Robinson JS 2005 Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus on Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* **352** 2477-2486.

Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Kaszas E, Palik E & Winkler G 2004 Plasma Adiponectin and Pregnancy-Induced Insulin Resistance. *Diabetes Care* **27** 274-275.

Cullinan J, Gillespie P, Owens L, Avalos G & Dunne FP 2012 Is There a Socioeconomic Gradient in the Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus? *Ir Med J* **105** 21-23.

Cunningham P & McDermott L 2009 Long Chain Pufa Transport in Human Term Placenta. *J Nutr* **139** 636-639.

Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ & Bonen A 2004 Insulin Stimulates Fatty Acid Transport by Regulating Expression of Fat/Cd36 but Not Fabppm. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287** E781-789.

Challier JC, Hauguel S & Desmaizieres V 1986 Effect of Insulin on Glucose Uptake and Metabolism in the Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **62** 803-807.

Chan TF, Yuan SS, Chen HS, Guu CF, Wu LC, Yeh YT, Chung YF, Jong SB & Su JH 2004 Correlations between Umbilical and Maternal Serum Adiponectin Levels and Neonatal Birthweights. *Acta Obstet Gynecol Scand* **83** 165-169.

Chasan-Taber L, Schmidt MD, Pekow P, Sternfeld B, Manson JE, Solomon CG, Braun B & Markenson G 2008 Physical Activity and Gestational Diabetes Mellitus among Hispanic Women. *J Womens Health (Larchmt)* **17** 999-1008.

Cheung NW & Byth K 2003 Population Health Significance of Gestational Diabetes. *Diabetes Care* **26** 2005-2009.

Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quertermous T & Cooper AD 2002 Endothelial Lipase: A New Lipase on the Block. *J Lipid Res* **43** 1763-1769.

Desoye G, Hartmann M, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, Kohnen G & Kaufmann P 1994 Insulin Receptors in Syncytiotrophoblast and Fetal Endothelium of Human Placenta. Immunohistochemical Evidence for Developmental Changes in Distribution Pattern. *Histochemistry* **101** 277-285.

Desoye G, Hartmann M, Jones CJ, Wolf HJ, Kohnen G, Kosanke G & Kaufmann P 1997 Location of Insulin Receptors in the Placenta and Its Progenitor Tissues. *Microsc Res Tech* **38** 63-75.

Desoye G & Hauguel-de Mouzon S 2007 The Human Placenta in Gestational Diabetes Mellitus. The Insulin and Cytokine Network. *Diabetes Care* **30 Suppl 2** S120-126.

Desoye G, Hofmann HH & Weiss PA 1992 Insulin Binding to Trophoblast Plasma Membranes and Placental Glycogen Content in Well-Controlled Gestational Diabetic Women Treated with Diet or Insulin, in Well-Controlled Overt Diabetic Patients and in Healthy Control Subjects. *Diabetologia* **35** 45-55.

Desoye G, Korgun ET, Ghaffari-Tabrizi N & Hahn T 2002 Is Fetal Macrosomia in Adequately Controlled Diabetic Women the Result of a Placental Defect?--a Hypothesis. *J Matern Fetal Neonatal Med* **11** 258-261.

Diez JJ & Iglesias P 2003 The Role of the Novel Adipocyte-Derived Hormone Adiponectin in Human Disease. *Eur J Endocrinol* **148** 293-300.

BIBLIOGRAFÍA

Dionne G, Boivin M, Seguin JR, Perusse D & Tremblay RE 2008 Gestational Diabetes Hinders Language Development in Offspring. *Pediatrics* **122** e1073-1079.

Dube E, Ethier-Chiasson M & Lafond J 2013 Modulation of Cholesterol Transport by Insulin-Treated Gestational Diabetes Mellitus in Human Full-Term Placenta. *Biol Reprod* **88** 16.

Dube E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, Forest JC, Giguere Y, Masse A & Lafond J 2012 Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. *Biol Reprod* **87** 14, 11-11.

Duran A, Saenz S, Torrejon MJ, Bordiu E, Del Valle L, Galindo M, Perez N, Herraiz MA, Izquierdo N, Rubio MA, et al. 2014 Introduction of Iadpsg Criteria for the Screening and Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus Results in Improved Pregnancy Outcomes at a Lower Cost in a Large Cohort of Pregnant Women: The St. Carlos Gestational Diabetes Study. *Diabetes Care* **37** 2442-2450.

Elchalal U, Schaiff WT, Smith SD, Rimón E, Bildirici I, Nelson DM & Sadovsky Y 2005 Insulin and Fatty Acids Regulate the Expression of the Fat Droplet-Associated Protein Adipophilin in Primary Human Trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* **193** 1716-1723.

Endo S, Maeda K, Suto M, Kaji T, Morine M, Kinoshita T, Yasui T & Irahara M 2006 Differences in Insulin Sensitivity in Pregnant Women with Overweight and Gestational Diabetes Mellitus. *Gynecol Endocrinol* **22** 343-349.

Ericsson A, Hamark B, Jansson N, Johansson BR, Powell TL & Jansson T 2005 Hormonal Regulation of Glucose and System a Amino Acid Transport in First Trimester Placental Villous Fragments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288** R656-662.

Esnault C, Priet S, Ribet D, Vernochet C, Bruls T, Lavielle C, Weissenbach J & Heidmann T 2008 A Placenta-Specific Receptor for the Fusogenic, Endogenous Retrovirus-Derived, Human Syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** 17532-17537.

Feig DS, Zinman B, Wang X & Hux JE 2008 Risk of Development of Diabetes Mellitus after Diagnosis of Gestational Diabetes. *CMAJ* **179** 229-234.

Felig P, Marliss E & Cahill GF, Jr. 1969 Plasma Amino Acid Levels and Insulin Secretion in Obesity. *N Engl J Med* **281** 811-816.

Ferrara A, Weiss NS, Hedderson MM, Quesenberry CP, Jr., Selby JV, Ergas IJ, Peng T, Escobar GJ, Pettitt DJ & Sacks DA 2007 Pregnancy Plasma Glucose Levels Exceeding the American Diabetes Association Thresholds, but Below the National Diabetes Data Group Thresholds for Gestational Diabetes Mellitus, Are Related to the Risk of Neonatal Macrosomia, Hypoglycaemia and Hyperbilirubinaemia. *Diabetologia* **50** 298-306.

Festa A, Shnawa N, Krugluger W, Hopmeier P, Schernthaner G & Haffner SM 1999 Relative Hypoleptinaemia in Women with Mild Gestational Diabetes Mellitus. *Diabet Med* **16** 656-662.

Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH 1957 A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem* **226** 497-509.

Fowden AL, Ward JW, Wooding FP, Forhead AJ & Constanica M 2006 Programming Placental Nutrient Transport Capacity. *J Physiol* **572** 5-15.

Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T & Catalano P 1999 Impaired Glucose Transport and Insulin Receptor Tyrosine Phosphorylation in Skeletal Muscle from Obese Women with Gestational Diabetes. *Diabetes* **48** 1807-1814.

Friis CM, Qvigstad E, Paasche Roland MC, Godang K, Voldner N, Bollerslev J & Henriksen T 2013 Newborn Body Fat: Associations with Maternal Metabolic State and Placental Size. *PLoS One* **8** e57467.

Gaither K, Quraishi AN & Illsley NP 1999 Diabetes Alters the Expression and Activity of the Human Placental Glut1 Glucose Transporter. *J Clin Endocrinol Metab* **84** 695-701.

Gao L, Lv C, Xu C, Li Y, Cui X, Gu H & Ni X 2012 Differential Regulation of Glucose Transporters Mediated by Crh Receptor Type 1 and Type 2 in Human Placental Trophoblasts. *Endocrinology* **153** 1464-1471.

Gauster M, Desoye G, Totsch M & Hiden U 2012 The Placenta and Gestational Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rep* **12** 16-23.

Gauster M, Hiden U, van Poppel M, Frank S, Wadsack C, Hauguel-de Mouzon S & Desoye G 2011 Dysregulation of Placental Endothelial Lipase in Obese Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* **60** 2457-2464.

Gauster M, Rechberger G, Sovic A, Horl G, Steyrer E, Sattler W & Frank S 2005 Endothelial Lipase Releases Saturated and Unsaturated Fatty Acids of High Density Lipoprotein Phosphatidylcholine. *J Lipid Res* **46** 1517-1525.

Gharibeh MY, Al Tawallbeh GM, Abboud MM, Radaideh A, Alhader AA & Khabour OF 2010 Correlation of Plasma Resistin with Obesity and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Metab* **36** 443-449.

Gil-Sanchez A, Koletzko B & Larque E 2012 Current Understanding of Placental Fatty Acid Transport. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **15** 265-272.

Girz BA, Divon MY & Merkatz IR 1992 Sudden Fetal Death in Women with Well-Controlled, Intensively Monitored Gestational Diabetes. *J Perinatol* **12** 229-233.

BIBLIOGRAFÍA

Gordon Y, Patterson TM & Parker CR, Jr. 2009 Relation of Glucose Control in Diabetic Pregnancy to Fetal Cholesterol Homeostasis. *J Matern Fetal Neonatal Med* **22** 8-12.

Grunberger G 1991 Interplay between Insulin Signalling and Protein Kinase C. *Cell Signal* **3** 171-177.

Grunfeld C & Feingold KR 1991 Tumor Necrosis Factor, Cytokines, and the Hyperlipidemia of Infection. *Trends Endocrinol Metab* **2** 213-219.

Guariguata L, Linnenkamp U, Beagley J, Whiting DR & Cho NH 2014 Global Estimates of the Prevalence of Hyperglycaemia in Pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract* **103** 176-185.

Guerre-Millo M 2004 Adipose Tissue and Adipokines: For Better or Worse. *Diabetes Metab* **30** 13-19.

Guerrero-Romero F, Aradillas-Garcia C, Simental-Mendia LE, Monreal-Escalante E, de la Cruz Mendoza E & Rodriguez-Moran M 2010 Birth Weight, Family History of Diabetes, and Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *J Pediatr* **156** 719-723, 723 e711.

Guvener M, Ucar HI, Oc M & Pinar A 2012 Plasma Leptin Levels Increase to a Greater Extent Following on-Pump Coronary Artery Surgery in Type 2 Diabetic Patients Than in Nondiabetic Patients. *Diabetes Res Clin Pract* **96** 371-378.

Hahn D, Blaschitz A, Korgun ET, Lang I, Desoye G, Skofitsch G & Dohr G 2001 From Maternal Glucose to Fetal Glycogen: Expression of Key Regulators in the Human Placenta. *Mol Hum Reprod* **7** 1173-1178.

Hahn T, Barth S, Weiss U, Mosgoeller W & Desoye G 1998 Sustained Hyperglycemia in Vitro Down-Regulates the Glut1 Glucose Transport System of Cultured Human Term Placental Trophoblast: A Mechanism to Protect Fetal Development? *FASEB J* **12** 1221-1231.

Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larque E & Koletzko B 2008 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid (Lc-Pufa) Transfer across the Placenta. *Clin Nutr* **27** 685-693.

HAPO 2009 Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (Hapo) Study: Associations with Neonatal Anthropometrics. *Diabetes* **58** 453-459.

HAPO 2010 Hyperglycaemia and Adverse Pregnancy Outcome (Hapo) Study: Associations with Maternal Body Mass Index. *BJOG* **117** 575-584.

Harder T, Roepke K, Diller N, Stechling Y, Dudenhausen JW & Plagemann A 2009 Birth Weight, Early Weight Gain, and Subsequent Risk of Type 1 Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* **169** 1428-1436.

Hauguel-de Mouzon S & Guerre-Millo M 2006 The Placenta Cytokine Network and Inflammatory Signals. *Placenta* **27** 794-798.

Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J & Catalano P 2006 The Known and Unknown of Leptin in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **194** 1537-1545.

Hauguel S, Desmaizieres V & Challier JC 1986 Glucose Uptake, Utilization, and Transfer by the Human Placenta as Functions of Maternal Glucose Concentration. *Pediatr Res* **20** 269-273.

Hedderson MM, Gunderson EP & Ferrara A 2010 Gestational Weight Gain and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol* **115** 597-604.

Heitritter SM, Solomon CG, Mitchell GF, Skali-Ounis N & Seely EW 2005 Subclinical Inflammation and Vascular Dysfunction in Women with Previous Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 3983-3988.

Herrera E 2002 Lipid Metabolism in Pregnancy and Its Consequences in the Fetus and Newborn. *Endocrine* **19** 43-55.

Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, Zorzano A & Bonet B 1991 Intermediary Metabolism in Pregnancy. First Theme of the Freinkel Era. *Diabetes* **40 Suppl 2** 83-88.

Hidden U, Lang U & Desoye G 2009 [Fetoplacental Disturbances in Gestational Diabetes Mellitus]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* **49** 224-229.

Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M & Lappas M 2010 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Are Altered in Pathologies of the Human Placenta: Gestational Diabetes Mellitus, Intrauterine Growth Restriction and Preeclampsia. *Placenta* **31** 222-229.

Hollingsworth DR & Grundy SM 1982 Pregnancy-Associated Hypertriglyceridemia in Normal and Diabetic Women. Differences in Insulin-Dependent, Non-Insulin-Dependent, and Gestational Diabetes. *Diabetes* **31** 1092-1097.

Homko C, Sivan E, Chen X, Reece EA & Boden G 2001 Insulin Secretion During and after Pregnancy in Patients with Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **86** 568-573.

Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, Tanner CJ, Kuchibhatla M, Houmard JA, Newgard CB, et al. 2009 Relationships between Circulating Metabolic Intermediates and Insulin Action in Overweight to Obese, Inactive Men and Women. *Diabetes Care* **32** 1678-1683.

Illsley NP 2000 Placental Glucose Transport in Diabetic Pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* **43** 116-126.

Illsley NP, Sellers MC & Wright RL 1998 Glycaemic Regulation of Glucose Transporter Expression and Activity in the Human Placenta. *Placenta* **19** 517-524.

BIBLIOGRAFÍA

Jansson N, Greenwood SL, Johansson BR, Powell TL & Jansson T 2003 Leptin Stimulates the Activity of the System a Amino Acid Transporter in Human Placental Villous Fragments. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 1205-1211.

Jansson N, Rosario FJ, Gaccioli F, Lager S, Jones HN, Roos S, Jansson T & Powell TL 2013 Activation of Placental Mtor Signaling and Amino Acid Transporters in Obese Women Giving Birth to Large Babies. *J Clin Endocrinol Metab* **98** 105-113.

Jansson T 2001 Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatr Res* **49** 141-147.

Jansson T, Aye IL & Goberdhan DC 2012 The Emerging Role of Mtorc1 Signaling in Placental Nutrient-Sensing. *Placenta* **33 Suppl 2** e23-29.

Jansson T, Cetin I, Powell TL, Desoye G, Radaelli T, Ericsson A & Sibley CP 2006 Placental Transport and Metabolism in Fetal Overgrowth -- a Workshop Report. *Placenta* **27 Suppl A** S109-113.

Jansson T, Ekstrand Y, Bjorn C, Wennergren M & Powell TL 2002 Alterations in the Activity of Placental Amino Acid Transporters in Pregnancies Complicated by Diabetes. *Diabetes* **51** 2214-2219.

Jansson T & Powell TL 2007 Role of the Placenta in Fetal Programming: Underlying Mechanisms and Potential Interventional Approaches. *Clin Sci (Lond)* **113** 1-13.

Jastrow N, Roberge S, Gauthier RJ, Laroche L, Duperron L, Brassard N & Bujold E 2010 Effect of Birth Weight on Adverse Obstetric Outcomes in Vaginal Birth after Cesarean Delivery. *Obstet Gynecol* **115** 338-343.

Jensen DM, Damm P, Sorensen B, Molsted-Pedersen L, Westergaard JG, Klebe J & Beck-Nielsen H 2001 Clinical Impact of Mild Carbohydrate Intolerance in Pregnancy: A Study of 2904 Nondiabetic Danish Women with Risk Factors for Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **185** 413-419.

Johnsen GM, Weedon-Fekjaer MS, Tobin KA, Staff AC & Duttaroy AK 2009 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Stimulate Cellular Fatty Acid Uptake in Human Placental Choriocarcinoma (Bewo) Cells. *Placenta* **30** 1037-1044.

Jones HN, Jansson T & Powell TL 2009 Il-6 Stimulates System a Amino Acid Transporter Activity in Trophoblast Cells through Stat3 and Increased Expression of Snat2. *Am J Physiol Cell Physiol* **297** C1228-1235.

Jones HN, Jansson T & Powell TL 2010 Full-Length Adiponectin Attenuates Insulin Signaling and Inhibits Insulin-Stimulated Amino Acid Transport in Human Primary Trophoblast Cells. *Diabetes* **59** 1161-1170.

Kalhan S & Parimi P 2000 Gluconeogenesis in the Fetus and Neonate. *Semin Perinatol* **24** 94-106.

Kalkhoff RK, Kandaraki E, Morrow PG, Mitchell TH, Kelber S & Borkowf HI 1988 Relationship between Neonatal Birth Weight and Maternal Plasma Amino Acid Profiles in Lean and Obese Nondiabetic Women and in Type I Diabetic Pregnant Women. *Metabolism* **37** 234-239.

Karl PI, Alpy KL & Fisher SE 1992 Amino Acid Transport by the Cultured Human Placental Trophoblast: Effect of Insulin on Aib Transport. *Am J Physiol* **262** C834-839.

Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Biegelmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R & Waldhausl W 2001 Increased Plasma Leptin in Gestational Diabetes. *Diabetologia* **44** 164-172.

Kazantzis M & Stahl A 2012 Fatty Acid Transport Proteins, Implications in Physiology and Disease. *Biochim Biophys Acta* **1821** 852-857.

Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC & Catalano PM 2002 Tnf-Alpha Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy. *Diabetes* **51** 2207-2213.

Kitajima M, Oka S, Yasuhi I, Fukuda M, Rii Y & Ishimaru T 2001 Maternal Serum Triglyceride at 24--32 Weeks' Gestation and Newborn Weight in Nondiabetic Women with Positive Diabetic Screens. *Obstet Gynecol* **97** 776-780.

Klein K, Satler M, Elhenicky M, Brix J, Krzyzanowska K, Scherthaner G, Husslein PW & Scherthaner GH 2008 Circulating Levels of Mcp-1 Are Increased in Women with Gestational Diabetes. *Prenat Diagn* **28** 845-851.

Klingler M, Demmelmair H, Larque E & Koletzko B 2003 Analysis of Fa Contents in Individual Lipid Fractions from Human Placental Tissue. *Lipids* **38** 561-566.

Kniss DA, Shubert PJ, Zimmerman PD, Landon MB & Gabbe SG 1994 Insulinlike Growth Factors. Their Regulation of Glucose and Amino Acid Transport in Placental Trophoblasts Isolated from First-Trimester Chorionic Villi. *J Reprod Med* **39** 249-256.

Knopp RH, Magee MS, Walden CE, Bonet B & Benedetti TJ 1992 Prediction of Infant Birth Weight by Gdm Screening Tests. Importance of Plasma Triglyceride. *Diabetes Care* **15** 1605-1613.

Kotani Y, Yokota I, Kitamura S, Matsuda J, Naito E & Kuroda Y 2004 Plasma Adiponectin Levels in Newborns Are Higher Than Those in Adults and Positively Correlated with Birth Weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* **61** 418-423.

BIBLIOGRAFÍA

Koukkou E, Watts GF & Lowy C 1996 Serum Lipid, Lipoprotein and Apolipoprotein Changes in Gestational Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional and Prospective Study. *J Clin Pathol* **49** 634-637.

Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL & Hertz-Picciotto I 2012 Maternal Metabolic Conditions and Risk for Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. *Pediatrics* **129** e1121-1128.

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, et al. 2000 Disruption of Insulin Receptor Substrate 2 Causes Type 2 Diabetes Because of Liver Insulin Resistance and Lack of Compensatory Beta-Cell Hyperplasia. *Diabetes* **49** 1880-1889.

Kuzmicki M, Telejko B, Szamatowicz J, Zonenberg A, Nikolajuk A, Kretowski A & Gorska M 2009 High Resistin and Interleukin-6 Levels Are Associated with Gestational Diabetes Mellitus. *Gynecol Endocrinol* **25** 258-263.

Lagarde M, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thies F, Croset M & Lecerf J 2001 Lysophosphatidylcholine as a Preferred Carrier Form of Docosahexaenoic Acid to the Brain. *J Mol Neurosci* **16** 201-204; discussion 215-221.

Lager S, Jansson N, Olsson AL, Wennergren M, Jansson T & Powell TL 2011 Effect of Il-6 and Tnf-Alpha on Fatty Acid Uptake in Cultured Human Primary Trophoblast Cells. *Placenta* **32** 121-127.

Lager S & Powell TL 2012 Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *J Pregnancy* **2012** 179827.

Landon MB, Mintz MC & Gabbe SG 1989 Sonographic Evaluation of Fetal Abdominal Growth: Predictor of the Large-for-Gestational-Age Infant in Pregnancies Complicated by Diabetes Mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **160** 115-121.

Langer O, Yogev Y, Most O & Xenakis EM 2005 Gestational Diabetes: The Consequences of Not Treating. *Am J Obstet Gynecol* **192** 989-997.

Laplante M & Sabatini DM 2012 Mtor Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* **149** 274-293.

Lappas M 2014 Effect of Pre-Existing Maternal Obesity, Gestational Diabetes and Adipokines on the Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism in Adipose Tissue. *Metabolism* **63** 250-262.

Lappas M, Andrikopoulos S & Permezel M 2012 Hypoxanthine-Xanthine Oxidase Down-Regulates Glut1 Transcription Via Sirt1 Resulting in Decreased Glucose Uptake in Human Placenta. *J Endocrinol* **213** 49-57.

Lappas M, Permezel M & Rice GE 2005 Leptin and Adiponectin Stimulate the Release of Proinflammatory Cytokines and Prostaglandins from Human Placenta and Maternal Adipose Tissue Via Nuclear Factor-KappaB, Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-Gamma and Extracellularly Regulated Kinase 1/2. *Endocrinology* **146** 3334-3342.

Larque E, Demmelmair H, Gil-Sanchez A, Prieto-Sanchez MT, Blanco JE, Pagan A, Faber FL, Zamora S, Parrilla JJ & Koletzko B 2011 Placental Transfer of Fatty Acids and Fetal Implications. *Am J Clin Nutr* **94** 1908S-1913S.

Larque E, Demmelmair H, Klingler M, De Jonge S, Bondy B & Koletzko B 2006 Expression Pattern of Fatty Acid Transport Protein-1 (Fatp-1), Fatp-4 and Heart-Fatty Acid Binding Protein (H-Fabp) Genes in Human Term Placenta. *Early Hum Dev* **82** 697-701.

Larque E, Ruiz-Palacios M & Koletzko B 2013 Placental Regulation of Fetal Nutrient Supply. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **16** 292-297.

Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sorensen SJ, Hansen LH & Jakobsen M 2010 Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS One* **5** e9085.

Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH & Michaelsen KF 2001 The Essentiality of Long Chain N-3 Fatty Acids in Relation to Development and Function of the Brain and Retina. *Prog Lipid Res* **40** 1-94.

Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J & Hauguel-de Mouzon S 1998 Overexpression of Placental Leptin in Diabetic Pregnancy: A Critical Role for Insulin. *Diabetes* **47** 847-850.

Lewis RM, Brooks S, Crocker IP, Glazier J, Hanson MA, Johnstone ED, Panitchob N, Please CP, Sibley CP, Widdows KL, et al. 2013 Review: Modelling Placental Amino Acid Transfer--from Transporters to Placental Function. *Placenta* **34 Suppl** S46-51.

Lindgaard ML, Damm P, Mathiesen ER & Nielsen LB 2006 Placental Triglyceride Accumulation in Maternal Type 1 Diabetes Is Associated with Increased Lipase Gene Expression. *J Lipid Res* **47** 2581-2588.

Lindgaard ML, Olivecrona G, Christoffersen C, Kratky D, Hannibal J, Petersen BL, Zechner R, Damm P & Nielsen LB 2005 Endothelial and Lipoprotein Lipases in Human and Mouse Placenta. *J Lipid Res* **46** 2339-2346.

Liu B, Xu Y, Voss C, Qiu FH, Zhao MZ, Liu YD, Nie J & Wang ZL 2012 Altered Protein Expression in Gestational Diabetes Mellitus Placentas Provides Insight into Insulin Resistance and Coagulation/Fibrinolysis Pathways. *PLoS One* **7** e44701.

BIBLIOGRAFÍA

Lobo TF, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Mattar R & Daher S 2013 Resistin Concentration and Gestational Diabetes: A Systematic Review of the Literature. *J Reprod Immunol* **97** 120-127.

Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF & Bonen A 2002 Insulin Induces the Translocation of the Fatty Acid Transporter Fat/Cd36 to the Plasma Membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282** E491-495.

MacDonald JI & Sprecher H 1991 Phospholipid Fatty Acid Remodeling in Mammalian Cells. *Biochim Biophys Acta* **1084** 105-121.

MacNeill S, Dodds L, Hamilton DC, Armson BA & VandenHof M 2001 Rates and Risk Factors for Recurrence of Gestational Diabetes. *Diabetes Care* **24** 659-662.

Madsen EM, Lindegaard ML, Andersen CB, Damm P & Nielsen LB 2004 Human Placenta Secretes Apolipoprotein B-100-Containing Lipoproteins. *J Biol Chem* **279** 55271-55276.

Magnusson-Olsson AL, Hamark B, Ericsson A, Wennergren M, Jansson T & Powell TL 2006 Gestational and Hormonal Regulation of Human Placental Lipoprotein Lipase. *J Lipid Res* **47** 2551-2561.

Magnusson-Olsson AL, Lager S, Jacobsson B, Jansson T & Powell TL 2007 Effect of Maternal Triglycerides and Free Fatty Acids on Placental Lpl in Cultured Primary Trophoblast Cells and in a Case of Maternal Lpl Deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293** E24-30.

Magnusson AL, Waterman IJ, Wennergren M, Jansson T & Powell TL 2004 Triglyceride Hydrolase Activities and Expression of Fatty Acid Binding Proteins in the Human Placenta in Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction and Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 4607-4614.

Marseille-Tremblay C, Ethier-Chiasson M, Forest JC, Giguere Y, Masse A, Mounier C & Lafond J 2008 Impact of Maternal Circulating Cholesterol and Gestational Diabetes Mellitus on Lipid Metabolism in Human Term Placenta. *Mol Reprod Dev* **75** 1054-1062.

Mazaki-Tovi S, Kanety H & Sivan E 2005 Adiponectin and Human Pregnancy. *Curr Diab Rep* **5** 278-281.

McCormack SE, Shaham O, McCarthy MA, Deik AA, Wang TJ, Gerszten RE, Clish CB, Mootha VK, Grinspoon SK & Fleischman A 2013 Circulating Branched-Chain Amino Acid Concentrations Are Associated with Obesity and Future Insulin Resistance in Children and Adolescents. *Pediatr Obes* **8** 52-61.

McKay MM & Morrison DK 2007 Integrating Signals from Rtk to Erk/Mapk. *Oncogene* **26** 3113-3121.

McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A & Alford FP 2006 Do Adiponectin, Tnfalpha, Leptin and Crp Relate to Insulin Resistance in Pregnancy? Studies in Women with and without Gestational Diabetes, During and after Pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* **22** 131-138.

McLaughlin GB, Cheng YW & Caughey AB 2006 Women with One Elevated 3-Hour Glucose Tolerance Test Value: Are They at Risk for Adverse Perinatal Outcomes? *Am J Obstet Gynecol* **194** e16-19.

Mead JR, Irvine SA & Ramji DP 2002 Lipoprotein Lipase: Structure, Function, Regulation, and Role in Disease. *J Mol Med (Berl)* **80** 753-769.

Meek CL, Lewis HB, Patient C, Murphy HR & Simmons D 2015 Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus: Falling through the Net. *Diabetologia* **58** 2003-2012.

Mele J, Muralimanoharan S, Maloyan A & Myatt L 2014 Impaired Mitochondrial Function in Human Placenta with Increased Maternal Adiposity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307** E419-425.

Mendoza MC, Er EE & Blenis J 2011 The Ras-Erk and Pi3k-Mtor Pathways: Cross-Talk and Compensation. *Trends Biochem Sci* **36** 320-328.

Metzger BE 2007 Long-Term Outcomes in Mothers Diagnosed with Gestational Diabetes Mellitus and Their Offspring. *Clin Obstet Gynecol* **50** 972-979.

Metzger BE & Coustan DR 1998 Summary and Recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* **21 Suppl 2** B161-167.

Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, et al. 2010 International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care* **33** 676-682.

Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, et al. 2008 Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* **358** 1991-2002.

Miehle K, Stepan H & Fasshauer M 2012 Leptin, Adiponectin and Other Adipokines in Gestational Diabetes Mellitus and Pre-Eclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf)* **76** 2-11.

Mikolajczyk RT, Zhang J, Betran AP, Souza JP, Mori R, Gulmezoglu AM & Merialdi M 2011 A Global Reference for Fetal-Weight and Birthweight Percentiles. *Lancet* **377** 1855-1861.

Milner RD, Ashworth MA & Barson AJ 1972 Insulin Release from Human Foetal Pancreas in Response to Glucose, Leucine and Arginine. *J Endocrinol* **52** 497-505.

BIBLIOGRAFÍA

- Min Y, Lowy C, Ghebremeskel K, Thomas B, Offley-Shore B & Crawford M 2005 Unfavorable Effect of Type 1 and Type 2 Diabetes on Maternal and Fetal Essential Fatty Acid Status: A Potential Marker of Fetal Insulin Resistance. *Am J Clin Nutr* **82** 1162-1168.
- Mishima T, Miner JH, Morizane M, Stahl A & Sadovsky Y 2011 The Expression and Function of Fatty Acid Transport Protein-2 and -4 in the Murine Placenta. *PLoS One* **6** e25865.
- Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF & Herrera E 1992 Longitudinal Study of Plasma Lipoproteins and Hormones During Pregnancy in Normal and Diabetic Women. *Diabetes* **41** 1651-1659.
- Morisset AS, Dube MC, Cote JA, Robitaille J, Weisnagel SJ & Tchernof A 2011 Circulating Interleukin-6 Concentrations During and after Gestational Diabetes Mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand* **90** 524-530.
- Morrison JA, Friedman LA, Wang P & Glueck CJ 2008 Metabolic Syndrome in Childhood Predicts Adult Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus 25 to 30 Years Later. *J Pediatr* **152** 201-206.
- Mousiolis AV, Kollia P, Skentou C & Messinis IE 2012 Effects of Leptin on the Expression of Fatty Acid-Binding Proteins in Human Placental Cell Cultures. *Mol Med Rep* **5** 497-502.
- Nandakumaran M, Al-Shammari M & Al-Saleh E 2004 Maternal-Fetal Transport Kinetics of L-Leucine in Vitro in Gestational Diabetic Pregnancies. *Diabetes Metab* **30** 367-374.
- NDDG 1979 Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* **28** 1039-1057.
- Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, et al. 2009 A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature That Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* **9** 311-326.
- Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL & Silver DL 2014 Mfsd2a Is a Transporter for the Essential Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid. *Nature* **509** 503-506.
- NICE 2013 National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosing Gestational Diabetes Mellitus, March 4-6, 2013. *Obstet Gynecol* **122** 358-369.
- Nystrom FH & Quon MJ 1999 Insulin Signalling: Metabolic Pathways and Mechanisms for Specificity. *Cell Signal* **11** 563-574.

O'Sullivan JB & Mahan CM 1964 Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes* **13** 278-285.

O'Tierney-Ginn P, Presley L, Myers S & Catalano P 2015 Placental Growth Response to Maternal Insulin in Early Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **100** 159-165.

Ogonowski J, Miazgowski T, Engel K & Celewicz Z 2014 Birth Weight Predicts the Risk of Gestational Diabetes Mellitus and Pregravid Obesity. *Nutrition* **30** 39-43.

Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Wolf A & Dulitzky M 2001 School-Age Children Born to Diabetic Mothers and to Mothers with Gestational Diabetes Exhibit a High Rate of Inattention and Fine and Gross Motor Impairment. *J Pediatr Endocrinol Metab* **14 Suppl 1** 681-689.

Osmond DT, Nolan CJ, King RG, Brennecke SP & Gude NM 2000 Effects of Gestational Diabetes on Human Placental Glucose Uptake, Transfer, and Utilisation. *Diabetologia* **43** 576-582.

Ouzounian JG, Hernandez GD, Korst LM, Montoro MM, Battista LR, Walden CL & Lee RH 2011 Pre-Pregnancy Weight and Excess Weight Gain Are Risk Factors for Macrosomia in Women with Gestational Diabetes. *J Perinatol* **31** 717-721.

Pagan A, Prieto-Sanchez MT, Blanco-Carnero JE, Gil-Sanchez A, Parrilla JJ, Demmelmair H, Koletzko B & Larque E 2013 Materno-Fetal Transfer of Docosahexaenoic Acid Is Impaired by Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305** E826-833.

Pala HG, Ozalp Y, Yener AS, Gerçeklioglu G, Uysal S & Onvural A 2015 Adiponectin Levels in Gestational Diabetes Mellitus and in Pregnant Women without Glucose Intolerance. *Adv Clin Exp Med* **24** 85-92.

Pantham P, Aye IL & Powell TL 2015 Inflammation in Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta* **36** 709-715.

Pappa KI, Vlachos G, Theodora M, Roubelaki M, Angelidou K & Antsaklis A 2007 Intermediate Metabolism in Association with the Amino Acid Profile During the Third Trimester of Normal Pregnancy and Diet-Controlled Gestational Diabetes. *Am J Obstet Gynecol* **196** 65 e61-65.

Paradisi G, Ianniello F, Tomei C, Bracaglia M, Carducci B, Gualano MR, La Torre G, Banci M & Caruso A 2010 Longitudinal Changes of Adiponectin, Carbohydrate and Lipid Metabolism in Pregnant Women at High Risk for Gestational Diabetes. *Gynecol Endocrinol* **26** 539-545.

Park S, Park JY, Lee JH & Kim SH 2015 Plasma Levels of Lysine, Tyrosine, and Valine During Pregnancy Are Independent Risk Factors of Insulin Resistance and Gestational Diabetes. *Metab Syndr Relat Disord* **13** 64-70.

BIBLIOGRAFÍA

Pedersen J 1952 Diabetes and Pregnancy; Blood Sugar of Newborn Infants During Fasting and Glucose Administration. *Nord Med* **47** 1049.

Perez-Perez A, Maymo JL, Gambino YP, Guadix P, Duenas JL, Varone CL & Sanchez-Margalet V 2013 Activated Translation Signaling in Placenta from Pregnant Women with Gestational Diabetes Mellitus: Possible Role of Leptin. *Horm Metab Res* **45** 436-442.

Perovic M, Garalejic E, Gojnic M, Arsic B, Pantic I, Bojovic DJ, Fazlagic A & Gardiner H 2012 Sensitivity and Specificity of Ultrasonography as a Screening Tool for Gestational Diabetes Mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med* **25** 1348-1353.

Pessin JE & Saltiel AR 2000 Signaling Pathways in Insulin Action: Molecular Targets of Insulin Resistance. *J Clin Invest* **106** 165-169.

Petry CJ 2010 Gestational Diabetes: Risk Factors and Recent Advances in Its Genetics and Treatment. *Br J Nutr* **104** 775-787.

Pettitt DJ, Nelson RG, Saad MF, Bennett PH & Knowler WC 1993 Diabetes and Obesity in the Offspring of Pima Indian Women with Diabetes During Pregnancy. *Diabetes Care* **16** 310-314.

Pietilainen KH, Sysi-Aho M, Rissanen A, Seppanen-Laakso T, Yki-Jarvinen H, Kaprio J & Oresic M 2007 Acquired Obesity Is Associated with Changes in the Serum Lipidomic Profile Independent of Genetic Effects--a Monozygotic Twin Study. *PLoS One* **2** e218.

Radaelli T, Lepercq J, Varastehpour A, Basu S, Catalano PM & Hauguel-De Mouzon S 2009 Differential Regulation of Genes for Fetoplacental Lipid Pathways in Pregnancy with Gestational and Type 1 Diabetes Mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **201** 209 e201-209 e210.

Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P & Hauguel-de Mouzon S 2003 Gestational Diabetes Induces Placental Genes for Chronic Stress and Inflammatory Pathways. *Diabetes* **52** 2951-2958.

Rajkhowa M, Brett S, Cuthbertson DJ, Lipina C, Ruiz-Alcaraz AJ, Thomas GE, Logie L, Petrie JR & Sutherland C 2009 Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome Is Associated with Defective Regulation of Erk1/2 by Insulin in Skeletal Muscle in Vivo. *Biochem J* **418** 665-671.

Ramirez VG, F; Jansson, T; and Powell, TL. 2012 Placental Insulin Resistance in Women with High Bmi: Insulin Receptor Expression and Insulin Signaling. *Reproductive Sciences* **19** A307-A308.

Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI & Saier MH, Jr. 2012 The Major Facilitator Superfamily (Mfs) Revisited. *FEBS J* **279** 2022-2035.

Reece EA, Leguizamón G & Wiznitzer A 2009 Gestational Diabetes: The Need for a Common Ground. *Lancet* **373** 1789-1797.

Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M & Zinman B 2003 C-Reactive Protein and Gestational Diabetes: The Central Role of Maternal Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 3507-3512.

Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M & Zinman B 2004 Reduced Adiponectin Concentration in Women with Gestational Diabetes: A Potential Factor in Progression to Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **27** 799-800.

Retnakaran R & Shah BR 2015 Sex of the Baby and Future Maternal Risk of Type 2 Diabetes in Women Who Had Gestational Diabetes. *Diabet Med*.

Ricart W, Lopez J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, Gonzalez N, Balsells M, Luna R, Cortazar A, Navarro P, et al. 2005 Potential Impact of American Diabetes Association (2000) Criteria for Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus in Spain. *Diabetologia* **48** 1135-1141.

Rice GE, Wong MH, Farrugia W & Scott KF 1998 Contribution of Type II Phospholipase A2 to in Vitro Phospholipase A2 Enzymatic Activity in Human Term Placenta. *J Endocrinol* **157** 25-31.

Richelsen B 1999 Effect of Growth Hormone on Adipose Tissue and Skeletal Muscle Lipoprotein Lipase Activity in Humans. *J Endocrinol Invest* **22** 10-15.

Rizzo M, Berneis K, Altinova AE, Toruner FB, Akturk M, Ayvaz G, Rini GB, Spinaz GA & Arslan M 2008 Atherogenic Lipoprotein Phenotype and Ldl Size and Subclasses in Women with Gestational Diabetes. *Diabet Med* **25** 1406-1411.

Rizzo TA, Silverman BL, Metzger BE & Cho NH 1997 Behavioral Adjustment in Children of Diabetic Mothers. *Acta Paediatr* **86** 969-974.

Roland MC, Friis CM, Voldner N, Godang K, Bollerslev J, Haugen G & Henriksen T 2012 Fetal Growth Versus Birthweight: The Role of Placenta Versus Other Determinants. *PLoS One* **7** e39324.

Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH & Smith U 1997 Insulin Receptor Substrate (Irs) 1 Is Reduced and Irs-2 Is the Main Docking Protein for Phosphatidylinositol 3-Kinase in Adipocytes from Subjects with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 4171-4175.

Roos S, Jansson N, Palmberg I, Saljo K, Powell TL & Jansson T 2007 Mammalian Target of Rapamycin in the Human Placenta Regulates Leucine Transport and Is Down-Regulated in Restricted Fetal Growth. *J Physiol* **582** 449-459.

BIBLIOGRAFÍA

Roos S, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL & Jansson T 2009a Regulation of Placental Amino Acid Transporter Activity by Mammalian Target of Rapamycin. *Am J Physiol Cell Physiol* **296** C142-150.

Roos S, Lagerlof O, Wennergren M, Powell TL & Jansson T 2009b Regulation of Amino Acid Transporters by Glucose and Growth Factors in Cultured Primary Human Trophoblast Cells Is Mediated by Mtor Signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **297** C723-731.

Ruiz-Alcaraz AJ, Lipina C, Petrie JR, Murphy MJ, Morris AD, Sutherland C & Cuthbertson DJ 2013 Obesity-Induced Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle Is Characterised by Defective Activation of P42/P44 Map Kinase. *PLoS One* **8** e56928.

Sacks DA 2007 Etiology, Detection, and Management of Fetal Macrosomia in Pregnancies Complicated by Diabetes Mellitus. *Clin Obstet Gynecol* **50** 980-989.

Salafia CM, Zhang J, Charles AK, Bresnahan M, Shrout P, Sun W & Maas EM 2008 Placental Characteristics and Birthweight. *Paediatr Perinat Epidemiol* **22** 229-239.

Sanchez-Vera I, Bonet B, Viana M, Quintanar A, Martin MD, Blanco P, Donnay S & Albi M 2007 Changes in Plasma Lipids and Increased Low-Density Lipoprotein Susceptibility to Oxidation in Pregnancies Complicated by Gestational Diabetes: Consequences of Obesity. *Metabolism* **56** 1527-1533.

Sastry PS 1985 Lipids of Nervous Tissue: Composition and Metabolism. *Prog Lipid Res* **24** 69-176.

Sattar N, Greer IA, Pirwani I, Gibson J & Wallace AM 1998 Leptin Levels in Pregnancy: Marker for Fat Accumulation and Mobilization? *Acta Obstet Gynecol Scand* **77** 278-283.

Savona-Ventura C, Vassallo J, Marre M & Karamanos BG 2012 Hyperglycaemia in Pregnancy in Mediterranean Women. *Acta Diabetol* **49** 473-480.

Scifres CM, Chen B, Nelson DM & Sadovsky Y 2011 Fatty Acid Binding Protein 4 Regulates Intracellular Lipid Accumulation in Human Trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **96** E1083-1091.

Schaefer-Graf UM, Graf K, Kulbacka I, Kjos SL, Dudenhausen J, Vetter K & Herrera E 2008 Maternal Lipids as Strong Determinants of Fetal Environment and Growth in Pregnancies with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **31** 1858-1863.

Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM & Sadovsky Y 2005 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma and Retinoid X Receptor Signaling Regulate Fatty Acid Uptake by Primary Human Placental Trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 4267-4275.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B & Auwerx J 1996 Pparalpha and Pparggamma Activators Direct a Distinct Tissue-Specific Transcriptional Response Via a Ppre in the Lipoprotein Lipase Gene. *EMBO J* **15** 5336-5348.

Shao J, Catalano PM, Yamashita H, Ishizuka T & Friedman JE 2000 Vanadate Enhances but Does Not Normalize Glucose Transport and Insulin Receptor Phosphorylation in Skeletal Muscle from Obese Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **183** 1263-1270.

Sheiner E, Levy A, Katz M, HersHKovitz R, Leron E & Mazor M 2004 Gender Does Matter in Perinatal Medicine. *Fetal Diagn Ther* **19** 366-369.

Shin JA & Yoon KH 2010 The Effect of Parental Transmission of Diabetes on the Development of Gestational Diabetes Mellitus. *Korean J Intern Med* **25** 237-238.

Shushan A, Ezra Y & Samueloff A 1997 Early Treatment of Gestational Diabetes Reduces the Rate of Fetal Macrosomia. *Am J Perinatol* **14** 253-256.

Silveira ML, Whitcomb BW, Pekow P, Braun B, Markenson G, Dole N, Manson JE, Solomon CG, Carbone ET & Chasan-Taber L 2014 Perceived Psychosocial Stress and Glucose Intolerance among Pregnant Hispanic Women. *Diabetes Metab* **40** 466-475.

Simmons D & Breier BH 2002 Fetal Overnutrition in Polynesian Pregnancies and in Gestational Diabetes May Lead to Dysregulation of the Adipoinular Axis in Offspring. *Diabetes Care* **25** 1539-1544.

Sivan E & Boden G 2003 Free Fatty Acids, Insulin Resistance, and Pregnancy. *Curr Diab Rep* **3** 319-322.

Solomon CG, Willett WC, Carey VJ, Rich-Edwards J, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Spiegelman D & Manson JE 1997 A Prospective Study of Pregravid Determinants of Gestational Diabetes Mellitus. *JAMA* **278** 1078-1083.

Sood R, Zehnder JL, Druzin ML & Brown PO 2006 Gene Expression Patterns in Human Placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 5478-5483.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The Hormone Resistin Links Obesity to Diabetes. *Nature* **409** 307-312.

Tallarigo L, Giampietro O, Penno G, Miccoli R, Gregori G & Navalesi R 1986 Relation of Glucose Tolerance to Complications of Pregnancy in Nondiabetic Women. *N Engl J Med* **315** 989-992.

Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS & Cetin I 2003 Foetal and Placental Weights in Relation to Maternal Characteristics in Gestational Diabetes. *Placenta* **24** 343-347.

BIBLIOGRAFÍA

Thadhani R, Wolf M, Hsu-Blatman K, Sandler L, Nathan D & Ecker JL 2003 First-Trimester Sex Hormone Binding Globulin and Subsequent Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **189** 171-176.

Thies F, Delachambre MC, Bentejac M, Lagarde M & Lecerf J 1992 Unsaturated Fatty Acids Esterified in 2-Acyl-L-Lysophosphatidylcholine Bound to Albumin Are More Efficiently Taken up by the Young Rat Brain Than the Unesterified Form. *J Neurochem* **59** 1110-1116.

Tobin KA, Harsem NK, Dalen KT, Staff AC, Nebb HI & Duttaroy AK 2006 Regulation of Adrp Expression by Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Bewo Cells, a Human Placental Choriocarcinoma Cell Line. *J Lipid Res* **47** 815-823.

Tobin KA, Johnsen GM, Staff AC & Duttaroy AK 2009 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Transport across Human Placental Choriocarcinoma (Bewo) Cells. *Placenta* **30** 41-47.

Tomazic M, Janez A, Sketelj A, Kocijancic A, Eckel J & Sharma PM 2002 Comparison of Alterations in Insulin Signalling Pathway in Adipocytes from Type II Diabetic Pregnant Women and Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetologia* **45** 502-508.

Tzatsos A & Kandror KV 2006 Nutrients Suppress Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Via Raptor-Dependent Mtor-Mediated Insulin Receptor Substrate 1 Phosphorylation. *Mol Cell Biol* **26** 63-76.

Verrey F 2003 System L: Heteromeric Exchangers of Large, Neutral Amino Acids Involved in Directional Transport. *Pflugers Arch* **445** 529-533.

Visiedo F, Bugatto F, Quintero-Prado R, Cozar-Castellano I, Bartha JL & Perdomo G 2015 Glucose and Fatty Acid Metabolism in Placental Explants from Pregnancies Complicated with Gestational Diabetes Mellitus. *Reprod Sci* **22** 798-801.

Visiedo F, Bugatto F, Sanchez V, Cozar-Castellano I, Bartha JL & Perdomo G 2013 High Glucose Levels Reduce Fatty Acid Oxidation and Increase Triglyceride Accumulation in Human Placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305** E205-212.

Viswanathan M, Siega-Riz AM, Moos MK, Deierlein A, Mumford S, Knaack J, Thieda P, Lux LJ & Lohr KN 2008 Outcomes of Maternal Weight Gain. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 1-223.

Wallace JM, Horgan GW & Bhattacharya S 2012 Placental Weight and Efficiency in Relation to Maternal Body Mass Index and the Risk of Pregnancy Complications in Women Delivering Singleton Babies. *Placenta* **33** 611-618.

Wang H & Eckel RH 2009 Lipoprotein Lipase: From Gene to Obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297** E271-288.

Wang L, Rhodes CJ & Lawrence JC, Jr. 2006 Activation of Mammalian Target of Rapamycin (Mtor) by Insulin Is Associated with Stimulation of 4ebp1 Binding to Dimeric Mtor Complex 1. *J Biol Chem* **281** 24293-24303.

Waterman IJ, Emmison N, Sattar N & Dutta-Roy AK 2000 Further Characterization of a Novel Triacylglycerol Hydrolase Activity (Ph 6.0 Optimum) from Microvillous Membranes from Human Term Placenta. *Placenta* **21** 813-823.

Wauters M, Considine RV & Van Gaal LF 2000 Human Leptin: From an Adipocyte Hormone to an Endocrine Mediator. *Eur J Endocrinol* **143** 293-311.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE & Tataranni PA 2001 Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **86** 1930-1935.

Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, Barrett-Connor E, Bhargava SK, Birgisdottir BE, Carlsson S, et al. 2008 Birth Weight and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *JAMA* **300** 2886-2897.

WHO 2014 Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy: A World Health Organization Guideline. *Diabetes Res Clin Pract* **103** 341-363.

Wijendran V, Bendel RB, Couch SC, Philipson EH, Cheruku S & Lammi-Keefe CJ 2000 Fetal Erythrocyte Phospholipid Polyunsaturated Fatty Acids Are Altered in Pregnancy Complicated with Gestational Diabetes Mellitus. *Lipids* **35** 927-931.

Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajos P, Salamon F, Turi Z, Kovacs M, Vargha P, et al. 2002 Tumor Necrosis Factor System in Insulin Resistance in Gestational Diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **56** 93-99.

Winter JN, Fox TE, Kester M, Jefferson LS & Kimball SR 2010 Phosphatidic Acid Mediates Activation of Mtorc1 through the Erk Signaling Pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* **299** C335-344.

Winzer C, Wagner O, Festa A, Schneider B, Roden M, Bancher-Todesca D, Pacini G, Funahashi T & Kautzky-Willer A 2004 Plasma Adiponectin, Insulin Sensitivity, and Subclinical Inflammation in Women with Prior Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **27** 1721-1727.

Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR & Stahl A 2006 Fatp1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity. *Mol Cell Biol* **26** 3455-3467.

Xing AY, Challier JC, Lepercq J, Cauzac M, Charron MJ, Girard J & Hauguel-de Mouzon S 1998 Unexpected Expression of Glucose Transporter 4 in Villous Stromal Cells of Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **83** 4097-4101.

BIBLIOGRAFÍA

- Xu J, Zhao YH, Chen YP, Yuan XL, Wang J, Zhu H & Lu CM 2014 Maternal Circulating Concentrations of Tumor Necrosis Factor-Alpha, Leptin, and Adiponectin in Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ScientificWorldJournal* **2014** 926932.
- Yeh J & Shelton JA 2005 Increasing Prepregnancy Body Mass Index: Analysis of Trends and Contributing Variables. *Am J Obstet Gynecol* **193** 1994-1998.
- Yeung EH, Hu FB, Solomon CG, Chen L, Louis GM, Schisterman E, Willett WC & Zhang C 2010 Life-Course Weight Characteristics and the Risk of Gestational Diabetes. *Diabetologia* **53** 668-678.
- Yogev Y, Xenakis EM & Langer O 2004 The Association between Preeclampsia and the Severity of Gestational Diabetes: The Impact of Glycemic Control. *Am J Obstet Gynecol* **191** 1655-1660.
- Young M & Prenton MA 1969 Maternal and Fetal Plasma Amino Acid Concentrations During Gestation and in Retarded Fetal Growth. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* **76** 333-334.
- Zaretsky MV, Alexander JM, Byrd W & Bawdon RE 2004 Transfer of Inflammatory Cytokines across the Placenta. *Obstet Gynecol* **103** 546-550.
- Zeghari N, Vidal H, Younsi M, Ziegler O, Drouin P & Donner M 2000 Adipocyte Membrane Phospholipids and Ppar-Gamma Expression in Obese Women: Relationship to Hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279** E736-743.
- Zhang C, Liu S, Solomon CG & Hu FB 2006 Dietary Fiber Intake, Dietary Glycemic Load, and the Risk for Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **29** 2223-2230.
- Zhu MJ, Ma Y, Long NM, Du M & Ford SP 2010 Maternal Obesity Markedly Increases Placental Fatty Acid Transporter Expression and Fetal Blood Triglycerides at Midgestation in the Ewe. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **299** R1224-1231

VIII. ANEXO

ANEXO

Estimado Participante,

El siguiente cuestionario nos permitirá conocer sus hábitos dietéticos con especial hincapié en la ingesta de ácidos grasos de cadena larga. Las cuestiones se refieren al mes pasado de su embarazo. Por favor, lea detenidamente las preguntas y marque las casillas correspondientes.

¿Cómo rellenar el cuestionario adecuadamente ?

- Refleje en cada pregunta, si usted consumió el citado alimento y con qué frecuencia (no dude en escribir al lado si necesario).
- En caso de que usted consuma algún alimento de ese tipo regularmente que no esté listado, por favor, indíquelo en la parte inferior de la pregunta en la columna "otros" y con qué frecuencia
- Si usted no consume el alimento de la pregunta, marque la columna "No consumo".

Por favor considere que:

- No piense únicamente en los alimentos que usted consume en casa, sino también en los consumidos en el trabajo, restaurantes o con amigos.
- En cualquier caso, sus datos serán estrictamente considerados como confidenciales. Si tuviera algún problema o pregunta respecto al cuestionario, usted siempre puede consultarnos en el teléfono:

Muchas gracias por su participación y apoyo!

Atentamente,

.....

Cuestionario dietético – semana 38 (Parto)



1. ¿Con qué frecuencia utiliza las siguientes grasas o aceites para cocinar platos calientes (tales como pescado, carne, verduras) o preparar platos fríos (como ensalada)?										
	No uso	veces/día		veces/semana			veces / mes	porción	cantidad	
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3			
Mantequilla	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	tsp.	_____	
Manteca	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	tsp.	_____	
Aceite de palma o de coco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tbsp.	_____	
Aceite de girasol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tbsp.	_____	
Aceite de oliva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tbsp.	_____	
Mayonesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tbsp.	_____	
Otros:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tbsp.	_____	
2. ¿Qué grasa usa preferiblemente para untar (ejemplo en tostadas)?										
	No uso	veces/día		veces/semana			veces / mes	porción	cantidad	
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3			
Mantequilla	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	tsp.	_____	
Margarina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	tsp.	_____	
Foiegras o paté	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	tsp.	_____	
3. ¿Con qué frecuencia consume pescado?										
2 - 3 x por día	1 x por día	5 - 6 x por semana	2 - 4 x por semana	1 x por semana	1 - 3 x por mes	No consumo				
4. ¿Con qué frecuencia consumió los siguientes tipos de pescado y especifique cuales en el espacio en blanco?										
a) <u>Pescado Blanco</u>: Bacalao, Rodaballo, Merluza, Marisco, Lucio, Lenguado, Dorada, Mero, Sepia/Pulpo, Vieiras, Camarones, Perca, Surimi (cangrejo)										
	No consumo	veces/día		veces/semana		veces/mes		Racion		
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3	filete ~ 100 g		

Pescado Blanco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	
¿Como prepara o come el pescado preferentemente?									
<input type="radio"/>	Plancha, cocido, horno								
<input type="radio"/>	Empanado y frito								
<input type="radio"/>	Lata								
<input type="radio"/>	Sopa								
b) <u>Pescado Medio graso</u>, Merluza, Lubina, Anchoas, Boquerones, Emperador, Sardinas, Trucha									
	No consumo	veces/día		veces/semana		veces/mes		Racion	
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3	filete ~ 100 g	
Pescado medio graso	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	
¿Como prepara o come el pescado preferentemente?									
<input type="radio"/>	Plancha, cocido, horno								
<input type="radio"/>	Empanado y frito								
<input type="radio"/>	Lata								
<input type="radio"/>	Sopa								
c) <u>Pescado graso</u>, Caballa, Salmon, Atún, Arenques, Angulas									
	No consumo	veces/día		veces/semana		veces/mes		Racion	
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3	filete ~ 100 g	
Pescado graso	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	
¿Como prepara o come el pescado preferentemente?									
<input type="radio"/>	Plancha, cocido, horno								
<input type="radio"/>	Empanado y frito								
<input type="radio"/>	Lata								
<input type="radio"/>	Sopa								
5.	¿Con qué frecuencia consumió frutos secos como snack y subraye cuales?								
	No consumo	veces/día		veces/ semana			veces/mes	Racion	Cantidad
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3		
Pistachos, Nueces, Avellanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 Puñado = 10g	_____
Almendras, Anacardos, Nueces de Macadamia, Castañas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pieza = 1,5g	_____
Cacahuetes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 Puñado = 10g	_____
Pipas de girasol, semillas de calabaza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 Puñado = 10g	_____

ANEXO

6. ¿Toma habitualmente los frutos secos tostados y salados?								
Si	<input type="radio"/>							
No	<input type="radio"/>							
No sé	<input type="radio"/>							
7. ¿Con qué frecuencia consume los siguientes alimentos?								
	No consumo	veces/ día		veces/ semana			veces/mes	Cantidad
		1	2-3	1	2-3	4-6	1-3	
Huevos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____
Filetes de Pollo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Pieza = 100g
Pollo asado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Pieza = 100g
Pechuga de pavo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Rodaja = 30g
¿Ha estado consumiendo hasta la semana 16 de embarazo uno o más de los siguientes preparados regularmente (unas pocas veces por semana o diariamente)?								
Ácido Fólico								
Complejos multivitamínicos ¿cual?								
Preparados de aceite de pescado, -capsulas								
Iodo								
Leche Puleva omega-3								
Gestagyn plus								
Natalben								
Hierro								
Huevos omega 3								
Otros:								
