

Diagnóstico y prevención del daño cerebral prenatal
en las anomalías tardías del crecimiento intrauterino,
mediante la detección en sangre materna de
biomarcadores del desarrollo neuronal anómalo:

Micro-RNA fetal

Gabriela Alejandra Loscalzo

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.**

VNIVERSITAT (è) VALÈNCIA (è) (è) (è)

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Medicina 3139
Facultat de Medicina i Odontologia

Tesis doctoral

Diagnóstico y prevención del daño cerebral prenatal
en las anomalías tardías del crecimiento intrauterino,
mediante la detección en sangre materna de
biomarcadores del desarrollo neuronal anómalo:
Micro-RNA fetal

Autor: Dra. Gabriela Alejandra Loscalzo

Director de la tesis
Prof. Dr. José Morales-Roselló

Junio 2023

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Morales-Roselló José N.I.F.:527448345

Departamento/Instituto: Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia

Director de la tesis doctoral:

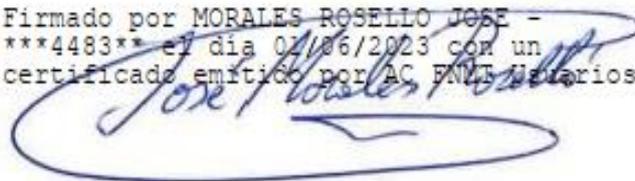
"Diagnóstico y prevención del daño cerebral prenatal en las anomalías tardías del crecimiento intrauterino, mediante la detección en sangre materna de biomarcadores del desarrollo neuronal anómalo: Micro-RNA fetal"

De D/Dña. Gabriela Alejandra Loscalzo, estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: Valencia, Mayo 2023

Fdo.: Morales-Roselló José
Director de tesis

Firmado por MORALES ROSELLÓ JOSÉ -
***4483** el día 02/06/2023 con un
certificado emitido por AC ENVI Licencios



ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que me han acompañado durante el curso de mi doctorado:

A mi familia y amigos, que siempre me proporcionaron fuerzas y me apoyaron durante todo el proyecto. Sin su apoyo no lo hubiera podido lograr.

A mi director de tesis, el Profesor José Morales Roselló, que desde el principio me recibió muy bien en Valencia, me guió a lo largo de la investigación y me enseñó tanto durante todos estos años. Motivos por los que le estaré eternamente agradecida.

Al Dr. Alfredo Perales-Marín, que como previo jefe de Servicio me recibió, me aconsejó y me permitió iniciar el doctorado en el Hospital La Fe.

A mis compañeras y compañeros del Servicio de Obstetricia del Hospital La Fe, que me han ayudado y enseñado mucho. Especialmente a las Dras. Julia, Alicia y a los Dres. Ramiro y José Luis.

Índice General

	<i>Pág.</i>
1. Introducción	13
1.1 Hipótesis de Barker	15
1.2 Programación fetal	16
1.3 Restricción de crecimiento fetal	16
1.4 Clasificación de la restricción de crecimiento fetal	18
1.5 Diagnóstico de RCF de inicio tardío: un desafío	20
1.6 Consecuencias de la RCF de inicio tardío	21
1.7 Epigenética y mecanismos epigenéticos	27
1.8 Biogénesis de miRNAs	29
1.9 Detección de miRNAs	30
1.10 Predicción de dianas de miRNAs	32
1.11 Análisis de enriquecimiento	33
1.12 MiRNAs y embarazo	35
2. Hipótesis del trabajo	39
3. Objetivos	43
4. Metodología	47
4.1 Características del estudio	49
4.2 Metodología	50
4.2.a Reclutamiento de pacientes	50
4.2.b Recolección de muestras	52
4.2.c Extracción de miRNAs	52
4.2.d Preparación de la biblioteca y NGS	53
4.2.e Análisis de expresión diferencial	53
4.2.f Validación de miRNAs por PCR	54
4.2.g Predicción de objetivos y análisis de sobreexpresión	55
5. Resultados Parte 1: Análisis de muestras de cordón umbilical	57
5.1 Identificación de miRNAs expresados diferencialmente mediante Small RNA-Seq	59
5.2 Estadísticas descriptivas de la población del estudio	62
5.3 Análisis de las dianas de miRNA y de las vías bioquímicas en el contexto de la RCF tardío	65
5.4 Validación de la qPCR en tiempo real (RT-qPCR) a partir del plasma del cordón umbilical	67
5.5 Estadística descriptiva de las muestras validadas por RT-PCR	69
5.6 Red de interacción y análisis funcional	71
5.7 Interacción de miRNAs hallados en la formación de triplex	76

5.8	Asociación de miR-132-3p, miR-185-5p con parámetros clínicos y/o ecográficos	77
6. Resultados Parte 2: Análisis de muestras de sangre materna		86
6.1	Validación por RT-qPCR de miRNA-25-3p, miRNA-132-3p y miRNA-185-5p en muestras de sangre materna	86
6.2	Estadísticas descriptivas de la población del estudio	87
7. Discusión General		91
8. Conclusión		103
9. Continuación del Estudio		106
10. Bibliografía		107
10. Trabajos publicados y en vías de publicación		131

RESUMEN

La hipoxia fetal crónica es causa de muchas anomalías neurocognitivas con grave repercusión en el adulto. Muchas de las enfermedades tienen su origen en una hipoxia fetal no diagnosticada durante la gestación. En la actualidad no existe ninguna técnica precisa para distinguir que fetos están sufriendo hipoxia al final de la gestación. El Doppler y la valoración del crecimiento fetal solo permiten sospechar la existencia de daño hipóxico crónico, cuando el daño neurológico ya se ha establecido. La capacidad de detectar dichas anomalías con técnicas de biología molecular de marcadores biológicos sería un instrumento de enorme valor para la prevención del daño perinatal.

Este proyecto de investigación se encaminó a la detección de marcadores biológicos (micro-RNA) de daño neurológico fetal en sangre materna. Para ello, se estudiaron muestras sanguíneas de cordón umbilical y sangre materna, obtenidas tras el parto, pertenecientes a dos grupos de población de estudio: gestaciones con restricción de crecimiento tardío (RCF) y gestaciones con crecimiento normal.

En primer lugar se realizó un proceso de secuenciación genética en 25 muestras (16 crecimiento normal / 9 RCF-tardío) de sangre de cordón umbilical para valorar los micro-RNAs (miRNAs) que se expresaban de forma diferenciada. Con posterioridad, éstos resultados se validaron mediante técnica PCR en 48 muestras (24 crecimiento normal/ 24RCF tardío).

Al analizar los resultados de la validación se observó una sobreexpresión significativa en el grupo de RCF tardío de los miRNAs: miRNA-25-3p, miRNA-132-3p y miRNA-185-5p.

Una vez obtenidos estos resultados se llevó a cabo un análisis de las vías y la ontología génica, relacionadas con RCF descritas en la literatura, en la que están implicados estos miRNAs, las cuales revelaron una sobrerrepresentación principalmente de ciertas vías moleculares asociadas al desarrollo cardiaco, angiogénesis y muerte neuronal. Además, como novedoso hallamos miRNAs con acción sinérgica (miR-185-5p y miR-25-3p) en el metabolismo de colesterol, de gran importancia en el desarrollo fetal.

Por otro lado también se realizó una asociación de estos miRNAs con parámetros clínicos y ecográficos, de manera que nos permitiera poder utilizarlos en algoritmos pronóstico/terapéuticos. La mayoría de los casos con sobreexpresión de miR-132-3p presentaron centiles de peso corporal bajos; la sobreexpresión de miR-185-5p está

inversamente correlacionada con el Doppler fetal (CPR MoM), por lo que su papel fundamental estaría relacionado con la respuesta a la hipoxia.

A continuación se realizó la búsqueda de éstos miRNAs en las muestras de sangre materna pareadas con las del cordón umbilical analizadas previamente, en la que no se encontró el perfil diferencial observado en sangre fetal, por lo que, al menos en nuestro estudio concluimos que éstos miRNAs no se transmiten significativamente a través de la placenta y que esto podría deberse, entre otras hipótesis, a que la disfunción placentaria en la RCF podría atenuar la biogénesis de miRNAs, y su posterior liberación al plasma y/o que los patrones de expresión de los miRNAs difieren para tejidos específicos.

Ante estos resultados y teniendo en cuenta que la sobreexpresión de miRNAs hallada en sangre de cordón umbilical no es reproducible intraútero en la práctica clínica, concluimos que la investigación futura debería centrarse en los perfiles de miRNAs en sangre materna directamente.

No obstante, nuestro trabajo ha permitido no solo poner en evidencia los cambios moleculares que se producen en la restricción de crecimiento tardía sino también comprender de qué manera muchas de las afecciones del adulto tienen su origen en la vida intrauterina.

ABSTRACT

Chronic foetal hypoxia is the cause of many neurocognitive abnormalities with severe adult repercussions. Many of the diseases have their origin in undiagnosed foetal hypoxia during gestation. At present there is no precise technique to distinguish which foetuses are suffering from hypoxia at the end of gestation. Fetal Doppler and fetal biometry only allow suspicion of chronic hypoxic damage when neurological damage is already established. The ability to detect such abnormalities with molecular biology biomarker techniques would be an invaluable tool for the prevention of perinatal damage.

This research project aimed to detect biomarkers (micro-RNA) of foetal neurological damage in maternal blood. For this purpose, umbilical cord and maternal blood samples obtained after birth were studied from two study population groups: gestations with late fetal growth restriction (FGR) and gestations with normal growth.

Firstly, a genetic sequencing process was carried out on 25 samples (16 normal growth / 9 RCF-late growth) of umbilical cord blood to assess the micro-RNAs (miRNAs) that were differentially expressed. Subsequently, these results were validated by PCR technique in 48 samples (24 normal growth/ 24 late RCF).

Analysis of the validation results showed significant overexpression in the late FGR group of miRNAs: miRNA-25-3p, miRNA-132-3p and miRNA-185-5p.

Once these results were obtained, an analysis of the FGR-related pathways and gene ontology described in the literature in which these miRNAs are involved was performed, which revealed an overrepresentation mainly of certain molecular pathways associated with cardiac development, angiogenesis and neuronal death. In addition, we found a novel synergistic action of miRNAs (miR-185-5p and miR-25-3p) in cholesterol metabolism, which is of great importance in foetal development.

On the other hand, an association of these miRNAs with clinical and ultrasound parameters was also performed, so that we could use them in prognostic/therapeutic algorithms. Most of the cases with miR-132-3p overexpression presented low body weight centiles; miR-185-5p overexpression is inversely correlated with fetal Doppler (CPR MoM), so its fundamental role would be related to the response to hypoxia.

We then searched for these miRNAs in the maternal blood samples paired with those of the umbilical cord previously analysed, but did not find the differential profile observed in foetal blood, and therefore, At least in our study, we conclude that these miRNAs are not significantly transmitted across the placenta and that this could be due, among other hypotheses, to the fact that placental dysfunction in FGR may attenuate the biogenesis of miRNAs, and their subsequent release into the plasma and/or that miRNA expression patterns differ for specific tissues.

Given these results and taking into account that the overexpression of miRNAs found in cord blood is not reproducible in utero in clinical practice, we conclude that future research should focus on miRNA profiles in maternal blood directly.

Nevertheless, our study has allowed us not only to highlight the molecular changes that occur in late growth restriction but also to understand how many of the adult conditions have their origin in intrauterine life.

ABREVIATURAS

ABCG4: *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 4*

ARNm: *ARN mensajero*

DV: *Ductus Venoso*

FDR: *False Discovery Rate (tasa de descubrimiento falso)*

GO: *Ontología Génica*

HIF: *Hipoxia inducible factor (Factor inducible por hipoxia)*

IAo: *Istmo Aórtico*

IP: *índice de Pulsatilidad*

ICP: *Índice cerebro-placentario /CPR: cerebro-placenta ratio*

IP A umb: *Índice de Pulsatilidad Arteria Umbilical*

IP AU: *Índice de Pulsatilidad Arteria Uterina*

IP ACM: *Índice de Pulsatilidad Arteria Cerebral Media*

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto)*

miRBase: *MicroRNA database (base de datos de micro-RNAs)*

miRNA: *Micro-RNA*

PEG: *Pequeño para la edad gestacional*

PFE: *Peso fetal estimado*

PNA: *Peso al nacer*

RCF: *Restricción de crecimiento fetal/*

RCIU: *Restricción de crecimiento intrauterino*

RISC: *RNA-induced silencing complex (Complejo de silenciamiento inducido por ARN)*

SREBF2: *Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2*

TF: *Transcription factors (factores de transcripción)*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características de las dos entidades: RCIU temprano y tardío. (Pág. 19)
- Figura 2.** Imágenes de ecocardiografías fetales de cuatro cámaras que ilustran tres fenotipos cardíacos de restricción del crecimiento fetal. (Pág. 22)
- Figura 3.** Biogénesis de miRNA. (Pág. 30)
- Figura 4.** Datos recolectados en cada paciente. (Pág. 51)
- Figura 5.** Diagrama de volcán que muestra la sobreexpresión de miRNA en los fetos RCF Tardío. (Pág. 59)
- Figura 6.** Mapa de calor con la agrupación jerárquica de miRNAs expresados diferencialmente en fetos con RCF de aparición tardía. (Pág. 61)
- Figura 7.** Niveles de expresión relativa de los miRNAs 25-3p, 132-3p y 185-5p. (Pág. 68)
- Figura 8.** Red de interacción de miRNAs desregulados incluyendo sus genes diana y la transcripción. (Pág. 71)
- Figura 9.** Análisis funcional e identificación de módulos reguladores. (Pág. 75)
- Figura 10.** Triplex de ARN formados por miRNAs desregulados y genes diana de fuerte evidencia. (Pág. 76)
- Figura 11.** Box plot que muestra la expresión de miR-132 en fetos normales y en fetos afectados por la restricción del crecimiento de aparición tardía. (Pág. 78)
- Figura 12.** Valores dispersos de la población de estudio representados según la relación cerebroplacentaria múltiplo de la mediana (CPR MoM) y la expresión de miR-132 (2-ddCt). (Pág. 79)
- Figura 13.** Valores dispersos de la población de estudio representados según el centil de peso al nacer (BW) y la expresión de miR-132 (2-ddCt). (Pág. 80)
- Figura 14.** Box plot que muestra la expresión de miR-185-5p en los fetos con RCF y crecimiento normal. (Pág. 82)
- Figura 15.** Diagrama de dispersión que representa la correlación entre la expresión de miR-185-5p y la CPR MoM. (Pág. 84)
- Figura 16.** Red de dianas-factores de transcripción de miRNAs. (Pág. 85)
- Figura 17.** Expresión de miR-25, miR-132 y miR-185 en sangre materna en fetos normales y en fetos afectados con RCF tardío. (Pág. 89)
- Figura 18.** Comparación de la expresión de miR-25, miR-132 y miR-185 en fetos normales y en fetos afectados de RCF tardío. (Pág. 90)
-

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Expresión diferencial de miRNAs entre fetos con RCF y normales. (Pág. 60)

Tabla 2.1 Estadísticas descriptivas de los dos grupos estudiados: fetos normales y RCF. (Pág. 63)

Tabla 2.2. Estadística descriptiva por cada grupo. (Pág. 64)

Tabla 3. Vías KEGG seleccionadas reguladas por miRNAs miR-25-3p y miR-148b-3p expresados diferencialmente en fetos con RCF frente a fetos normales. (Pág. 66)

Tabla 4. Estadística descriptiva de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los niveles de expresión de los miRNAs en los dos grupos de estudio. (Pág. 68)

Tabla 5. Descripción de la población estudiada en la validación de las muestras por RT-PCR. (Pág. 70)

Tabla 6. Vías más significativamente enriquecidas de Kegg 2021 humano y Reactome. 2016 clasificadas por valor p ajustado, basadas en una red de objetivos genéticos de miRNA desregulados. (Pág. 73)

Tabla 7. Precisión de varios modelos para la predicción del compromiso fetal intraparto en relación con miR-132. (Pág. 81)

Tabla 8. Modelo de regresión multivariable lineal para la predicción de expresión de miR-185-5P. (Pág. 83)

Tabla 9. Expresión diferencial de miRNAs entre fetos con RCF y normales. (Página 86)

Tabla 10. Estadística descriptiva de las 30 muestras de sangre materna validadas por RT-PCR. (Pág. 88)

1. Introducción

1.1 HIPÓTESIS DE BARKER

El entorno intrauterino ha sido implicado como un factor importante que afecta al desarrollo de múltiples enfermedades. David Barker, un epidemiólogo británico, publicó en 1990 la teoría que desde entonces se conoce como "la hipótesis de Barker" sobre la programación fetal: "The Fetal and Infant Origins of Adult Disease"[1].

Los estudios de Barker y col.[2] [3]; en la década de 1980, establecieron que la prevalencia de algunas enfermedades en el adulto, como aterosclerosis, hipertensión arterial (HTA), accidente cerebrovascular, diabetes *mellitus* tipo 2 y dislipidemias, se relacionaban con el ambiente intrauterino

Dicha teoría surgió de sus investigaciones cuando observó que había mayores tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en las regiones de Inglaterra y Gales con mayores tasas de mortalidad infantil y que las muertes neonatales también estaban relacionadas con el bajo peso al nacer y que a su vez, era más común en zonas donde la nutrición materna era deficiente y la mortalidad materna era elevada.

Además, los estudios de seguimiento de adultos de los que se disponía de datos sobre el nacimiento y la primera infancia mostraron que aquellos que habían pesado más al nacer y habían recibido lactancia materna al año de vida tenían tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular menores[2]. También demostró un mayor riesgo de hipertensión en la edad adulta en hombres y mujeres que habían nacido con pesos bajos al nacer y con placentas grandes. Esta diferencia entre el tamaño de la placenta y el del feto provocaba una adaptación circulatoria en el feto, una alteración de la estructura arterial en el niño y una hipertensión en el adulto.

Barker llegó a la conclusión de que esta discordancia podía utilizarse como marcador de la *restricción del crecimiento fetal* [3]. Estas correlaciones son las que le llevaron a considerar por primera vez que la programación de las enfermedades en el adulto comenzaría intraútero, durante el desarrollo fetal.

1.2. PROGRAMACIÓN FETAL

Nos referimos al término “programación fetal” a los cambios estructurales, funcionales y metabólicos que se producen en el feto como respuesta adaptativa a un entorno adverso o subóptimo que persisten en la vida postnatal, y que conlleva un mayor riesgo de enfermedad en la edad adulta, tales como, enfermedades cardiovasculares, metabólicas, neurológicas y enfermedades endocrinológicas.

En términos evolutivos, dicho fenómeno, es probable que refleje los beneficios de la plasticidad durante el desarrollo temprano [4] que son beneficiosos durante el periodo intrauterino porque adaptan al feto a las necesidades actuales, pero pueden resultar perjudiciales al final y provocar el desarrollo de enfermedades crónicas con repercusión en la vida adulta.

La plasticidad del desarrollo requiere una modulación estable de la expresión génica, que parece estar mediada, al menos en parte, por procesos epigenéticos como la metilación del ADN, microRNAs y la modificación de las histonas. Así, tanto el genoma como el epigenoma influyen de forma interactiva en el fenotipo y determinan la sensibilidad a factores ambientales, el consiguiente riesgo de enfermedad y lo que es más importante aún es que pueden transmitirse a las siguientes generaciones[5][6].

1.3. RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO FETAL

La restricción de crecimiento fetal es una condición que se produce cuando el feto falla en su objetivo de alcanzar su potencial genético [7].

La restricción de crecimiento fetal (RCF) se asocia con un incremento de la morbilidad y mortalidad perinatal [8][9]

Existen diversas causas de restricción de crecimiento. En algunos casos esta se debe a enfermedades genéticas, malformaciones o alteraciones cromosómicas [10] y el pronóstico está condicionado por las manifestaciones fenotípicas de dichas enfermedades. No obstante, en la mayoría de las ocasiones se debe a la existencia de una disfunción placentaria o a un funcionamiento placentario subóptimo.

La restricción de crecimiento implica un crecimiento por debajo de los percentiles normales (peso fetal estimado (PFE) por debajo del percentil 10) pero hay que distinguirla del concepto “pequeño para edad gestacional” (PEG) en el que un feto normal crece por debajo de dicho percentil sin presentar alteraciones hemodinámicas [10]; aunque recientemente se ha observado que presentan peor pronóstico con mayor riesgo de complicaciones perinatales que los fetos adecuados a edad gestacional [11]. La mejor manera de realizar dicha distinción es estudiar hemodinámicamente al feto afectado: una alteración hemodinámica condiciona el diagnóstico de restricción de crecimiento y un peor pronóstico.

Solo existe una excepción a este concepto y es cuando el feto crece por debajo del percentil 3 [11], ya que un peso estimado excesivamente bajo también implica englobarlo dentro de la definición de restricción de crecimiento fetal.

Por lo que el riesgo de resultados adversos mayores es particularmente marcada en el subgrupo de peso al nacer < 3^{er} percentil y aquellos con redistribución de circulación fetal evaluada mediante Doppler color con aumento del índice de pulsatilidad (IP) en la arteria umbilical (UA) > percentil 95, IP disminuido en la arteria cerebral media (ACM) < percentil 5, IP disminuido en el índice cerebro-placentario (ICP) < percentil 5 y líquido amniótico disminuido.

En el modelo más aceptado de progresión hemodinámica existe un aumento inicial de la resistencia en la arteria umbilical (AU) seguido de una vasodilatación en la arteria cerebral media (ACM) (preservación del cerebro o brain sparing), un aumento de resistencia e inversión del flujo en el Istmo Aórtico (IAo) y finalmente un aumento de resistencia en las venas precordiales, en especial en el Ductus Venosus (DV) con onda a ausente o reversa[12].

Si expresamos estos parámetros hemodinámicos en forma de intervalo al parto o a la muerte fetal, existe una progresión temporal que sería aproximadamente de 4 semanas hasta el parto para el Doppler de la AU, 3 semanas para el Doppler de la ACM, 2 semanas para el Doppler del IAo y 1 semana para el Doppler del DV [13].

1.4 CLASIFICACIÓN DE LA RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO FETAL

Se deben diferenciar dos entidades dentro de la restricción de crecimiento fetal, la de inicio temprano y la de inicio tardío. (Figura 1).

Esta clasificación no solo incluye la edad gestacional de aparición, sino que también, está determinada por dos mecanismos fisiopatológicos diferentes:

RCF de inicio temprano

Esta entidad representa un 20-30% de las RCF y se caracteriza por su edad gestacional de aparición, antes de las 32 semanas.

Destacan dos principales agrupaciones de causas:

- infección, anomalías cromosómicas o genéticas intrínsecos del feto.
- insuficiencia placentaria severa.

Se asocian a preeclampsia hasta en 50% como consecuencia de una disminución total del área de las vellosidades coriales. En estos casos el Doppler umbilical presenta muy buena sensibilidad siendo útil para su diagnóstico y monitorización. Es más frecuente que exista una alteración inicial del Doppler umbilical con una afectación del peso que da lugar a posteriores alteraciones hemodinámicas, con un deterioro progresivo (aumento inicial de la resistencia en la AU —-vasodilatación de ACM—- aumento de resistencia e inversión del flujo IAo—- aumento de resistencia en DV con onda a ausente o reversa [12].

Son casos severos con mal pronóstico debido a la prematuridad asociada, y por lo tanto, el desafío es la monitorización y decisión de cuándo finalizar la gestación, equilibrando mortalidad versus prematuridad.

RCF de inicio tardío

En estos casos la edad gestacional de su diagnóstico es más allá de las 32 semanas de edad gestacional y representan el 70–80% de las RCF. Su asociación con preeclampsia es baja (10 %), tienen habitualmente su origen en una insuficiencia placentaria leve y en este subgrupo el Doppler umbilical tiene una sensibilidad baja (<30%) y habitualmente es normal, mientras que lo más común es que presenten vasodilatación cerebral [14]; esto explica una de las particularidades de la restricción de crecimiento de inicio tardío: que podamos

encontrar fetos con un peso normal, pero con vasodilatación cerebral que presentan mayor riesgo de daño neurocognitivo.

Esta entidad está asociada a muertes perinatales cercanas al término por su baja tolerancia a la hipoxia.

Están asociados a mayor morbilidad, en especial metabólica y neurológica en la vida adulta y el principal desafío que presentan en su diagnóstico ya que pueden pasar clínicamente desapercibidos.

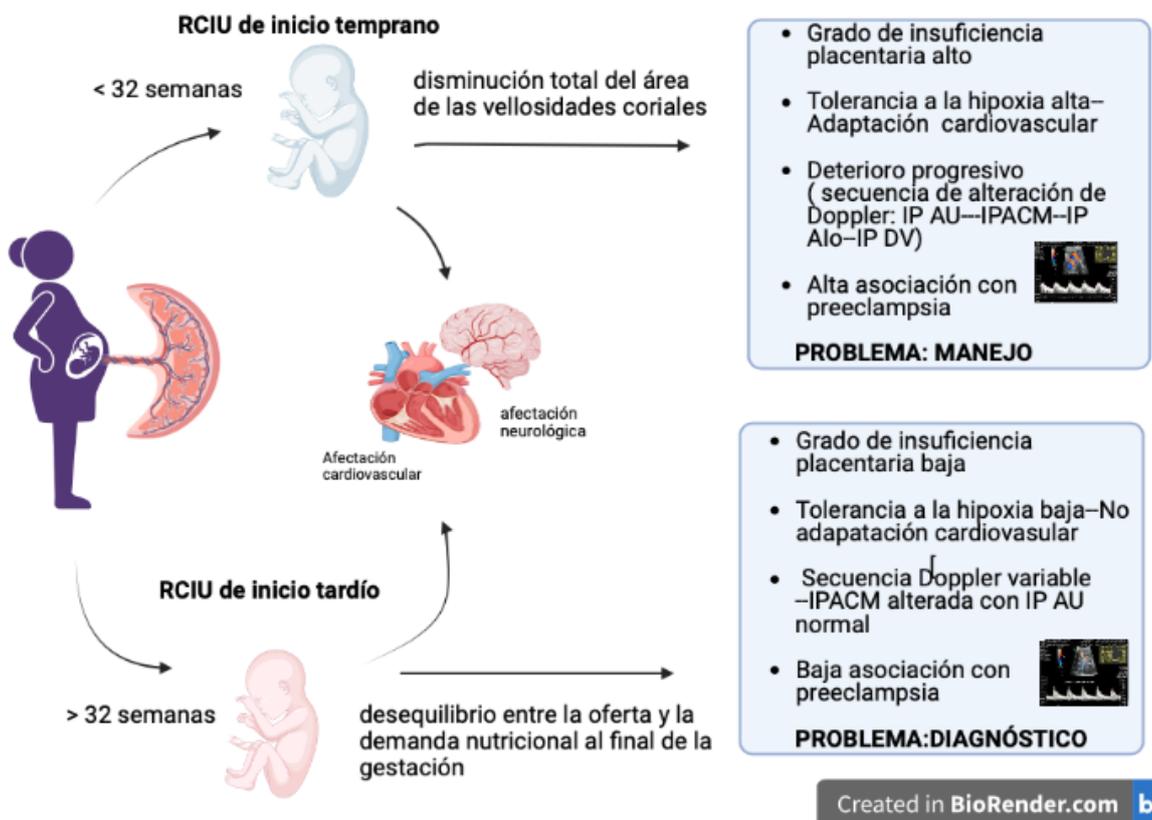


Figura 1. Características de RCIU temprano y tardío.

1.5. DIAGNÓSTICO RCF DE INICIO TARDÍO: UN DESAFÍO

El concepto de RCF de inicio tardío se empezó a conceptualizar al ver que algunos fetos pequeños al final de la gestación presentaban un Doppler cerebral anormal pese a tener un Doppler umbilical normal, presentando un peor desenlace perinatal[15][16][17]. Por ello, en la población total de fetos pequeños se observaba que existían 2 subgrupos: un grupo de fetos con anomalías del Doppler umbilical, sobre todo por debajo de las 32 semanas, con un pico en la semana 27 y otro grupo de fetos sobre todo de >32 semanas frecuentemente sin anomalías el Doppler umbilical pero que presentaban anomalías del Doppler cerebral o del índice cerebroplacentario (ICP)[15].Lo que era aún más llamativo es que estas anomalías del Doppler cerebral o del ICP iban en aumento a partir de la semana 34, pese a mantenerse la normalidad en el Doppler umbilical y uterino[18].

En la actualidad las herramientas que tenemos, para la detección de hipoxia fetal al final del embarazo solo permiten sospechar la existencia de daño hipóxico crónico pero no disponemos de herramientas diagnósticas precisas para la predicción de la RCF tardía ni sus potenciales daños.

El cribado en el primer trimestre con la velocimetría Doppler uterina, los marcadores bioquímicos (factores angiogénicos) y las características maternas presentan una tasa de detección débil para restricción del crecimiento tanto de inicio temprano (40 %) como de inicio tardío (32%) cuando no están asociados a preeclampsia [19].

En el segundo trimestre, una combinación de biometría fetal, peso fetal estimado (PFE) <10º centil, y velocimetría Doppler uterina anormal o índice cerebroplacentario (ICP) (que combina los índices de pulsatilidad de la arteria cerebral media [ACM]) sólo detectó un 20,1% de RCF tardía para un 25% de falsos positivos [18].

Existe un considerable conjunto de pruebas que demuestran que la velocimetría de la AU no refleja de forma fiable la insuficiencia placentaria y no predice de forma fiable el resultado adverso en la RCF de inicio tardío [18][20][21].

Resulta intrigante que, mientras que la mayoría de los casos de RCF de inicio tardío presentan signos histológicos de infraperfusión placentaria (principalmente oclusión vascular, inflamación e hipoplasia vellositaria)[22],esto no se refleja en el Doppler de la AU; lo que probablemente esté relacionado con el grado de extensión. Esto se ha demostrado en los modelos experimentales animales[23] y matemáticos[24][25] de obliteración de los vasos de

la placenta han sugerido que el Doppler de la AU se altera sólo si se ve afectada una parte extensa de la placenta.

Por lo tanto, dado que la velocimetría de la AU no es un parámetro sensible para detectar formas tardías de RCF, otras medidas Doppler se han estudiado para reflejar la adaptación fetal a la insuficiencia placentaria.

El uso del Doppler de la ACM en este contexto está respaldado por estudios recientes que han demostrado que entre el 15 y el 20% de los fetos PEG a término con Doppler de la AU normal tienen una impedancia reducida en el flujo sanguíneo de la ACM, y que este signo se asocia a un peor resultado perinatal[14][16][26], a un peor comportamiento neurológico, tanto al nacer como a los 2 años de edad [27].

Además, se ha demostrado que el ICP, es más sensible a la hipoxia que sus componentes individuales [28] y se correlaciona mejor con el resultado adverso (sufrimiento fetal intraparto, parto por cesárea de emergencia e ingreso en la unidad de cuidados intensivos) [29][30][17][31].

1.6 CONSECUENCIAS DE LA RCF DE INICIO TARDÍO

• *Afectación cardiovascular*

La insuficiencia placentaria tiene dos efectos directos en el desarrollo cardiovascular del feto. En primer lugar, la reducción del suministro de oxígeno y nutrientes puede alterar el crecimiento de los cardiomiocitos y la arquitectura de las fibras. En segundo lugar, la hipoplasia/trombosis de las vellosidades conduce a un aumento de la resistencia placentaria y a una poscarga cardíaca crónica.

En consecuencia, el miocardio en desarrollo sufre una serie de cambios en la macro y microestructura y en la función cardíaca, para mantener el gasto ventricular, fenómeno conocido como remodelación cardíaca, el cual, persiste en la vida postnatal, desde el periodo neonatal hasta la adolescencia, predisponiendo un mayor riesgo cardiovascular posterior [32].

Inicialmente, el corazón desarrolla una forma más esférica que permite mantener el volumen sistólico con menos fuerza de contracción, al tiempo que reduce la tensión de la pared para tolerar mejor la sobrecarga de presión [33]. Esto puede ocurrir en un ventrículo que determinará un fenotipo "alargado", en el que un ventrículo derecho globular empuja el

tabique y alarga el ventrículo izquierdo, o en ambos ventrículos que determinará un fenotipo "globular".

En los casos más graves y/o prolongados, el aumento de la esfericidad puede no ser suficiente, por lo que se desarrolla una hipertrofia para aumentar la contractilidad y disminuir la tensión local de la pared. Así, la cardiomegalia es un cambio característico, con tres fenotipos diferentes alargado, globular e hipertrófico que sugieren una progresión de la gravedad. (Figura 2)

Todas las formas clínicas de RCF mencionadas están asociadas a la programación y remodelación cardiovascular[34][35][36]. La RCF de inicio temprano está más asociada a una respuesta hipertrófica, mientras que los fenotipos cardíacos de inicio tardío suelen desarrollarse de forma globular o alargada. En un estudio descriptivo de *Rodriguez- Lopez y col* [37] las adaptaciones cardíacas más frecuentes observadas en fetos con RCF tardío fueron los fenotipos globular (54%) y alargado (29%), caracterizados por una geometría más esférica que afecta a ambos ventrículos y por un ventrículo izquierdo no esférico, respectivamente.

Estos fetos presentaban signos leves de insuficiencia placentaria y un resultado perinatal ligeramente peor en comparación con fetos de crecimiento normal.

Estos cambios cardíacos serían consecuencia de la insuficiencia placentaria leve que provoca una hipoxia fetal sutil, desnutrición y sobrecarga de presión durante las últimas semanas del embarazo[37][38].

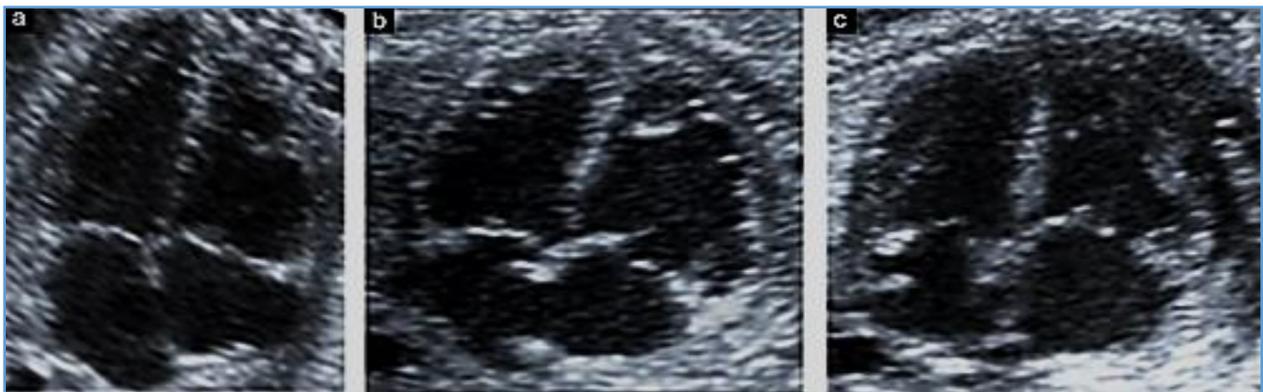


Figura 2. Imágenes de ecocardiografías fetales de cuatro cámaras que ilustran tres fenotipos cardíacos de restricción del crecimiento fetal: (a) alargado; (b) globular; y (c) hipertrófico[37].

• *Afectación metabólica*

El estado metabólico desfavorable, producto de la restricción de crecimiento intraútero es evidente en los niños, mucho antes de que se desarrollen las morbilidades, y que el patrón de crecimiento y aumento de peso después del nacimiento es un determinante clave del futuro estado de salud.

Es sabido que los individuos que han sufrido restricción de crecimiento presentan un riesgo considerablemente mayor de padecer diabetes mellitus de tipo 2, síndrome metabólico, reducción persistente de la estatura y, posiblemente, los cambios en el patrón de la pubertad[39]. Las respuestas adaptativas dan lugar al desarrollo de un "fenotipo ahorrador" en el que se produce una disminución relativa del crecimiento corporal general y del crecimiento de órganos como el intestino y el hígado, mientras que se produce un ahorro diferencial en el crecimiento de órganos clave como el cerebro y el corazón. Al nacer, tienen bajas concentraciones de insulina y de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1). A las 48 horas del nacimiento, son más sensibles a la insulina y tienen un alto nivel de ácidos grasos no esterificados en el plasma; a continuación, experimentan un periodo de crecimiento postnatal acelerado que se asocia a una mayor sensibilidad a la insulina. Este periodo temprano de mayor sensibilidad a la insulina y de crecimiento acelerado precede a la posterior aparición de la resistencia a la insulina en la vida adulta [40].

Se ha propuesto la programación a lo largo de la vida del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal como mecanismo para explicar la asociación entre los bebés con bajo peso al nacer y el posterior desarrollo de síndrome metabólico e hipertensión en la edad adulta.

Un estudio sugiere que el aumento de los niveles de cortisol debido a alteraciones en la regulación del eje ACTH/gluocorticoide puede ser un mecanismo mediador[41]. De hecho, los bebés nacidos después de una exposición significativa a condiciones estresantes suelen tener peso bajo al nacimiento y tienen respuestas del eje HPA atenuadas a los factores estresantes en comparación con los bebés con peso adecuado para la edad gestacional. Estos hallazgos son coherentes con los modelos animales que muestran que las condiciones intrauterinas adversas pueden dar lugar a respuestas de cortisol atenuadas a factores estresantes agudos y pueden proporcionar un mecanismo de susceptibilidad a la enfermedad en la edad adulta para los individuos que son PEG al nacer [42].

• *Afectación neurológica*

Las consecuencias del neurodesarrollo de la RCF están relacionadas con la gravedad, el momento en que se inició durante el período prenatal y la edad gestacional en el momento del parto[43].

En el primer trimestre, las actividades individuales, como el tono y la respiración, se producen de forma aleatoria. Hacia las 20 semanas, surge la variación diurna de los patrones de movimiento fetal y de la frecuencia cardíaca, con una mayor actividad en la segunda mitad del día[44] y los ciclos de descanso-actividad se establecen entre las semanas 26 y 28 [45][46]. La reactividad de la frecuencia cardíaca fetal en respuesta al movimiento, plenamente establecida a las 32 semanas de gestación, permite correlacionar los patrones de frecuencia cardíaca con los estados de comportamiento. En este momento, también existe una integración del control conductual y cardiovascular que permite la modulación de los lechos vasculares individuales durante los diferentes estados conductuales[47][48]. Los factores que regulan esta maduración neuronal incluyen el suministro suficiente de nutrientes, así como las interacciones inmunológicas y endocrinas entre la placenta y el feto[49] .

La RCF de inicio temprano se asocia a un retraso de los hitos del neurodesarrollo [50][51].El establecimiento del estado conductual y la reactividad del ritmo cardíaco pueden retrasarse hasta 4 semanas.

Por el contrario, la RCF tardía se produce después del establecimiento de los estados conductuales y, por lo tanto, es más probable que dé lugar a una calidad de movimiento y transiciones de estado anormales[52][53][54].

Durante la hipoxia crónica prenatal, el flujo sanguíneo fetal se redirige de forma selectiva al cerebro, fenómeno conocido como “brain sparing”, para maximizar el suministro de oxígeno y nutrientes[55]. Aunque el mecanismo de preservación del cerebro se ha considerado inicialmente protector, varios estudios demuestran que los fetos con vasodilatación cerebral, diagnosticados mediante ecografía Doppler, tienen peores resultados en el desarrollo neurológico en comparación con aquellos que no presentan vasodilatación cerebral[56][57][58][59].Esto podría explicarse, debido a que en el caso de la redistribución del flujo sanguíneo, la mejora de la perfusión cerebral no es uniforme, sino que se dirige preferentemente a los ganglios basales, dejando otras áreas cerebrales desprovistas de Oxígeno, por ejemplo, el lóbulo frontal, favoreciendo una discapacidad neuroconductual [60].

Otras alteraciones como la reducción del volumen cerebral total, del volumen y la estructura cortical, y del número total de células, así como, los déficits de mielinización han sido relacionadas directamente con la RCF. La conectividad cerebral también se ve afectada, lo que se evidencia en los déficits de migración neuronal, la reducción de los procesos dendríticos y las redes menos eficientes con la disminución de las conexiones de largo alcance.

Todos estos cambios fueron demostrado gracias a los estudios de RMN postnatales, donde se observaron diferencias significativas en las medidas de la ínsula, cuerpo caloso, tronco de encéfalo y valores disminuidos del cociente N-acetil-aspartato/colina, valores aumentados del cociente colina/creatina y del myoinositol en fetos con alteración del flujo cerebral y bajo peso al nacer [61][62][63][64]. Tras estas alteraciones estructurales, se han descrito consecuencias funcionales a corto y largo plazo en niños en edad escolar, que incluyen con mayor frecuencia problemas en las habilidades motoras, la cognición, la memoria y disfunciones neuropsicológicas [65][66][67][68][69].

En un estudio donde se realizó un seguimiento neurológico de 83 lactantes de la misma cohorte a los 2 años de edad se observó que los resultados sobre el neurodesarrollo (escala de Bayley) fueron significativamente peores en los nacimientos con hipoperfusión placentaria (en relación con los lactantes PEG sin estos signos) para los 3 dominios de la escala de Bayley: cognitivo, lenguaje y motor[70].

Por otro lado, otro estudio [71]demostró peores competencias neuroconductuales, en una cohorte de bebés PEG a término sin signos de insuficiencia placentaria, lo que sugiere un retraso en la maduración neurológica, aún en aquellos en los que no se ha llegado a alterar los parámetros de Doppler.

El estudio DIGITAT encontró que el peso al nacer por debajo del percentil 3 es el factor predictivo más fuerte para el neurodesarrollo anormal en fetos nacidos entre las 36-41 semanas. Concluyen que la conducta expectante podría deteriorar el peso al nacer y el neurodesarrollo a los 2 años de edad [72].

En un estudio muy reciente [73] que se ha realizado un seguimiento hasta los 6 años de edad, ha demostrado una mayor tasa de retraso en el neurodesarrollo (57,1%) en fetos con restricción de crecimiento concretamente en las habilidades motoras y comunicativas. Las habilidades cognitivas se han conservado en la mayoría de los casos, con una baja tasa de retraso (17,1%). La edad gestacional en el momento del parto, el percentil de ACM se ha asociado con el cociente de desarrollo global, de forma que una mayor edad gestacional en el momento del parto y un mayor percentil de ACM se relacionan con mejores cocientes.

Lo cierto es que, a pesar de todos los estudios que demuestran afectación del neurodesarrollo se ha observado mucha heterogeneidad entre los resultados. Esto puede ser debido a la gran variedad tanto de pruebas específicas como de edades de evaluación, y a la falta de control de los factores de confusión.

Desde el punto de vista clínico, dada la alta prevalencia de fetos pequeños de aparición tardía y su impacto en el neurodesarrollo, la detección temprana mediante marcadores prenatales de aquellos fetos pequeños con mayor riesgo de un neurodesarrollo subóptimo es un objetivo crítico para poner en marcha estrategias como la planificación del parto, la promoción de la lactancia materna y las intervenciones educativas tempranas.

1.7. EPIGENÉTICA Y MECANISMOS EPIGENÉTICOS

La "epigenética" se refiere al estudio de las modificaciones que afectan directamente a la expresión de los genes, sin cambiar la secuencia del ADN y que son consecuencia de la exposición a factores medioambientales [74].

Las modificaciones epigenéticas del ADN inducidas por el desarrollo suelen ser estables durante las divisiones celulares mitóticas que continúan durante toda la vida.

Se han descritos tres principales mecanismos epigenéticos: metilación del ADN, modificación de las histonas y microRNAs. A lo largo de los últimos años han sido objeto de estudio debido a que se observó que algunas de estas modificaciones epigenéticas son transmisibles, como lo son algunos patrones de metilación, de una generación a otra mientras que otras no [74]. Por otro lado, las modificaciones epigenéticas pueden ser moduladas por numerosas condiciones fisiológicas, patológicas y ambientales.

▪ **Metilación del ADN**

La metilación del ADN consiste en la adición de grupos metilo al carbono 5' en los lugares de unión a la base Citosina en los dinucleótidos CpG del ADN y usualmente se asocia con silenciamiento genético [75]. Las regiones metiladas sufren una condensación del ADN conducente al silenciamiento de los genes en ellas incluidos, mientras que las no metiladas son accesibles a los factores y enzimas de transcripción, quedando en condiciones de expresión [75].

▪ **Modificación de las histonas**

Dentro de un nucleosoma, cada una de las histonas, altamente conservadas, contiene un dominio globular estructurado, que interactúa con las otras histonas y el ADN. Al igual que el ADN, las histonas también pueden recibir radicales metílicos, a lo que se unen otras modificaciones (metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, biotinilación, sumoilación e isomerización de la prolina), éstas alteran la estructura de los nucleosomas, contribuyendo a una mayor o menor compactación de la cromatina, permitiendo así, el acceso o no de los factores y/o enzimas de transcripción necesarios para la expresión genética

[75]. Por ejemplo, los residuos de histona pueden modificarse de manera que promuevan la transcripción o el silenciamiento, como en el caso de H3K9, que puede ser trimetilado (para promover la represión génica) o acetilado (para promover la transcripción activa). Debido a que las distintas modificaciones de las histonas se correlacionan con estados transcripcionales específicos, se ha desarrollado la hipótesis de código histona. Esto sugiere que los patrones específicos de modificaciones se leerían como un código de barras molecular para reclutar la maquinaria celular que produce un estado distinto de la cromatina [76].

▪ Sistema de ARN no codificante

Los ARN no codificante (ARNnc) son una familia de ARN que no codifican proteínas funcionales, pero que participan en mecanismos reguladores y de mantenimiento fundamentales [77]. Los ARNnc se dividen en dos categorías principales, basadas en el tamaño:

- ARNs no codificantes de cadena corta (sncRNAs, incluyendo siRNAs, miRNAs, y piRNAs) cuando son más cortos de 200 nucleótidos;
- ARN no codificantes de cadena larga (lncRNAs, incluyendo lincRNAs, ilncRNAs, y eRNAs) cuando son más largos de 200 nucleótidos.

Muchos de estos transcritos son necesarios para la correcta orientación de los complejos modificadores de las histonas o participan en el proceso de metilación del ADN y en la impronta genómica. Los miRNAs constituyen una clase dominante de pequeños ARNs en la mayoría de los tejidos somáticos.

Se trata de pequeños transcritos no codificantes (de 19 a 25 nucleótidos de longitud), cuya principal función es la de regular la expresión génica uniéndose a los ARNm diana, dirigiéndolos a la degradación o evitando su traducción [78].

Se han descrito más de 1.000 micro-ARN, que se codifican en las regiones intergénicas o en los exones o intrones de genes codificantes de proteínas.

1.8. BIOGENESIS DE MIRNAS

La biogénesis de los miRNAs representa una serie de procesos secuenciales para generar miRNAs maduros. El mi-ARN se sintetiza como un largo transcrito en el núcleo por la ARN polimerasa II o III generándose miRNA primarios (pri-miRNA), que forman una estructura secundaria de 50-120 nt en forma de horquilla. Estos pri-miRNAs se escinden dentro del núcleo por un complejo multiproteico denominado DCRC8 (Drosha and DiGeorge syndrome critical region gene 8) también llamado Pasha, dando lugar al pre-miRNA que es exportado desde el núcleo al citoplasma por la Exportina-5. En el citoplasma, el Dicer (una ribonucleasa miembro de la familia de las RNAsaIII) escinde el bucle pre-miRNA en forma de horquilla en dos mi-RNA (miRNA dúplex) de los cuales solo formara un miRNA maduro. Este es incorporado mediante la función de la proteína Argonaute2 (Ago2) en el complejo RISC (RNA induced silencing complex) donde mediante la participación de diversas proteínas TRBP (TAR RNA binding protein), Ago2, GW182, y FMRP (fragile mental retardation protein) guían estos complejos formados hacia ARNm específicos utilizando un emparejamiento de bases imperfecto con el fin de regular a la baja su expresión mediante la desestabilización del ARNm o la represión de la traducción[79][80]. La transcripción es controlada mediante factores que regulan la producción de pri-microRNAs, que a su vez son específicos del tipo celular, del proceso de desarrollo en que se encuentren las células y de la respuesta de las células a diferentes estímulos externos[81]. La biogénesis de los miRNA está regulada a múltiples niveles, entre ellos el de la transcripción de los miRNA; su procesamiento por Drosha y Dicer en el núcleo y el citoplasma, respectivamente; su modificación mediante la edición del ARN, la metilación del ARN, la uridilación y la adenilación; la carga de Argonautas; y la descomposición del ARN. También están surgiendo vías no canónicas para la biogénesis de miRNA, incluidas las que son independientes de Drosha o Dicer [79] (Figura 3).

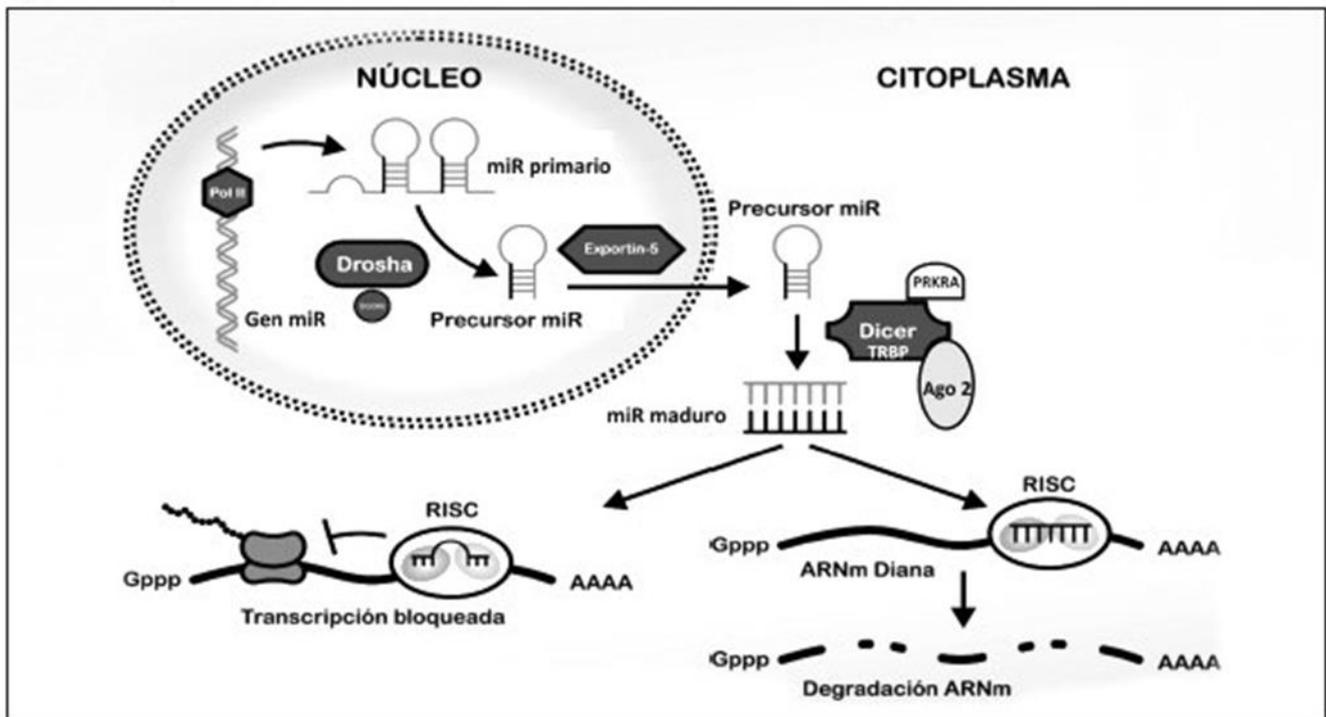


Figura 3. Biogénesis de micro-RNA[82]

1.9 DETECCIÓN DE MIRNAS

Con el creciente interés por los perfiles de miRNA como herramienta de diagnóstico y pronóstico, se han desarrollado varias tecnologías para evaluar y cuantificar la expresión de miRNA. Los métodos actuales de detección de miRNA incluyen la clonación, la hibridación in situ, la micromatriz, la citometría de flujo con perlas, el Northern Blotting, la secuenciación de nueva generación y la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)[78]. Los métodos de detección como la qRT-PCR y el microarray dependen de la suposición de que los métodos de extracción aíslan todos los miRNA por igual.

Hay varios retos que deben tenerse en cuenta cuando se pretende elaborar perfiles de miRNA[78][83]. Por ejemplo, los miRNAs representan < 1% de la masa total de ARN y deben ser detectados selectivamente [84].

Una de las técnicas más convencionales para la detección de miRNA es el Northern Blotting. El Northern Blotting se ha utilizado para la identificación inicial de miRNAs[85].

La técnica incluye una separación electroforética por desnaturalización con gel de urea-poliacrilamida y una transferencia a una membrana de nylon cargada positivamente. El miRNA se hibrida con sondas marcadas que permiten la adquisición de miRNA mediante imágenes. Varios inconvenientes han limitado el uso del Northern Blotting para el perfilado de miRNAs, incluyendo las preocupaciones de seguridad planteadas por el uso de

radioisótopos, la baja sensibilidad, el bajo rendimiento y la alta entrada de ARN requerida (del orden de decenas de ug/muestra).

Las tecnologías más utilizadas para el perfilado de mirRNA incluyen la qPCR, los microarrays y la secuenciación de ARN[86]. La qPCR es quizás el estándar de oro para la detección de miRNAs, ya que es rentable, de alto rendimiento y específica [29].

La introducción de las plataformas de secuenciación de nueva generación ha permitido utilizar un enfoque adicional cuando se pretende elaborar perfiles de miRNA, la secuenciación de ARN (RNA-seq).

Se prepara una biblioteca de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN pequeños, seguida de una secuenciación paralela masiva de las moléculas de ADNc. El análisis bioinformático puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de los miRNA mediante un enfoque digital.

La mayor ventaja de esta tecnología es que permite la identificación de miRNAs ya descritos así como de nuevos, por lo que puede aplicarse para el descubrimiento de miRNAs [87]. Cabe destacar que la RNA-seq permite la identificación precisa de las secuencias de miRNA y puede discriminar entre variantes que difieren por un solo nucleótido[78].

Algunas de las principales limitaciones de RNA-seq para la detección de miRNAs incluyen el coste relativamente alto y la complejidad que conlleva el análisis asociado de la gran cantidad de datos que produce. No obstante, estos inconvenientes se están afrontando a medida que la tecnología madura y las infraestructuras bioinformáticas se hacen más comunes[88].

1.10 PREDICCIÓN DE DIANAS

El desarrollo de miRNAs para fines clínicos-terapéuticos requiere el conocimiento de sus dianas específicas, aunque este campo de investigación está todavía en sus inicios. La correlación de la expresión de los miRNA con la diana de los ARNm se ve dificultada por la naturaleza de los miRNA.

La validación de las dianas de los miRNA se ve dificultada por el hecho de que la alteración de una vía rara vez depende de un solo miRNA, por lo que es difícil definir las funciones de los miRNA in vivo.

➤ *Análisis funcional*

En la actualidad, existen varias bases de datos en línea que proporcionan información relacionada con los miRNAs, incluyendo índices de miRNAs conocidos, secuencias validadas experimentalmente, localizaciones genómicas y expresión de transcripciones de miRNAs en líneas celulares y tejidos. En ellas se registran las anotaciones funcionales entre las que podemos encontrar las siguientes:

- Bases de datos que contienen información relativa sobre miRNAs: miR-Base[89], TargetScan Predicted y Conserved Targets[90].
- Gene Ontology [91] que contiene anotaciones como los procesos biológicos, funciones moleculares o componentes celulares que caracterizan a grupos de genes.
- KEGG [92] presenta redes de interacciones moleculares.

El número de miRNAs publicados no deja de crecer, principalmente por el incremento de la capacidad de análisis que supusieron los experimentos de secuenciación masiva de pequeños RNAs. Actualmente para cada entrada de una secuencia perteneciente a un miRNA miRBase ofrece las referencias principales que describen el descubrimiento, enlaces a las principales fuentes de evidencia que avalan la anotación de dicho miRNA, así como enlaces a las bases de datos de las dianas tanto predichas como validadas para dichos miRNAs.

Para combinar los resultados genómicos procedentes de los experimentos y la información biológica de las bases de datos, se necesitan metodologías para la caracterización

funcional de los resultados de estos análisis, haciendo uso de la información suministrada por las bases de datos.

El caso más sencillo de caracterización funcional sería una descripción de las funciones asociadas a un grupo de genes u otras unidades biológicas. Así por ejemplo, tras consultar alguna base de datos biológicos de interés, resultaría útil conocer las funcionalidades de un grupo de genes que están diferencialmente expresados, sin embargo esta descripción puede ser coincidente con la totalidad de genes que integran el genoma.

1.11 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) es un método computacional que determina si un conjunto de genes definido a priori muestra diferencias estadísticamente significativas y concordantes entre dos estados biológicos[93].

Los análisis de enriquecimiento Incluyen dos etapas:

Etapas 1: se selecciona un grupo de genes (u otras unidades biológicas), considerando algún criterio de interés para el investigador (nivel de expresión diferencial de miRNAs, genes que incluyan mutaciones asociadas a una enfermedad, genes donde se han detectado regiones metiladas, etc)[94].

Etapas 2: las funciones anotadas a estos genes se comparan contra las funciones anotadas a un grupo de genes de referencia (por ejemplo el genoma).

Para cada función, se evaluará estadísticamente (prueba chi-cuadrado, test exacto de Fisher) la proporción de genes con la anotación a esta función en cada una de las dos listas. De este modo será posible detectar una sobrerrepresentación significativa en alguna de las listas, es decir, ese grupo de genes estará enriquecido con la función valorada[94].

Esta tarea se lleva a cabo consultando grandes bases de datos, conocidas como ontologías, las cuales almacenan información biológica funcional a nivel de genes. Cada ontología codifica dicha información en conjuntos de genes, cada uno, asociado a una función, localización, enfermedad particular. Cada conjunto de genes tiene un nombre o descripción del evento, y los genes específicos que se sabe interactúan para llevar a cabo ese evento.

Las Ontologías son especialmente útiles para identificar qué tienen en común un conjunto de genes identificados como:

- Genes diferencialmente expresados entre dos o más condiciones.

- Genes diferencialmente afectados por marcas epigenéticas (ej. estado de la cromatina y metilación del promotor/potenciador).
- Genes o proteínas implicados en procesos patológicos.

Gene Ontology (GO) se trata de una gran base de datos bioinformática que tiene como objetivo estandarizar la representación de los genes y los atributos de sus productos génicos de todas las especies. El proyecto proporciona un vocabulario controlado de términos y anotaciones de productos génicos[95].

El sistema de términos está unificado y es consistente, de manera que cada término aparece solo una vez y se utiliza un diccionario de palabras permitidas, independiente de la especie.

Los términos están relacionados unos con otros de manera jerárquica, desde términos más generales hacia términos más específicos.

Por ejemplo:

Proceso biológico ——— Eventos celulares a los que contribuye el producto génico.

Función molecular ——— Descripción bioquímica del producto génico.

Componente celular——Localización o complejos de los que forma parte el gene o su producto génico[95].

KEGG es un conjunto de base de datos diseñadas para facilitar la comprensión de sistemas biológicos (células, organismos o ecosistemas) a nivel molecular, reuniendo información procedentes de datos de secuenciación y otras tecnologías experimentales de alto rendimiento.

La ontología provista por el KEGG [92] contiene, para cada término o vía metabólica, además de los genes que lo influyen, un diagrama visual que representa el conocimiento experimental sobre el mismo y varias otras funciones que interactúan. Cada diagrama contiene una red de interacciones y reacciones moleculares y está diseñado para vincular los genes del genoma con los productos génicos (principalmente proteínas) de la vía. Esto ha permitido examinar qué vías y funciones asociadas, es probable que estén codificadas en el genoma.

1.12 MIRNAS Y EMBARAZO

En los últimos años, la regulación de los miRNAs se ha estudiado ampliamente por su papel en los procesos biológicos, así como en el desarrollo y la progresión de varias enfermedades humanas[96], incluyendo trastornos de la retina[97], enfermedades neurodegenerativas[98], enfermedades cardiovasculares[99], cáncer[100] y trastornos asociados al embarazo como la preeclampsia [101] y la restricción de crecimiento[102] [103].

El grupo de miRNA C19MC es un grupo de microARN formado por 46 genes. Estos 46 genes codifican 59 miARN maduros[113][114]. Los miRNAs C19MC se expresan casi exclusivamente en la placenta, más precisamente en los trofoblastos. [115][116].

Se ha descrito que la expresión de miRNAs C19MC aumenta desde el primer al tercer trimestre del embarazo en condiciones normales [117]. Curiosamente, el C19MC se expresa desde el cromosoma paterno, mientras que el C14MC, otro gran grupo de miRNAs localizado en el locus del cromosoma 14q32, se expresa desde el cromosoma materno[119][120].

Este último contiene 52 miRNAs, y diferentes estudios han demostrado la importancia de C14MC en la placentación.

Recientemente se ha estudiado activamente el papel de los miRNAs como moduladores epigenéticos de un importante número de procesos biológicos, incluidos los asociados a la regulación del desarrollo normal de la placenta y su disfunción. Hasta ahora, se ha descubierto que más de 500 miRNAs se expresan en la placenta humana[104]

En este sentido, se han identificado clases enteras de miRNAs funcionalmente específicos, en particular, y los miRNAs asociados al estrés oxidativo[105].

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, en consecuencia, el estrés oxidativo (SO) incontrolado pueden desempeñar un papel central en los trastornos de la hemodinámica fetal y el posterior desarrollo de resultados perinatales adversos en los recién nacidos con restricción del crecimiento fetal.

Algunos de los miRNAs asociados con el SO y la disfunción endotelial fueron miR-27a-3p, miR-30b-5p, miR-125b-5p, miR-221-3p, miR-451a y miR-574-3p [106]

La hipoxia regula a la baja miRNAs específicos, sobreexpresando el factor inducible de hipoxia (HIF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y promoviendo la angiogénesis[107].

En la hipoxia temprana, la regulación a la baja de los miRNAs, contribuye a la acumulación de HIF-1, mientras que en la hipoxia crónica la expresión de los miRNAs se

modifica para mantener la función de HIF-1 baja y los niveles de HIF-2 y HIF-3 elevados. Por lo tanto, los miRNAs tienen la capacidad de gobernar el cambio hipóxico de HIF[108][107][109]. Aunque el mecanismo global de la regulación a la baja de los miRNAs durante la hipoxia sigue siendo desconocido, uno de los mecanismos descritos ha sido la inhibición de la proteína DICER[110], una ribonucleasa monomérica crucial para la biogénesis de los miRNAs. Bajo hipoxia su expresión disminuye, por lo que la síntesis de miRNAs inhibidores disminuye y la expresión de VEGF y la angiogénesis aumentan. Por lo tanto, la vía de los miRNAs está funcionalmente integrada en la respuesta celular a la hipoxia modulando la expresión de HIFs, VEGF y el receptor de VEGF (VEGFR).

La expresión de miRNA-210, miRNA-21, miRNA-199a, miRNA-373, miRNA-424 y miRNA-20b está alterada en fetos con hipoxia aguda y crónica[102][111].

Por otro lado, también se han descrito patrones diferenciados con infra expresión de miRNAs típicamente placentarios en tejido placentario en fetos con restricción de crecimiento, como los hsa-miR-518b, hsa-miR-1323, hsa-miR-516b, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-520h, hsa-miR-519d, and hsa-miR-526b [112].

Varios estudios han descrito la expresión de este grupo de miRNAs en preeclampsia. Hromadnikova et al [118] mostraron un aumento en la expresión, más específicamente miR-517-5p, miR-518b y miR-520h en mujeres con preeclampsia frente a mujeres con embarazo normal. Zhang et al. demostraron que un miembro del C19MC, miR-515-5p, se dirige e inhibe la expresión de Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (CYP19A1) y el factor de transcripción específico de corion (GCM1), entre otros genes importantes en la diferenciación del trofoblasto [101]. Además, Xie et al. demostraron que los miRNAs C19MC juegan un papel inhibitorio en la migración del trofoblasto[115]. Probablemente, el aumento de estos últimos está desregulado y puede inducir una inhibición descontrolada de la migración de los trofoblastos.

Lo cierto es que existe mucha heterogeneidad en los estudios que describen miRNAs desregulados en patologías del embarazo. Esto puede ser debido a que cada paciente presenta diferentes factores predisponentes y diferentes tipos o gravedad de la patología, lo que podría ser la posible razón de la regulación inconsistente de ciertos miRNAs durante la patogénesis de estas enfermedades.

- *miRNA y función cerebral*

El desarrollo y la homeostasis del cerebro consisten en una serie de acontecimientos coordinados que dependen del control preciso de la expresión génica. Las células madre neurales (NSC) representan una población de células madre autorrenovables que es esencial para el correcto desarrollo del sistema nervioso central (SNC), así como para la neurogénesis adulta[122][123]. Durante el desarrollo, las NSC primarias se diferencian directamente en neuronas tempranas. Con la transición del tejido nervioso de una a varias capas, se genera una nueva población de NSC que da lugar a las células progenitoras neurales (NPC) que contribuyen a la mayoría de las neuronas del cerebro. En las etapas posteriores del desarrollo, las NSC también generan precursores gliales, células progenitoras de astrocitos y células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) que se diferencian en astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente[124].

En el cerebro adulto, la mayoría de las NSC, que se encuentran en los dos nichos neurogénicos, la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular del ventrículo lateral, participan en la neurogénesis adulta. La generación tanto de nuevas neuronas como de células gliales en el cerebro adulto contribuye a la plasticidad neuronal y, en cierta medida, a la reparación neuronal[125]. Además, cada vez hay más pruebas que indican que el deterioro de la neurogénesis adulta se asocia con algunas enfermedades neurodegenerativas (EN), incluyendo la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Huntington (EH)[126][127].

Diversos reguladores de la transcripción, entre ellos las proteínas SOX, desempeñan importantes funciones durante el desarrollo y la homeostasis del cerebro, empezando por el mantenimiento del tallo, la decisión del destino celular, la coordinación de las fases iniciales de diferenciación hasta la generación de neuronas maduras, astrocitos y oligodendrocitos mielinizantes[128]. Las proteínas reguladoras de SOX muestran propiedades tanto de los factores de transcripción (TF) clásicos como de los componentes arquitectónicos de la cromatina.

Tanto los genes SOX como los miRNAs son componentes reguladores cruciales en la neurogénesis y la plasticidad cerebral que afectan a procesos similares[129][127]. Alrededor del 70% de todos los miRNAs están altamente expresados en el SNC [130] y se revelan amplios cambios en la expresión tanto de los genes SOX como de los miRNAs durante el desarrollo del cerebro[131][128]. Algunos de los genes SOX y miRNAs tienen una expresión específica para la edad[132] y para el género[133] en el cerebro. Los miRNAs y los genes SOX ya son

reconocidos como nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como posibles dianas terapéuticas para diversas patologías[134]. Mucha de la actividad de los miRNA que participan en la función cerebral se localiza en las espinas de las dendritas y en las proteínas que forman las densidades postsinápticas, que son un complejo de proteínas entrelazadas con numerosas funciones, que van desde el anclaje y movimiento de receptores de neurotransmisores de la membrana plasmática, hasta el anclaje de varias proteínas reguladoras de la actividad de estos receptores. También parecen tener mucha relación con unos orgánulos llamados processing bodies (P-Bodies) donde los miRNA pueden tener actividad y donde existe mRNA detenido en su traducción a proteína. Los miRNA se han implicado en la fisiopatología de diversas enfermedades psiquiátricas (síndrome de Rett, síndrome X frágil, depresión, drogadicción, esquizofrenia, alcoholismo) [95][135][136].

Uno de los miRNAs fuertemente estudiado por su rol en el desarrollo neuronal es el miR-132 cuyo papel principal es la regulación de la diferenciación, maduración y funcionamiento neuronal, y participa en el crecimiento de los axones, la migración neuronal y la plasticidad[137]. La disfunción de miR-132 se produce ampliamente en el desarrollo neuronal, las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos psicológicos y mentales. Además de la proliferación y la diferenciación celular, miR-132 también está implicado en el proceso de modulación de la función neuronal e inmunitaria específica.

Remenyi y sus colegas descubrieron que en los modelos de ratón de miR-132/212, miR-132 podía afectar a la transmisión sináptica y la plasticidad de la corteza [138]. El miRNA 132 es quizá el microRNA más prometedor de cara a valorar un miRNA que nos detecte el daño cerebral, pues se ha relacionado de manera muy significativa con la formación dendrítica durante el aprendizaje[139]. Su expresión se relaciona además con la densidad espinal. Puede detectarse en tejido in vitro pero también en suero in vivo lo que abre la posibilidad de detección en sangre fetal y materna[140][141].

Con esta introducción proporcionamos un marco general con los conceptos más importantes que serán necesarios para la comprensión de este trabajo.

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

HIPOTESIS DEL TRABAJO

La presencia de un marcador específico (miRNA) de alteración del desarrollo cerebral fetal en sangre materna en mujeres embarazadas diagnosticadas con restricción de crecimiento intrauterino tardío permitiría diferenciar aquellos fetos con mayor riesgo de presentar alteraciones en el neurodesarrollo postnatalmente, y de esta forma, permitirá individualizar las conductas a seguir en cada caso y mejorar la estrategia terapéutica.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo principal:

- *Detección de marcadores biológicos (miRNA) de daño neurológico fetal en sangre materna con el objetivo de evaluar el óptimo desarrollo de la neurogénesis fetal.*

Objetivos secundarios:

- *Identificación de miRNAs relacionados con la restricción tardía de crecimiento y comprender el patrón de expresión génica que se produce en esta entidad.*
- *Establecer una red de interacción y análisis funcional de los miRNAs seleccionados*
- *Correlacionar los miRNAs hallados con los parámetros clínicos y ecográficos*

4. METODOLOGÍA

4.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional prospectivo donde se compararon dos cohortes de estudio: RCF tardío y crecimiento normal

POBLACIÓN DE ESTUDIO

- **RCF tardío:** pacientes embarazadas con diagnóstico restricción de crecimiento intrauterino tardío:
 - > 32 semanas de edad gestacional + siguientes criterios ecográficos:
 - peso fetal estimado por debajo del percentil 3 o;
 - peso fetal estimado menor al percentil 10 con alteraciones hemodinámicas evidenciadas con Doppler color: (IP AUmb >percentil 95, IP ACM < percentil 5; CPR < percentil 5)
- **Crecimiento normal:** pacientes embarazadas con crecimiento fetal normal:
 - PFE > percentil 10
 - sin alteraciones hemodinámicas en el Doppler color (IP Aumb < percentil 95, IP ACM > percentil 5; CPR > percentil 5)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes embarazadas mayores de 18 años de edad con datación correcta de la edad gestacional en primer trimestre.
- Sin comorbilidades (enfermedades autoinmunes)
- Consentimiento informado por escrito.
- Casos: pacientes con diagnóstico de restricción de crecimiento tardío.
- Controles: pacientes con embarazos con feto adecuado para la edad gestacional (crecimiento normal).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes embarazos múltiples
- Pacientes con embarazos complicados por anomalías fetales congénitas o aneuploidías.
- Pacientes con otras comorbilidades

4.2 METODOLOGÍA

4.2. A RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

El estudio de investigación se llevó a cabo en el servicio de Obstetricia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe entre 2019-2022.

Las pacientes fueron reclutadas en el área de consultas externas de Obstetricia, donde se realizó la selección de las pacientes en dos grupos: casos y controles (descriptos anteriormente).

Estos fetos fueron sometidos a una ecografía entre las semanas 36 y 40 que incluía la biometría y el cálculo de la PFE, además de una evaluación Doppler de los índices de pulsatilidad (IP) de la arteria umbilical (AU) y la arteria cerebral media (ACM) y el cociente cerebro-placentario (CPR), o también llamado índice cerebro-placentario (ICP)

La AU y la ACM se examinaron mediante ecografía Doppler en color y pulsada durante la quiescencia fetal, en ausencia de taquicardia fetal, y manteniendo el ángulo de insonación respecto a los vasos examinados por debajo de 30°[142][143] y el CPR se calculó como el cociente simple entre el IP de la ACM y el IP de la AU[144] .

Para ajustar el efecto de la edad gestacional (EG), el peso fetal estimado (PFE) y el peso al nacer (PNA), los valores se convirtieron en centiles de referencia locales[145] ajustados sólo por el sexo del feto. Asimismo, los valores de CPR se convirtieron en múltiplos de la mediana (MoM), dividiendo cada valor por el centil 50 en cada EG [142].

Las medianas del CPR (centil 50) se representaron mediante la siguiente ecuación, donde "EG" era la edad gestacional en semanas con decimales.

$$\text{ICP } 50^{\text{o}} \text{ centil} = -3,814786276 + 0,36363249 \times \text{EG} - 0,005646672 \times \text{EG}^2,$$

Todos los exámenes Doppler fueron realizados utilizando ecógrafos General Electric Voluson® (E8/E6/730) (General Electric Healthcare, España) con sondas convexas de 2 a 8-MHz.

La edad gestacional se determinó en función de la longitud cráneo-caudal en el primer trimestre. Los datos correspondientes a la historia clínica, como la paridad, el número de gestaciones y el origen étnico, la edad, el peso y la estatura de la madre se recogieron en el

momento de la examinación, junto con los parámetros ecográficos indicados.

También se recogieron en el momento del nacimiento los datos (figura 4) de los resultados del parto, como el peso al nacimiento (PNA), el percentil de PNA, la puntuación de Apgar a los 5 minutos, el pH arterial del cordón umbilical y la fecha de ingreso en la unidad de cuidados neonatales.

Una vez identificadas las pacientes se realizó un seguimiento hasta el momento del parto con el objetivo de recolectar las muestras de sangre de la madre e hijo.

Todos los bebés nacieron en un plazo de 15 días o menos después de la exploración, y sólo se incluyó en el análisis el último examen por feto.

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Datos recolectados de historia clínica materna: - Edad materna - Gestas y paras - Origen étnico - Fumador si/no - Peso antes del embarazo - Altura - Índice de masa corporal (IMC) - Patologías relacionadas con el embarazo (diabetes gestacional, preeclampsia, hipertensión gestacional, eclampsia, colestasis intrahepática, hipotiroidismo gestacional) • Datos de la ecografía Doppler color: - Fecha de la exploración - Diámetro bi- parietal (DBP) | <ul style="list-style-type: none"> - Perímetro cefálico (PC) - Perímetro abdominal (PA) - Longitud de fémur (LF) - Peso fetal estimado (PFE) en gramos - IP Arteria Umbilical - IP ACM - ICP - Índice de líquido amniótico • Datos del parto: - Edad gestacional al parto - Tipo de parto (vaginal/cesárea) - Comienzo de parto (espontáneo/inducido) - Peso al nacer - APGAR - pH venoso y arterial |
|--|--|

Figura 4. Datos recolectados en cada paciente

4.2. B RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Luego del nacimiento, las muestras de plasma de la vena umbilical fetal y de la sangre periférica materna se recogieron en tubos con EDTA.

Una vez recogida las muestras se procedió a centrifugarlas a 3000-3500 rpm durante 10-15 minutos en una centrifugadora Eppendorf S7002, dentro de las primeras 5 horas de su recogida, con el fin de obtener el plasma.

Tras ser identificadas con sus etiquetas correspondientes se almacenaron a -80°C en un congelador de Nitrógeno Thermo que se encuentra en el Instituto de Investigación Sanitaria la Fe hasta la extracción de miRNAs.

Las muestras fueron enviadas en diferentes tandas, a medida que se iban recolectando un mayor número de las mismas, al laboratorio Epidisease, con sus correspondientes códigos con el fin de mantener anónimos los datos de cada paciente para su posterior control de calidad y análisis.

El primer paso una vez llegadas al laboratorio fue la inspección visual de las mismas. Si bien el proceso de recolección de las muestras fue igual para todas, una parte de ellas habían presentado a la inspección visual hemólisis y no pasaron el control de calidad.

4.2. C EXTRACCIÓN DE MIRNAS

En primer lugar el análisis comenzó con el análisis de las muestras de cordón umbilical. Se utilizaron 500 μL de plasma sanguíneo fetal para aislar el ARN total libre de células (incluyendo miRNAs) utilizando el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Este kit se basa en una extracción orgánica seguida de una extracción en fase sólida mediante la inmovilización del RNA en filtros de fibra de vidrio para purificar el RNA total sin perder los RNAs pequeños.

El ARN se eluyó con 25 μL de agua libre de RNasa. La concentración de ARN total libre de células (incluidos los miRNA) se cuantificó con el espectrofotómetro UV NanoDrop ND 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.).

4.2. D PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA Y NGS

Las bibliotecas de ARN pequeño se generaron e indexaron utilizando un protocolo de ARN pequeño Illumina TruSeq modificado. En este protocolo modificado, las bibliotecas se seleccionaron por tamaño (rango 90-170 pb) utilizando un instrumento Blue Pippin (Sage Science, Beverly, MA, EE.UU.). Se incluyó un control de ARN positivo (Thermo Fisher Scientific Human Brain Total RNA, catálogo #AM7962). La secuenciación de extremo único se llevó a cabo en una plataforma Illumina NextSeq en una tirada de alto rendimiento de 1 × 50 pb (kit NextSeq 500/550 High-Output v2 de 75 ciclos, FC- 404-2005).

4.2. E ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

El primer paso fue evaluar la calidad de las secuencias en bruto de Illumina con el software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Basándose en los resultados obtenidos, las lecturas de la secuencia se recortaron para eliminar los adaptadores de secuenciación y las bases de baja calidad utilizando el software Cutadapt (<http://cut-adapt.readthedocs.org/en/stable/>).

Una vez que los datos se consideraron de calidad suficiente, se compararon con la secuencia de referencia humana GRCh38, tomada de Ensembl. A continuación, se realizó una interpretación entre la posición alineada de las lecturas y las coordenadas del miRNA tomadas de miRBase v21. Los pasos de alineación y cuantificación se realizaron utilizando los paquetes Subread y Rsubread[146][147].

Se utilizó un gráfico de escalado multidimensional para ver más de cerca cómo se distribuían las muestras según los valores de expresión de miRNA. Los miRNA con recuentos muy bajos en todas las bibliotecas muestran poca evidencia de expresión diferencial. Filtramos estos miRNAs antes de continuar con el análisis.

Posteriormente, se realizó el método de normalización de la media recortada de los valores M (normalización TMM)[148] para eliminar los sesgos de composición entre las bibliotecas. También estimamos las dispersiones específicas por gen con una distribución binomial negativa[149][150].

4.2. F VALIDACIÓN DE MIRNAS POR PCR

Se analizaron los cambios de expresión de los miRNAs significativamente diferenciados entre casos y controles.

Una vez purificados los miRNAs, se procedió a su retrotranscripción. Estos protocolos constan de un primer paso de extensión específica de los miRNA, a partir del cual y utilizando cebadores con un fragmento universal y uno específico de cada uno de los miRNAs a detectar se consigue obtener cDNA. Para este paso, se utilizó una retrotranscriptasa y un tampón con los reactivos necesarios para la reacción proporcionados por el kit.

La retrotranscripción se produce a partir de un cebador Stem-loop con una secuencia universal que contiene los últimos 6 nucleótidos complementarios al extremo 3' del miRNA específico.

A partir de este cDNA y utilizando cebadores específicos para cada uno de los miRNAs de interés y un cebador complementario a la región central del Stem-loop, se amplificó mediante PCR específica. Para la cuantificación se utilizaron sondas diseñadas frente a la región central del amplicón marcadas en los extremos 5' con un quencher y en 3' con una molécula fluorescente.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 200 ng de RNA total empleando el TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™ by Life Technologies™, Carlsbad, California, USA). En este caso, para la síntesis de cDNA se empleó una mezcla de cebadores para realizar una única síntesis de cDNA por muestra de acuerdo al "Protocol for Creating Custom RT and Pre-amplification Pools using TaqMan® MicroRNA Assays" (Applied Biosystems™ by Life Technologies™, Carlsbad, California, USA), con el termociclador iQ5 (BioRad).

Una vez obtenido los cDNAs, se realizó la PCR cuantitativa empleando los kits TaqMan® Gene Expression Assays y TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems™ by Life Technologies™, Carlsbad, California, USA), respectivamente.

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron por triplicado, en volúmenes de reacción reducidos de 10 µL, utilizando 5 µL de TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc. CA USA) sin UNG, 0,5 µL de TaqMan® Small RNA assay (20x) (Applied Biosystems Inc. CA USA), 3,5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de producto de RT. La RT-

qPCR se llevó a cabo en un termociclador Applied BioSystems QuantStudio5[®] (Applied Biosystems Inc. CA USA).

4.2.G PREDICCIÓN DE OBJETIVOS DE MIRNA Y ANÁLISIS DE SOBREEXPRESIÓN

Primero se utilizó DIANA-microT-CDS, esta herramienta predice dianas para miRNAs y proporciona información funcional sobre la interacción miRNA: gen diana predicha a partir de varios recursos biológicos en línea. En pocas palabras, permiten la asociación de miARNs a enfermedades mediante análisis bibliográfico, al que se accede desde el servidor web de DIANA[151].

Esta herramienta mostró si la diana también fue predicha por miRanda o TargetScan o fue validada experimentalmente en TarBase v7.0.

Se utilizó la suite online de análisis funcional DIANA-miRPath v3.0 para identificar los miRNAs que controlan vías moleculares significativas anotadas en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG), utilizando los siguientes parámetros por defecto: “**miRNA y restricción fetal de crecimiento de aparición tardía**” de la base de datos DIANA Tar v.7.0; un umbral de valor p de 0,001; y un umbral microT de 0,8.

Para reducir el número de objetivos de miRNA falsos positivos, se aplicó una corrección de la tasa de falsos descubrimientos (FDR) a las vías KEGG seleccionadas.

El algoritmo utilizado en este análisis fue una prueba exacta de Fisher de una cola.

5. RESULTADOS

El análisis de los resultados tuvo lugar en dos partes:

- 1) análisis de muestras de cordón umbilical
- 2) análisis de muestras de sangre materna.

PARTE 1: ANÁLISIS DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL

5.1 IDENTIFICACIÓN DE MIRNAS EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE MEDIANTE SMALL RNA-SEQ

En principio, este análisis se llevó a cabo en **25 muestras** de cordón umbilical (16 de crecimiento normal / 9 RCF-tardío)

En la figura 5 se muestra el diagrama de volcán con todos los miRNAs iniciales hallados en el análisis. Las líneas verticales representan los umbrales log FC en -1 y 1, mientras que la línea horizontal representa el umbral FDR en 0,15.

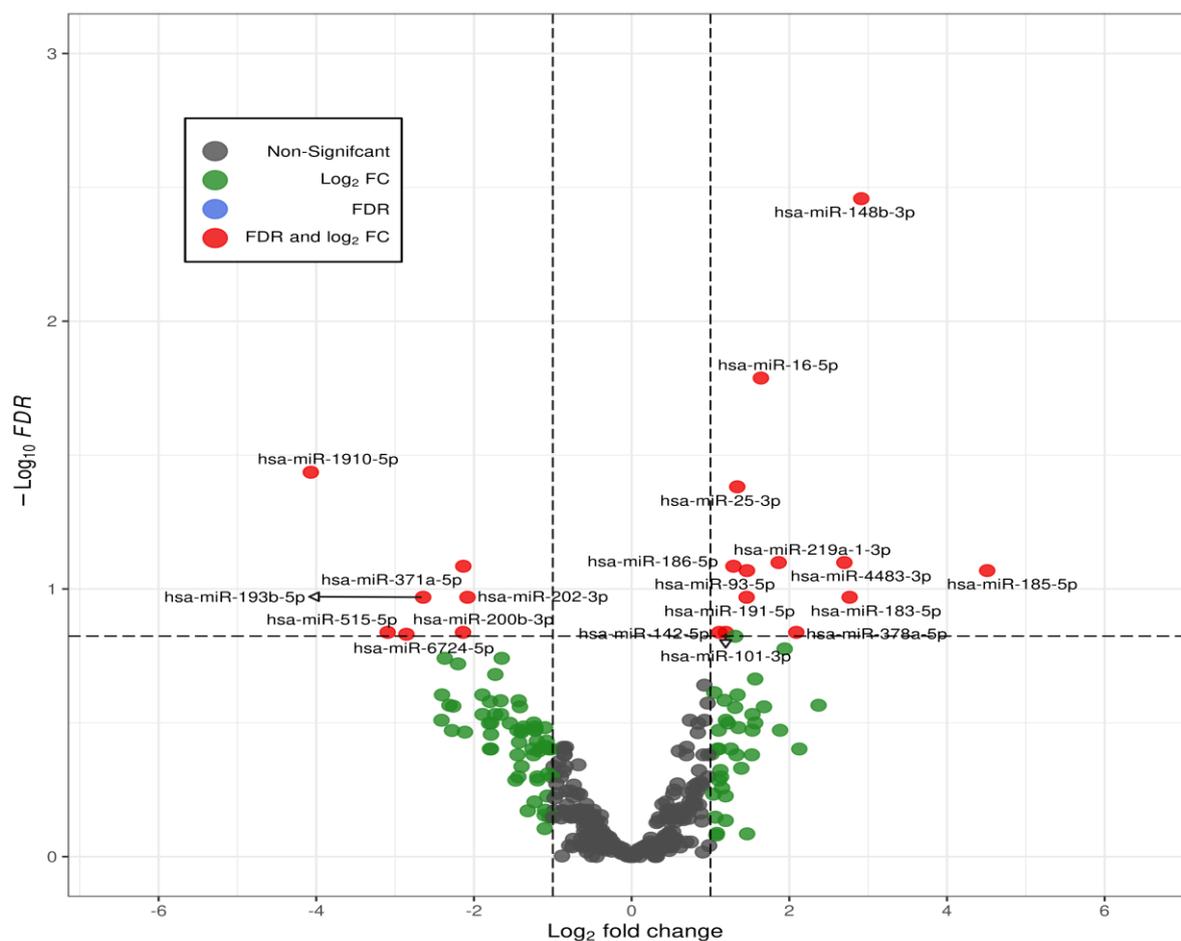


Figura 5. Diagrama de volcán que muestra la sobreexpresión de miRNA en los fetos RCF tardío.

Se consideraron significativos todos los miRNA con una tasa de falsos descubrimientos (FDR) inferior a 0,05.

Al comparar el grupo de crecimiento normal con el grupo RCF tardío, se identificaron un total de 4 miRNAs expresados diferencialmente (Tabla 1):

- 1 infraexpresado *miR-1910-5p*
- 3 sobreexpresados: *miR-148b-3p*; *miR-25-3p* y *miR-16-5p-16-5p*.

miRNA	logFC	logCPM	F	p value	FDR
hsa-miR-148b-3p	2.913109	6.392020	23.88636	7.813586e-06	0.003484859
hsa-miR-16-5p	1.639640	12.972890	18.11788	7.311848e-05	0.016305421
hsa-miR-1910-5p	-4.069241	0.916709	15.22769	2.465907e-04	0.036659814
hsa-miR-25-3p	1.339374	11.323960	14.20868	3.726486e-04	0.041550317

Tabla 1. Expresión diferencial de miRNAs entre fetos con RCF y normales

MiR-1910-5p y *miR-16-5p* fueron eliminados del análisis porque el primero no estaba relacionado con ninguna ruta biológica descrita hasta el momento y el segundo debido a su relación con la hemólisis, ya que, siempre puede estar presente en las muestras de sangre en algún grado[152][153].

La Figura 6 muestra el mapa de calor del perfil de expresión de miRNAs con los miRNAs seleccionados. La agrupación se hizo sobre la base de log2 (nivel de expresión en el tratamiento/nivel de expresión en el control).

El amarillo denota la regulación a la baja de los miRNAs y el rojo denota la regulación al alza de los miRNAs en las muestras de sangre del cordón neonatal.

Con el objetivo de tener más posibilidades de encontrar más de un miRNA específico de daño cerebral, decidimos ampliar el número de miRNAs a validar por PCR, no sólo tomando miRNAs con FDR < 0,05 sino también un grupo mayor aunque el FDR fuera inferior a 0,05: *miR-185-5p*, *miR-183-5p*, *miR-4483-3p*, *miR-515-5p*.

Se debe tener en cuenta que el parámetro FDR debe aplicarse siempre para minimizar el número de falsos positivos obtenidos, si bien es cierto que puede utilizarse el valor p que posteriormente deberá ser validado mediante experimentos de RT-qPCR.

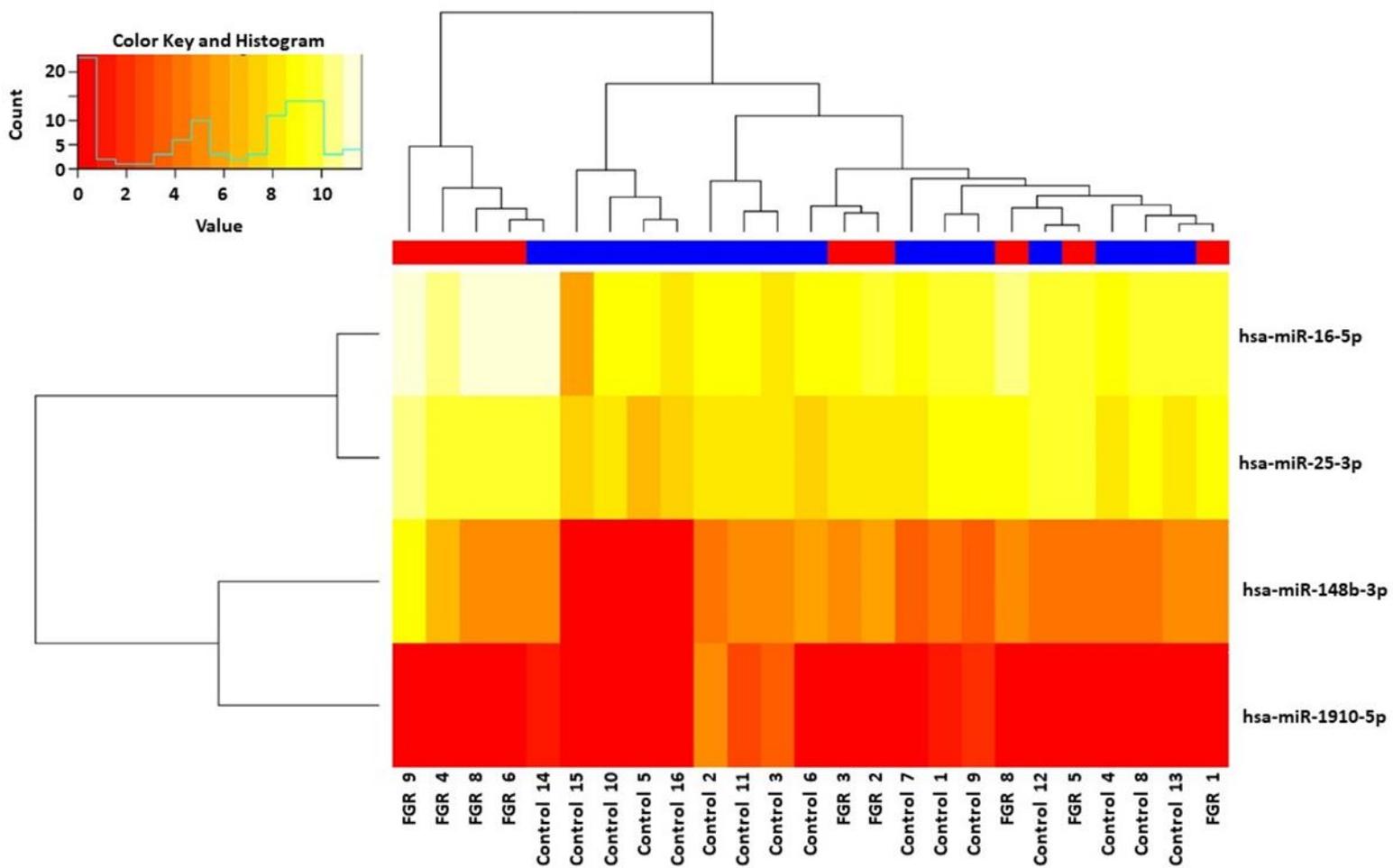


Figura 6. Mapa de calor con la agrupación jerárquica de miRNAs expresados diferencialmente en fetos con RCF de aparición tardía (rojo) frente a fetos normales (azul) según los niveles de expresión de los miRNAs miR-1910-5p, miR-148b-3p, miR-16-5p y miR-25-3p

5.2 ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO

En la tabla 2.1 y 2.2 se puede apreciar las estadísticas descriptivas tanto de las madres como de los fetos de los dos grupos estudiados en un total de 25 muestras:

-16 fetos normales

-9 RCF tardío

Con respecto a las características maternas todas ellas eran de origen caucásico español y la única diferencia significativa entre las madres de los dos grupos fue que las que correspondían al grupo de RCF tardío tenían un menor índice de masa corporal, principalmente debido a un menor peso corporal.

En resumen de los 25 fetos: 14 (56%) eran varones y 11 (44%) eran mujeres, el grupo de fetos con RCF tardío tenían un CPR MoM, un PFE, un centil de PFE, un PNA y un centil de PNA inferiores ($p < 0,001$).

Además, en comparación con los fetos con crecimiento normal, los fetos con RCF tardío presentaron mayor tasa de inducción del parto, al igual que nacieron a una menor edad gestacional ($p = 0,04$).

Tabla 2.1. Estadísticas descriptivas de los dos grupos estudiados: fetos normales y RCF.

Variables	Fetos con crecimiento normal N=16		RCF tardío N=9		P-value
	Media (DS)	Mediana (1 st , 3 rd Q), rango	Media (DS)	Mediana (1 st , 3 rd Q),rango	
Edad materna	33.4 (4.6)	33.5 (29.25, 36), 27-41	34.2 (5.04)	34 (29.5, 38.5), 27-42	0.73
Gestas	1.87 (1.1)	2 (1, 2), 1-5	1.89 (1.36)	1 (1, 2.5), 1-5	0.78
Paridad	0.62 (0.72)	0.5 (0, 1), 0-2	0.67 (0.87)	0 (0, 1.5), 0-2	0.98
Peso materno (kg)*	65.56 (11.35)	67 (53.5, 73), 52-86	51.7 (8.2)	51 (48, 55), 40-67	0.01
Altura materna(cm)**	163.8 (10.5)	168 (156, 171), 144-176	161.7 (2.5)	162 (160, 164), 158-165	0.38
Edad gestacional al momento de la exploración ecográfica (semanas)	39.4 (1)	39.6 (38.7, 40.2), 36.7-40.4	38.3 (1.4)	38.1 (37.0, 39.4), 36.7-40.7	0.08
Peso fetal estimado hadlock-4 (g)	3547 (441.5)	3505 (3161, 4013), 2830-4246	2491 (456)	2500 (2134, 2763), 1810-3373	<0.001
Centiles locales de peso fetal estimado	70.44 (27.2)	78 (47.25, 95.25), 21-99	7.2 (10.3)	4 (0.5, 11), 0-32	<0.001
CPR MoM	1.56 (0.28)	1.49 (1.42, 1.73), 1.01-2.1	0.48 (0.11)	0.51 (0.37, 0.58), 0.31-0.59	<0.001
Edad gestacional al parto (semanas)	40.14 (1.08)	40.6 (39.3, 41), 37.9-41.4	38.75 (1.5)	38.86 (37.4, 40.1), 36.9-41	0.04
Intervalo entre examinación y parto (días)	5.44 (3.6)	4.5 (3, 8), 1-15	3 (2.34)	2 (1, 5), 0-7	0.87
Peso al nacer	3610 (467.9)	3500 (3320, 3823), 3000-4700	2381 (324.7)	2350 (2118, 2665), 1845-2800	<0.001
Centiles locales de peso al nacer	62.25 (26.3)	61 (37.7, 91.7), 29-100	1.78 (1.39)	2 (0.5, 3), 0-4	<0.001
Apgar at 5 minutos	9.87 (0.34)	10 (10, 10), 9-10	10 (0)	10 (10, 10), 10-10	1
pH arterial del cordón umbilical	7.27 (0.08)	7.29 (7.21, 7.33), 7.12-7.41	7.23 (0.04)	7.22 (7.19, 7.27), 7.17-7.29	0.11

Tabla 2.2. Estadística descriptiva por cada grupo

	Fetos con crecimiento normal N (%)	RCF tardío N (%)	P-value
Sexo fetal			0.22
Masculino	7 (43.7%)	7 (77.8%)	
Femenino	9 (56.3%)	2 (22.2%)	
Peso al nacer <10 centil local	0 (0%)	9 (100%)	-
Apgar 5 min <7	0 (0%)	0 (0%)	-
pH arterial de cordón umbilical <7.20***	3 (18.7%)	2 (22.2%)	0.78
Etnia			-
Caucásica	16 (100%)	9 (100%)	
No caucásica	0 (0%)	0 (0%)	
Tabaco****	0 (0%)	1 (11.1%)	-
Inicio del parto			0.93
Parto inducido	6 (37.5%)	8 (88.9%)	
Inicio espontáneo el parto	6 (37.5%)	0 (0%)	
Cesárea (RCTG anormal)	0 (0%)	0 (0%)	
Cesárea electiva	4 (25%)	1 (11.1%)	
Vía del parto			0.95
Parto vaginal espontáneo	9 (56.3%)	4 (44.4%)	
Parto vaginal asistido	1 (6.25%)	1 (11.1%)	
Cesárea(RCTG anormal)	1 (6.25%)	3 (33.3%)	
Cesárea (distocia)	5 (31.2%)	1 (11.1%)	
Destino del neonato			0.054
Guarda materna	16 (100%)	7 (77.8%)	
Neonatología	0 (0%)	2 (22.2%)	

Notas: *faltaban datos en 7 y 2 pacientes respectivamente, **faltaban datos en 6 y 2 pacientes respectivamente, ***faltaban datos en 1 paciente de cada grupo, ****faltaban datos en 7 y 1 pacientes respectivamente.

5.3 ANÁLISIS DE LAS DIANAS DE MIRNA Y DE LAS VÍAS BIOQUÍMICAS EN EL CONTEXTO DE LA RCF TARDÍO

Todos los miRNAs tenían un gran número de sitios potenciales, por lo que exploramos los que eran relevantes para la RCF descriptos en la literatura.

Para aclarar el papel de los miRNAs miR-148b-3p y miR-25-3p, se analizó las redes bioquímicas en las que participan.

Se realizó un análisis DIANA-miRPath v3.0 y un análisis de vías KEGG para buscar cualquier vía significativamente enriquecida.

Un total de 29 vías con un FDR <0,05 fueron recuperadas (Tabla 3).

Algunas de ellas están relacionadas con el metabolismo de los lípidos, como la biosíntesis de los ácidos grasos[154] y los esfingolípidos[155] cruciales para el desarrollo de los tejidos neuronales, mientras que otras están relacionadas con el procesamiento de las proteínas en el retículo endoplásmico o con el metabolismo de las proteínas, como la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina[156].

KEGG pathway	p-value	Genes	miRNAs
Prion diseases	7.31985499212e-15	5	miR-148b-3p and miR-25-3p
Fatty acid biosynthesis	3.52242071263e-13	2	miR-148b-3p
Oocyte meiosis	1.27759516409e-05	31	miR-148b-3p and miR-25-3p
Cell cycle	1.7071934491e-05	42	miR-148b-3p and miR-25-3p
Viral carcinogenesis	1.7071934491e-05	45	miR-148b-3p and miR-25-3p
Lysine degradation	3.01715187799e-05	14	miR-148b-3p and miR-25-3p
Estrogen signaling pathway	0.00028055720575	26	miR-148b-3p and miR-25-3p
P53 signaling pathway	0.000316939071553	24	miR-148b-3p and miR-25-3p
FoxO signaling pathway	0.000929050869461	37	miR-148b-3p and miR-25-3p
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.000929050869461	42	miR-148b-3p and miR-25-3p
Adherens junction	0.00183745694845	19	miR-148b-3p and miR-25-3p
Lon-term depression	0.00183745694845	15	miR-148b-3p and miR-25-3p
Proteoglycans in cancer	0.0019678042498	42	miR-148b-3p and miR-25-3p
Steroid biosynthesis	0.00292457111324	4	miR-148b-3p
Hippo signaling pathway	0.00292457111324	34	miR-148b-3p and miR-25-3p
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	0.00360593689391	2	miR-25-3p
Hepatitis B	0.00373563003963	35	miR-148b-3p and miR-25-3p
Progesterone-mediated oocyte maturation	0.00574829839216	26	miR-148b-3p and miR-25-3p
cGMP-PKG signaling pathway	0.00675142184669	40	miR-148b-3p and miR-25-3p
Prostate cancer	0.0079060270266	25	miR-148b-3p and miR-25-3p
Endometrial cancer	0.0100040376492	15	miR-148b-3p and miR-25-3p
Non-small cell lung cancer	0.0100700510791	15	miR-148b-3p and miR-25-3p
Chronic myeloid leukemia	0.0129054369882	21	miR-148b-3p and miR-25-3p
Sphingolipid signaling pathway	0.0131352576976	27	miR-148b-3p and miR-25-3p
Colorectal cancer	0.015375047919	16	miR-148b-3p and miR-25-3p
Glioma	0.015375047919	17	miR-148b-3p and miR-25-3p
Sulfur metabolism	0.0155260139399	2	miR-148b-3p
Thyroid cancer	0.0263000781158	9	miR-148b-3p and miR-25-3p
RNA degradation	0.0440095764865	21	miR-148b-3p and miR-25-3p

Tabla 3. Vías KEGG seleccionadas reguladas por miRNAs miR-25-3p y miR-148b-3p expresados diferencialmente en fetos con RCF frente a fetos normales.

5.4 VALIDACIÓN DE LA QPCR EN TIEMPO REAL (RT-QPCR) A PARTIR DEL PLASMA DEL CORDÓN UMBILICAL

Para la validación de los resultados hallados, un total de 75 muestras de cordón umbilical fueron recolectadas (incluidas las 25 analizadas previamente)

Debemos mencionar que tuvimos ciertas incidencias con el número total de muestras, ya que 18 muestras no pasaron el control de calidad debido a la presencia de hemólisis en las mismas, y 9 muestras no amplificaron en la RT-qPCR, por lo que fueron excluidas del análisis.

Finalmente el número total de muestras validadas por PCR fue de 48 (24 RCF tardío, 24 crecimiento normal).

Se procedió a validar por RT-qPCR los microARNs: miR-148b-3p y miR-25-3p, pero además decidimos validar otros miRNAs hallados en el análisis del Small RNA-Seq con un FDR > 0.05 con el objetivo de ampliar las posibilidades de hallar más de un marcador en sangre materna, por lo que finalmente se validaron 7 miRNAs por : **miR-148b-3p, miR-25-3p miR-185-5p, miR-183-5p, miR-4483-3p, miR-515-5p y miR 132-3p***.

*MiR 132-3p se incluyó en el análisis, aunque no fue obtenido directamente del análisis de la secuenciación, por su importante rol en el control de la función neuronal descrito previamente en la bibliografía[157][158].

Al analizar los resultados de la validación solo se observó una sobreexpresión significativa en el grupo de RCF tardío de los miRNAs: **miRNA-25-3p, miRNA-132-3p y miRNA-185-5p**. (Figura 7)

Por el contrario, miR-148b-3p, miR-183-5p, miR-193b-5p y miR-4483-3p no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4)

El método delta-delta Ct, también conocido como método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, es una fórmula sencilla que se utiliza para calcular la variación de la expresión (ΔCt) del gen de interés con la del gen de referenciado.

miRNAs	RCF-tardío	Crecimiento Normal	p-value
miR-132-3p	26.00±33.78	1.08±0.91	0.0002
miR-185-5p	1.80±0.90	1.22±0.95	0.03
miR-25-3p	1.76±1.09	1.19±0.82	0.05
miR-148b-3p	1.51±0.80	1.11±0.52	0.18 (n.s)
miR-183-5p	1.23±0.61	1.27±1.64	0.24 (n.s)
miR-193b-5p	1.53±2.14	1.37±1.55	0.18 (n.s)
miR-4483-3p	0.99±1.16	1.97±2.26	0.25 (n.s)

Tabla 4. Estadística descriptiva de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los niveles de expresión de los miRNAs en los dos grupos de estudio (media± desviación estándar)

En la siguiente figura se muestran los niveles de expresión de los *miRNAs* 25-3p, 132-3p

y 185-5p

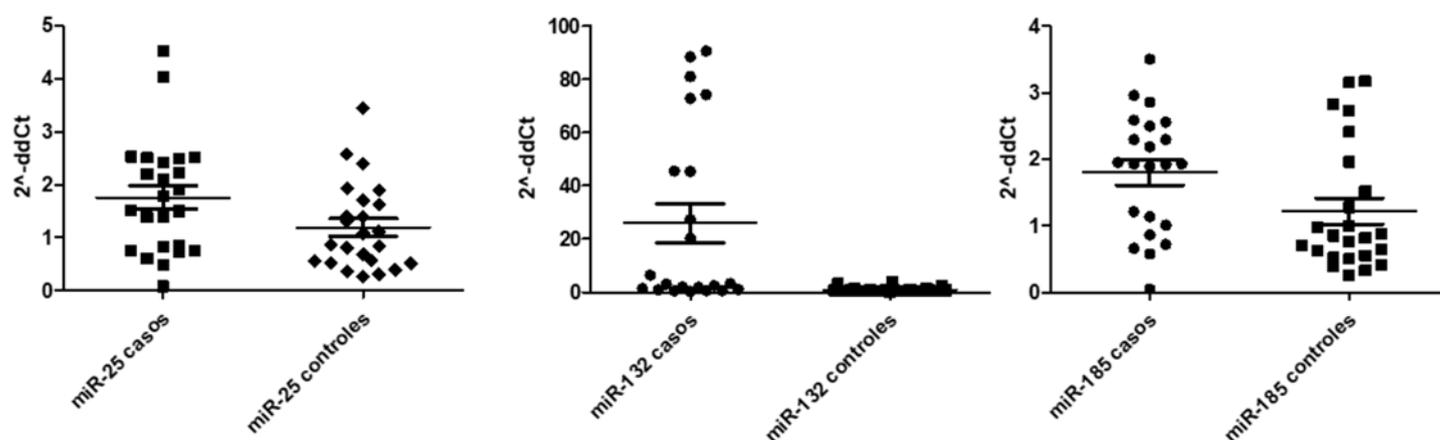


Figura 7. Niveles de expresión relativa de los *miRNAs* 25-3p, 132-3p y 185-5p

5.5 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS MUESTRAS VALIDADAS POR RT-PCR

En cuanto a las características de la población del estudio, en resumen, incluía 48 fetos explorados luego de las 32 semanas, de los cuales 19 (39,6%) eran varones.

La edad materna media, la gravidez, la paridad y el IMC fueron 32,5, 2, 0,5 y 23, respectivamente.

La EG media en el momento de la exploración y el parto fue de 38,5 y 39,1 semanas. La mayoría de las gestantes iniciaron el parto con inducción (79,2%), dando a luz de forma espontánea (47,9%), y la mayoría de los neonatos nacieron sin problemas, acompañando a la madre a la maternidad (85,4%).

Además, a pesar de la importante proporción de fetos con restricción del crecimiento (58%), ningún feto presentó hipoxia grave, sugerida por una puntuación de Apgar inferior a 7 a los 5 minutos o un pH del cordón umbilical inferior a 7,10.

En resumen, los fetos del grupo con RCF fueron examinados y su parto se produjo a una edad gestacional más temprana con respecto a los fetos normales ($p < 0,01$), además que presentaron un percentil de peso inferiores ($p < 0,0001$) y presentaron un peor resultado perinatal ($p < 0,01$) que requirió una vigilancia pediátrica postnatal más frecuente (Tabla 5).

Variable continua	RCF de inicio tardío (N=24)	Fetos con crecimiento normal (N=24)	p value
• Características maternas			
Edad materna (años)	31.5 (5.2) 31.0 (29,34.5)	34 (4.2), 34 (31,36)	NS
Gestas	1.7 (1), 1(1,2)	2.2 (1.4), 2 (1,3)	NS
Paras	0.4(0.6), 0(0,1)	0.5(0.6), 0 (0,1)	NS
Peso corporal materno antes del embarazo (kg)	58.8(9.2), 58.5(50.5, 66.7)	61.5 (10), 62(53.5,69.2)	NS
Índice de masa corporal (IMC)	22.2(3), 22.5 (20.1, 24.7)	23.7(3.4) 23.7(20.8,26.6)	NS
Tabaco	8 (33.3)	4(16.7)	
• Características fetales			
Sexo fetal	9 (37.5)	10 (41.7)	NS
Edad gestacional al momento de la exploración ecográfica (semanas)	37.9(1.5), 37.3 (36.7, 38.7)	39.1 (1), 39.1 (38.6, 40)	< 0.01
Edad gestacional al parto (semanas)	38.4(1.5), 37.9 (36.4, 39.9)	39.7(1.2), 39.7(38.8, 40.8)	< 0.01
Intervalo entre examinación y parto (días)	3.5(2.8), 3 (1.2, 5)	4.3 (3.5), 4(1.2, 6)	NS
CPR MoM	0.70 (0.26), 0.62 (0.49, 0.96)	1.2 (0.3), 1.2 (1, 1.4)	<0.0001
Peso al nacer (g)	2278 (320), 2340 (2053, 2538)	3179 (453), 3145 (2753, 3575)	<0.0001
Centil de peso al nacer	1.5 (1.9), 1 (0, 2)	35.3 (26.4), 29.5 (13.75, 57.5)	<0.0001
• Datos del parto			
Compromiso fetal intraparto	11 (45.8)	2 (8.3)	<0.01
Apgar <7 at 5 min	0 (0)	0 (0)	NS
Arterial pH <7.20	6 (25)	3 (12.5)	
Arterial pH <7.10	0 (0)	0 (0)	NS
Parto espontáneo sin inducción	2 (8.3)	6 (5)	NS
Parto inducido	21 (87.5)	17 (70.8)	NS
Cesárea electiva	1 (4.2)	1 (4.2)	NS
• Vía de parto			
Cesárea programada	1 (4.2)	1 (4.2)	NS
Cesárea (fallo de progresión)	2 (8.3)	2 (8.3)	NS
Cesárea (RCTG anormal)	7 (29.2)	2 (8.3)	NS
Parto vaginal asistido	6 (25)	4(16.7)	NS
Parto espontáneo	8 (33.3)	15 (62.5)	NS
Destino del neonato			
Guarda materna	17 (70.8)	24(100)	<0.01
Neonatología	7 (29.2)	0 (0)	<0.01
Unidad de cuidados intensivos neonatal	0 (0)	0 (0)	NS

Tabla 5. Descripción de la población estudiada en la validación de las muestras por RT-PCR de los dos grupos.

5.6 RED DE INTERACCIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL

Una vez identificados los miRNAs expresados diferencialmente entre los dos grupos en la Small-RNA seq y que posteriormente fueron validados en un mayor número de muestras por PCR, se elaboró una red reguladora de miRNAs [155] involucrados, sus dianas génicas y factores de transcripción (Figura 8).

La identificación de dianas génicas de miRNAs desregulados y de factores de transcripción reveló:

100 interacciones miRNA-genes de fuerte evidencia, que implican:

- 98 dianas génicas únicas
- 26 factores de transcripción únicos.

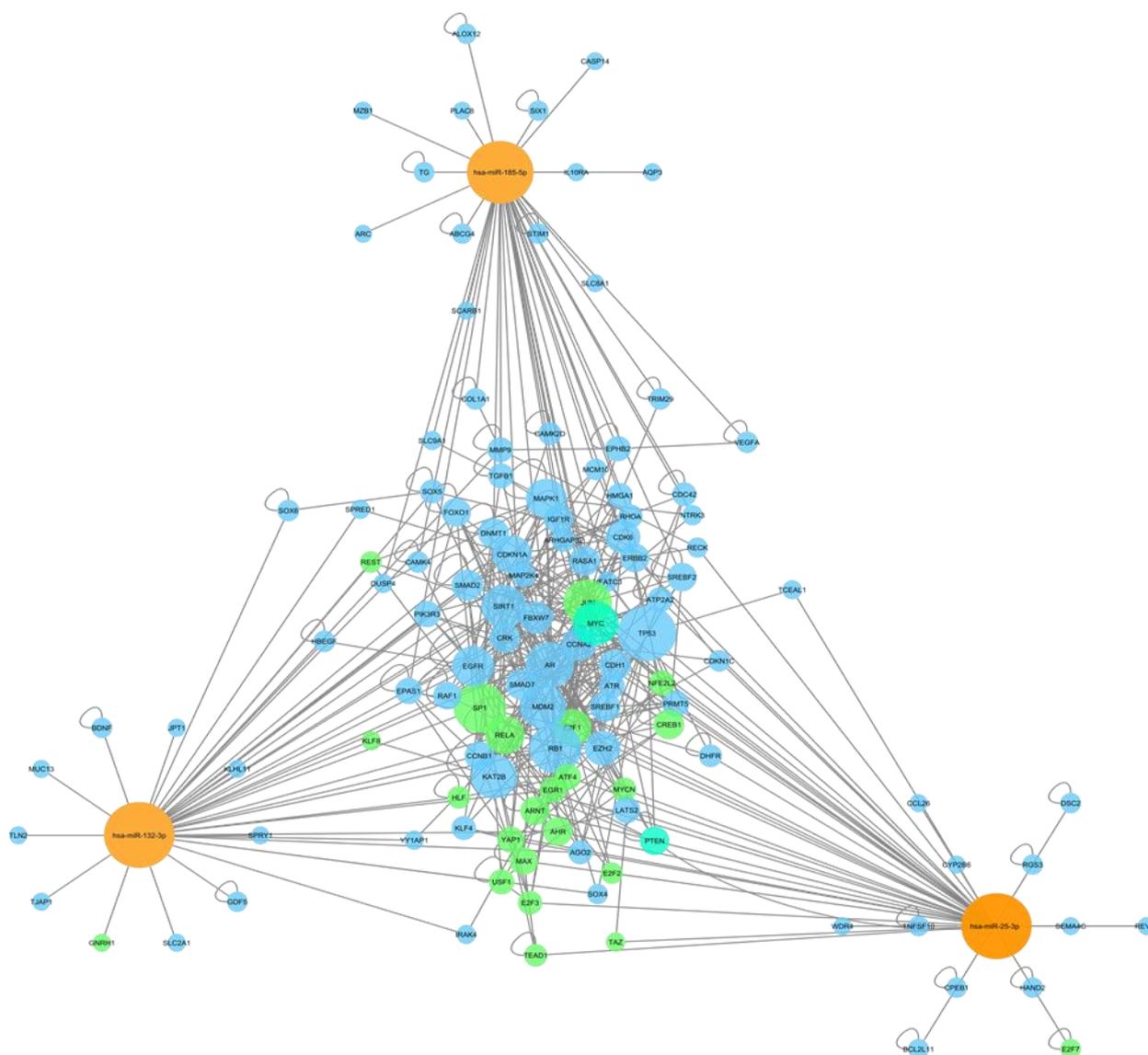


Figura 8. Red de interacción de miRNAs desregulados incluyendo sus genes diana y la transcripción.

Para interpretar el efecto funcional de los miRNAs hallados, se realizó tanto un análisis de enriquecimiento de vías como un análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology (GO)*, basado en la red reguladora de los miRNAs desregulados.

Este tipo de análisis se realizó para reducir la complejidad del análisis requerido, aumentando el potencial explicativo funcional [91]. El análisis de enriquecimiento por vías se realizó en EnrichR utilizando sus dianas génicas y factores de transcripción (Tabla 6).

El análisis de enriquecimiento de vías reveló una miríada de vías afectadas:

- Kegg muestra aparte de la senescencia celular, vías relacionadas con el cáncer.
- Las vías enriquecidas de Reactome 2016 también indican la senescencia celular, en combinación con las respuestas al estrés celular, y las vías implicadas en la inflamación, la supervivencia celular, la angiogénesis y la biología general del desarrollo.

Kegg 2021 Human	Pathway	Adj p-value
	Pathways in cancer	6.709e-27
	Bladder cancer	1.085e-23
	Prostate cancer	1.085e-23
	Cellular senescence	1.932e-22
	Human T-cell leukemia virus 1 infection	5.516e-22
	Pancreatic cancer	6.030e-21
	Glioma	2.045e-19
	Hepatitis B	2.045e-19
	Human cytomegalovirus infection	3.192e-19
	MicroRNAs in cancer	1.116e-18
Reactome 2016	Cellular responses to stress Homo sapiens R-HSA-2262752	3.128e-13
	Cellular Senescence Homo sapiens R-HSA-2559583	7.922e-13
	Signal Transduction Homo sapiens R-HSA-162582	9.454e-13
	Fc epsilon receptor (FCERI) signaling Homo sapiens R-HSA-2454202	4.211e-11
	Signalling by NGF Homo sapiens R-HSA-166520	4.211e-11
	Signaling by EGFR Homo sapiens R-HSA-177929	4.704e-11
	NGF signalling via TRKA from the plasma membrane Homo sapiens R-HSA-187037	1.014e-10
	Downstream signal transduction Homo sapiens R-HSA-186763	1.937e-10
	Signaling by PDGF Homo sapiens R-HSA-186797	4.611e-10
	Developmental Biology Homo sapiens R-HSA-1266738	4.611e-10

Tabla 6. Vías más significativamente enriquecidas de Kegg 2021 humano y Reactome 2016 clasificadas por valor p ajustado, basadas en una red de objetivos genéticos de miRNA desregulados

El análisis funcional del proceso biológico gene Ontology (GO), reveló 302 términos GO significativamente ($p < 0,001$) sobrerrepresentados (Figura 8). Los términos se han agrupado según las similitudes de los términos GO.

Para hacer menos compleja la interpretación del seguimiento, decidimos centrarnos en los procesos biológicos que se han asociado a la restricción de crecimiento: **“apoptosis neuronal”, “la regulación del proceso de biosíntesis de lípidos”, “fisiología cardíaca”, “la respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno”**.

En la **figura 9** se pueden visualizar los genes incluidos en más de un término GO (resaltados en rosa).

La red original filtrada reveló elementos reguladores consistentes en miRNAs desregulados (naranja), genes diana altamente conectados (azul) y factores de transcripción (verde), importantes para la manifestación de los fenotipos de RCF(C). Estos elementos muestran una alta cantidad de interconexión, lo que apoya aún más un papel regulador en la presentación del fenotipo de RCF.

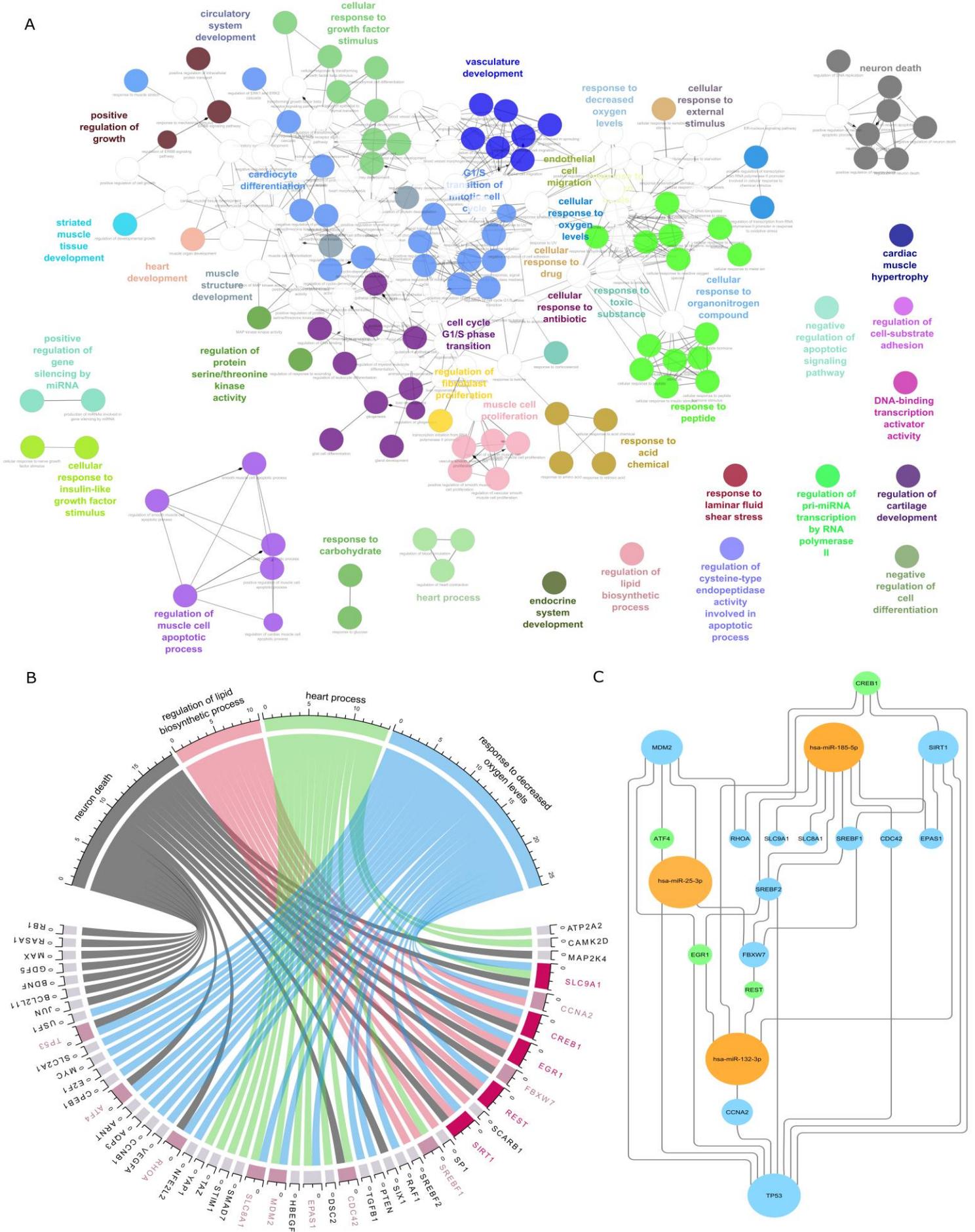


Figura 9. Análisis funcional e identificación de módulos reguladores

5.7 INTERACCIÓN DE MIRNAS HALLADOS EN LA FORMACIÓN DE TRIPLEX

Recientemente se ha demostrado que pares de miRNAs pueden reprimir la traducción de un ARNm diana de forma cooperativa, lo que se conoce como RNA triplex, que conduce a una mayor eficacia y especificidad en la represión de la diana [159][160][161].

En nuestro estudio se realizó un análisis de los miRNAs hallados y sus posibles dianas y hemos encontrado que *miR-185-5p* y *miR-25-3p* actúan sobre la misma diana dentro del conjunto de dianas genéticas (Figura 10) de fuerte evidencia validadas experimentalmente. Principalmente revelaron dos dianas de interés, ambos involucrado en la biosíntesis y homeostasis del colesterol[162]

- Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2 (**SREBF2**).
- ATP Binding Cassette Subfamily G Member 4(**ABCG4**)

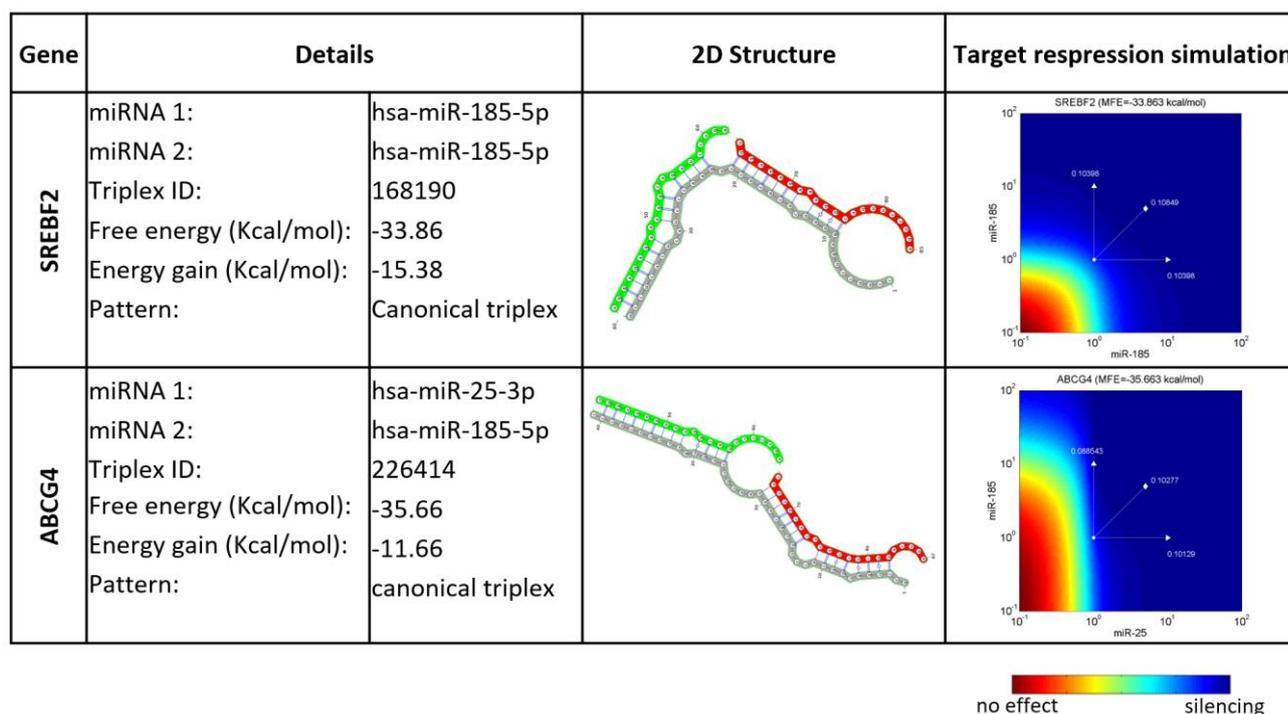


Figura 10. Triplex de ARN formados por miRNAs desregulados y genes diana de fuerte evidencia. La estructura 2D se muestra en la tercera columna. La eficiencia de la represión está codificada por colores: el rojo no tiene efecto y el azul tiene un efecto silenciador.

5.8 ASOCIACIÓN DE MIR-132-3P, MIR-185-5P CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y/O ECOGRÁFICOS

Hasta aquí se ha analizado los miRNAs y su las rutas biológicas involucradas. Una vez identificadas procedimos a realizar un análisis de asociación entre los dos miRNAs expresados diferencialmente entre los dos grupos y parámetros clínicos y/ o ecográficos.

El objetivo de este análisis fue ver si podíamos encontrar algún parámetro que influenciara en la expresión de los miRNAs.

Para tratar de seleccionar los dos miRNAs más significativos, hemos realizado este análisis de asociación con miR-132-3p, miR-185-5p, ya que el mir25-3p tiene una p-value de 0.05, comparada con las p-value de los otros dos miRNAs de 0.0002 y 0.03. (Tabla 4)

Las variables continuas y categóricas de las poblaciones estudiadas, se compararon mediante las pruebas U de Mann-Whitney y Fisher test.

Los gráficos y las estadísticas se realizaron con GraphPad Prism® 5.0a y StatPlus® Pro 7.3.3.2 para Apple Macintosh.

MIR-132-3P

La figura 11 muestra la expresión de miR-132 en los fetos con RCF y crecimiento normal. Los fetos del grupo de RCF tardío presentaron una expresión de miR-132 significativamente mayor ($p < 0,001$). Además, la mayoría de los fetos del grupo normal presentaban expresiones de miR-132-3p (2-ddCt) inferiores a 5.

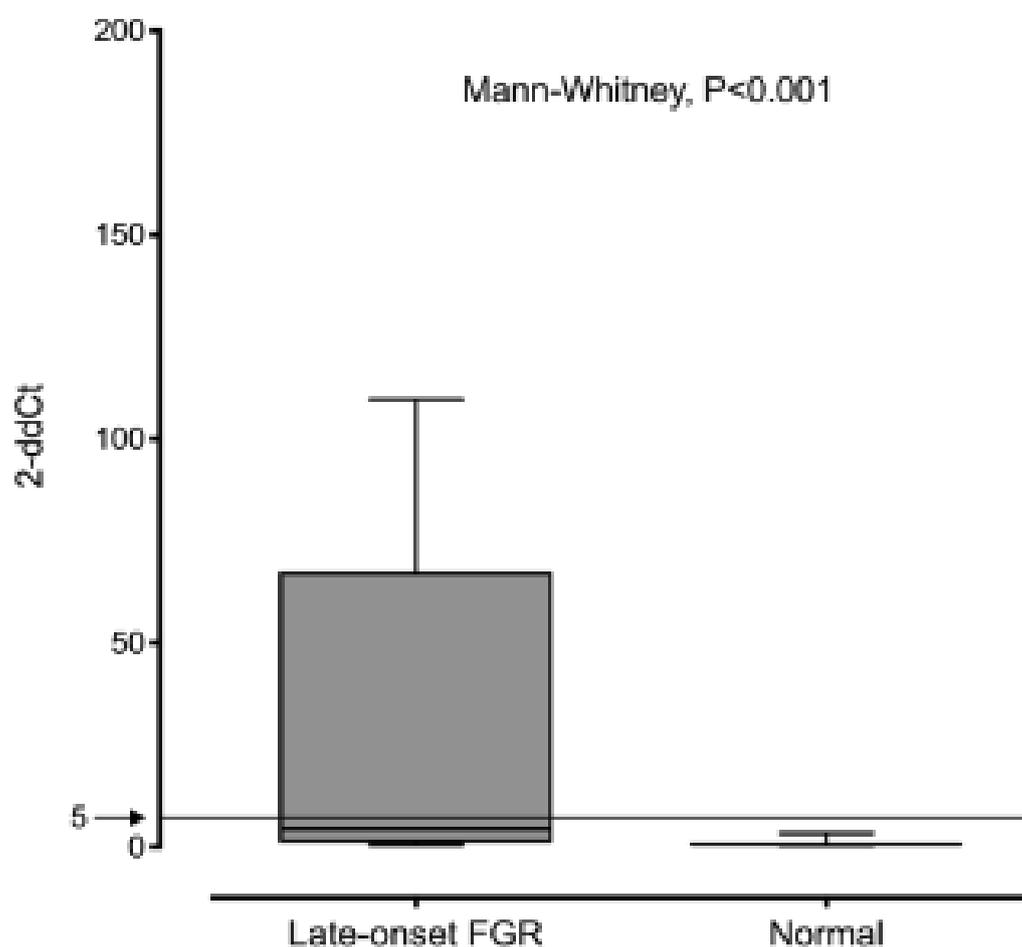


Figura 11. Box plot que muestra la expresión de miR-132-3p en fetos normales y en fetos afectados por la restricción del crecimiento de aparición tardía (Late-onset FGR)

En la figura 12 perdemos observar valores dispersos de la población de estudio representados según la relación cerebroplacentaria múltiplo de la mediana (CPR MoM) y la expresión de miR-132-3p (2-ddCt). Como se muestra en la figura no se detectó ninguna correlación entre la expresión de miR-132-3p y CPR MoM ($R^2 = 0,01$).

Las líneas representan la correlación lineal con su intervalo de confianza del 95%. La mayoría de los fetos del grupo normal presentaron expresiones de miR-132-3p inferiores a 5-2-ddCt.

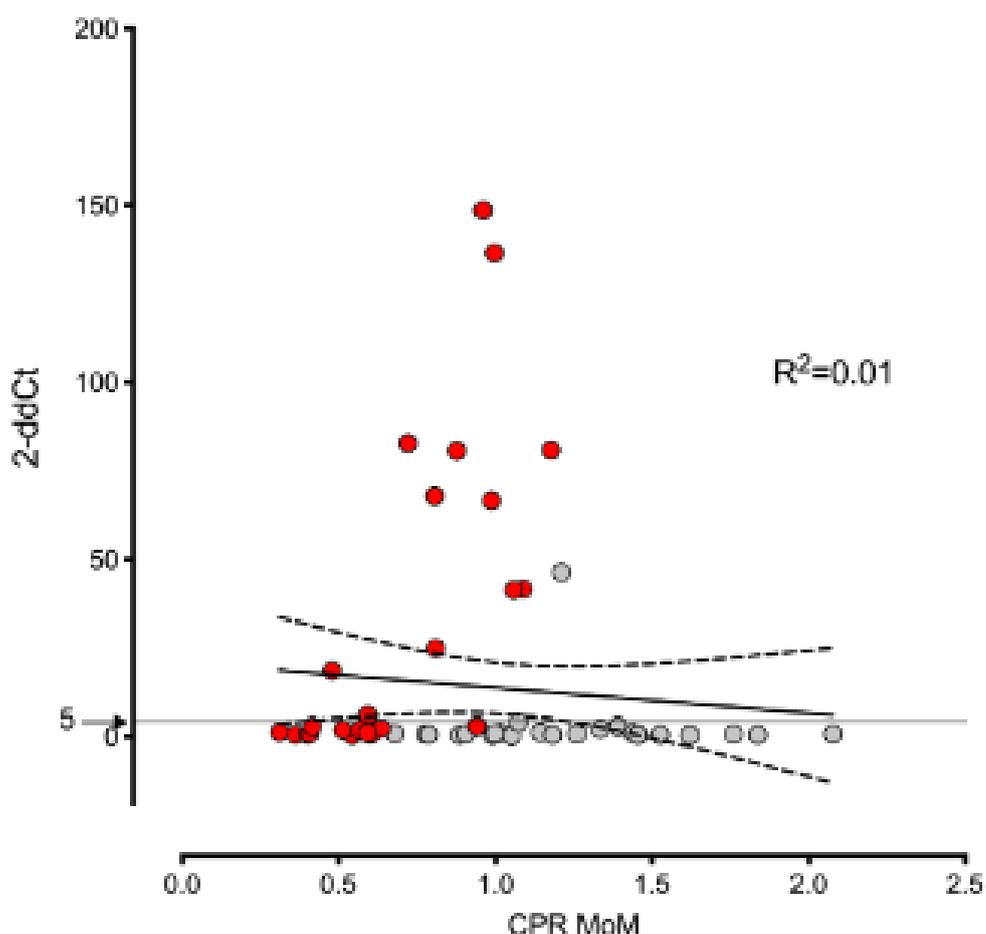


Figura 12. Valores dispersos de la población de estudio representados según la relación cerebroplacentaria múltiplo de la mediana (CPR MoM) y la expresión de miR-132 (2-ddCt).

La figura 13 muestra valores dispersos de la población de estudio representados según el centil de peso al nacer (BW) y la expresión de miR-132-3p (2-ddCt).

Se detectó una correlación entre la expresión de miR-132-3p y el percentil de peso al nacer ($R^2 = 0,26$).

Las líneas representan la correlación exponencial con su intervalo de confianza del 95%. La mayoría de los casos con sobreexpresión de miR-132-3p presentan centiles de peso corporal bajos. La mayoría de los fetos del grupo normal presentaban expresiones de miR-132-3p inferiores a 5 2-ddCt

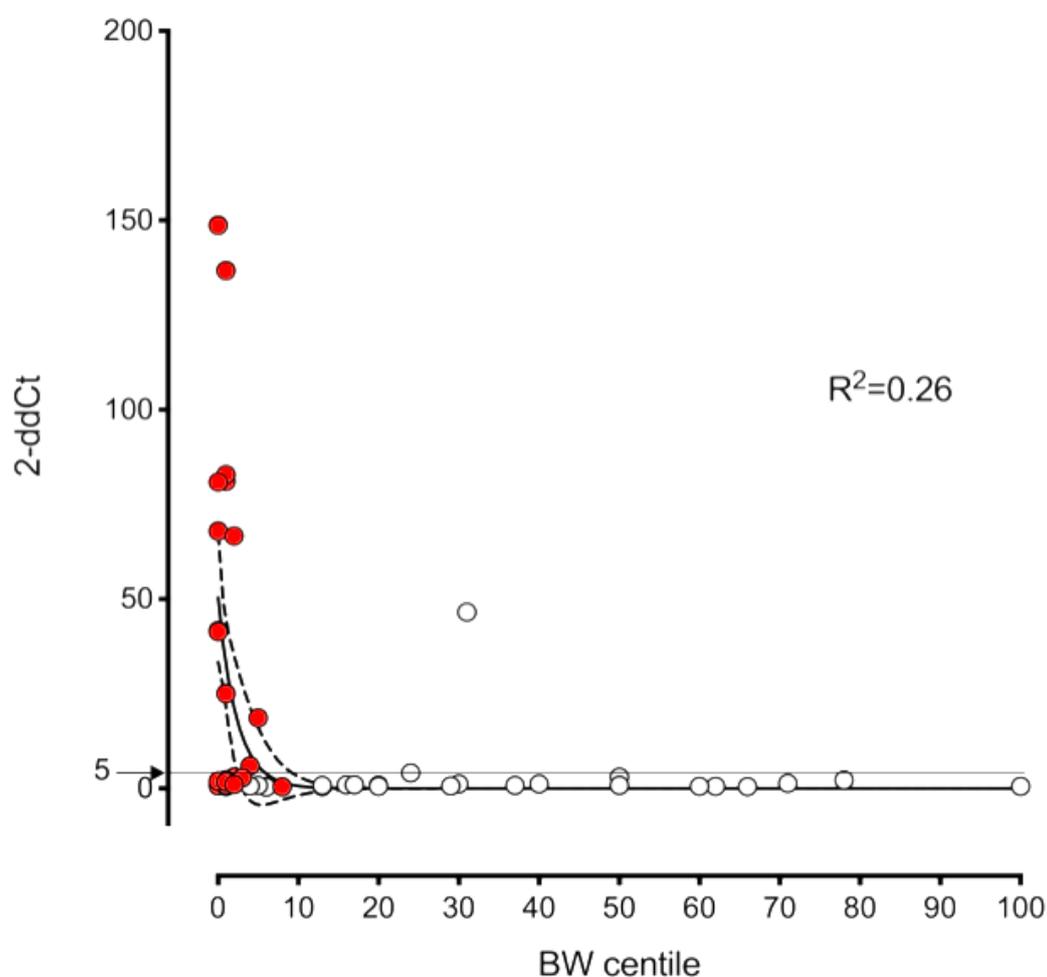


Figura 13. Valores dispersos de la población de estudio representados según el centil de peso al nacer (BW) y la expresión de miR-132 (2-ddCt).

En la tabla 7 se muestran las precisiones de varios modelos (simples y combinados) para el diagnóstico del compromiso fetal intraparto (CFI).

Los modelos que incluían sólo parámetros individuales presentaban áreas bajo la curva (AUC) pobres y no eran significativos, probablemente debido al bajo número de casos. En cuanto a los modelos combinados, sólo los que incluían la CPR MoM fueron significativos aunque con un AUC moderado (0,69, $p < 0,05$).

La adición de la expresión de miR-132-3p a la CPR MoM impresionó mejorar la detección del CFI con un AUC de 0,65 a 0,69, mientras que el efecto de la adición del centil de peso al nacer pareció ser nulo, lo que sugiere que la expresión de miR-132 más la CPR MoM fue la combinación óptima para la detección del compromiso fetal intraparto.

Modelo de regresión logística	AUC	Intervalo de confianza del 95%	p-value
miR-132 solo	0.60	0.40-0.80	NS
CPR MoM solo	0.65	0.47-0.82	NS
BW centile solo	0.64	0.46-0.81	NS
CPR MoM + miR-132	0.69	0.51-0.86	p < 0.05
CPR MoM + centil de peso al nacer	0.65	0.47-0.82	NS
miR-132 +centil de peso al nacer	0.62	0.45-0.80	NS
CPR MoM + centil de peso al nacer + miR-132	0.69	0.58-0.87	p < 0.05

Tabla 7. Precisión de varios modelos para la predicción del compromiso fetal intraparto.

Abreviaturas: AUC, áreas bajo la curva; IC, intervalo de confianza.

MIR-185-5P

Se realizó un análisis de regresión multivariable (figura 14) donde se observó que en comparación con fetos de crecimiento normal, los fetos con RCF tardía expresaron una regulación al alza de miR-185-5p ($2,26 \pm 1,30$ frente a $1,27 \pm 1,03$ $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $P = 0,011$)

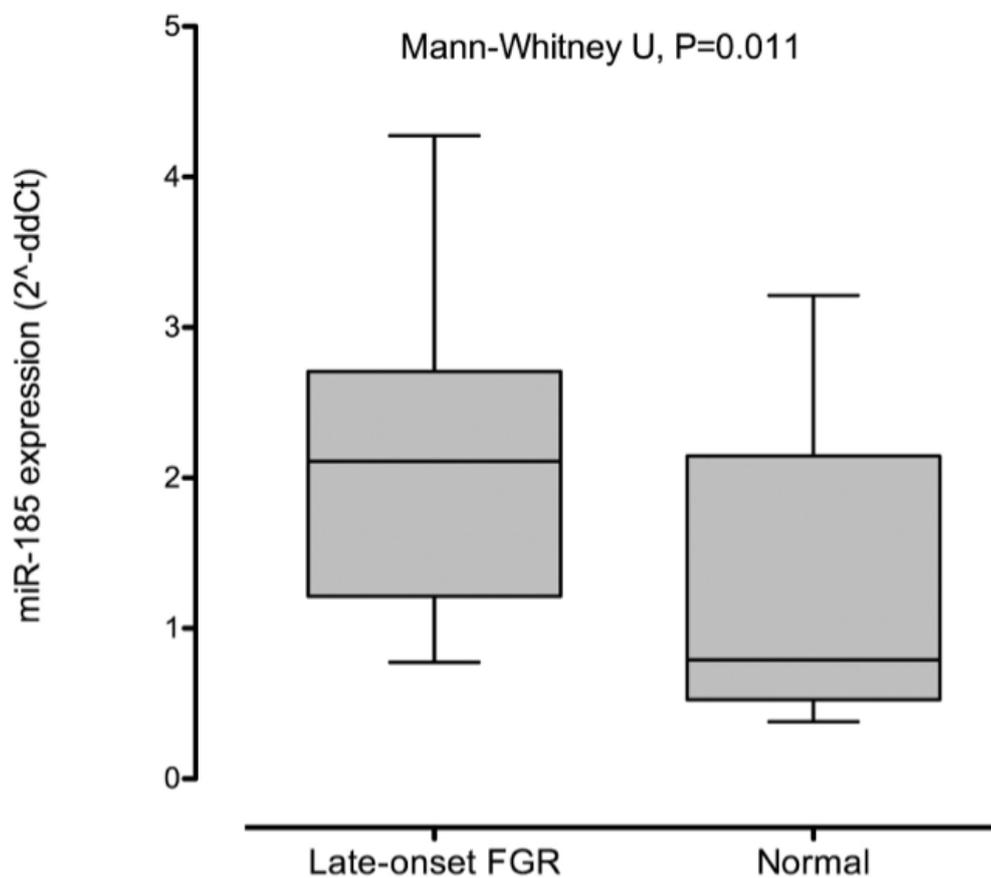


Figura 14. Box plot que muestra la expresión de miR-185-5p en los fetos con RCF y crecimiento normal.

La tabla 7 muestra el análisis de regresión lineal multivariable para la explicación de la expresión de miR-185-5p. Sólo la **CPR MoM** fue seleccionado como parámetro significativo ($P < 0,05$). Este hallazgo está en consonancia con la figura 15, a continuación, que muestra la fuerte correlación negativa entre la CPR MoM y la expresión de miR-185-5p ($R^2 = 0,21$, $P = 0,003$).

	Coefficiente	Error estándar	< 95%	> 95%	p-value
Intercepto	-47,48241	28,65608	-106,09067	11,12584	NS
Edad materna	0,0417	0,05059	-0,06177	0,14516	NS
Tabaco	0,056	0,51589	-0,99911	1,11112	NS
Peso materno	-0,01383	0,02881	-0,07276	0,0451	NS
Altura materna	0,02663	0,03469	-0,04432	0,09758	NS
Paridad	-0,47361	0,337	-1,16286	0,21563	NS
Sexo fetal (masculino)	-0,26901	0,42968	-1,14781	0,60979	NS
Centil de peso al nacimiento	0,00641	0,01245	-0,01904	0,03187	NS
Apgar 5 minutos	1,15989	0,78007	-0,43553	2,7553	NS
pH arterial umbilical	4,77121	3,59514	-2,58168	12,1241	NS
CPR MoM	-1,66819	0,81301	-3,33097	-0,0054	<0.05

Tabla 8. Modelo de regresión multivariable lineal para la predicción de expresión de miR-185-5p

Este hallazgo concuerda con la figura 15, que muestra la fuerte correlación negativa entre la CPR MoM y la expresión de miR-185-5p ($R^2=0,21$, $P=0,003$)

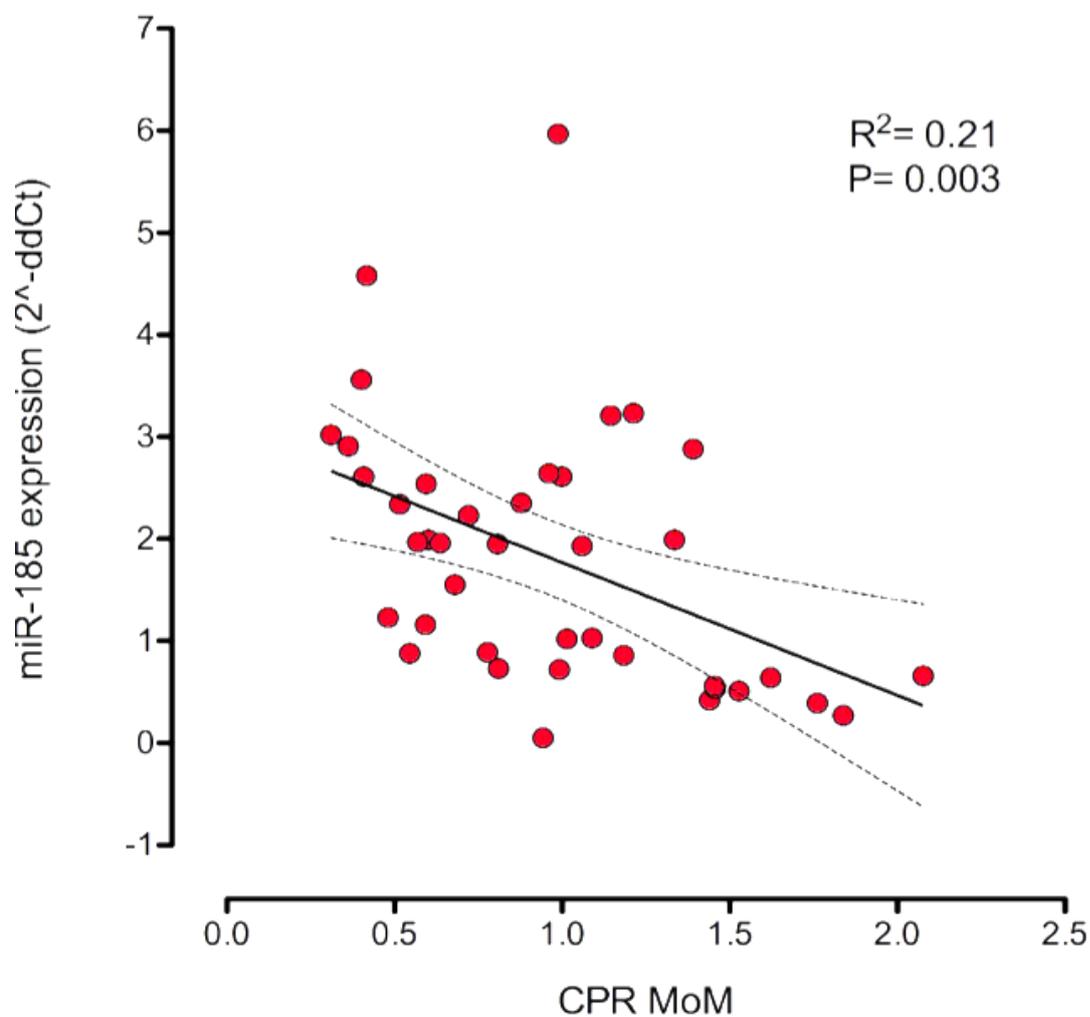


Figura 15. Diagrama de dispersión que representa la correlación entre la expresión de miR-185-5p (cambio de pliegue o 2^{-ddCt}) y la CPR MoM.

La red miRNA-genes creada red de factores de transcripción-diana, filtrada para los términos de función biológica GO “-muerte neuronal, -regulación de la biosíntesis de lípidos y su función de los procesos de biosíntesis de lípidos, -procesos cardíacos y -respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno” revelaron una subred altamente interconectada.

Para identificar los factores reguladores, esta subred se filtró por los genes incluidos en más de un término GO de interés. Los genes restantes siguen mostrando una alta interconectividad, incluso compartiendo interacciones con SREBP-2, que se ha indicado como diana de la proteína SREBP, que a su vez, se ha indicado como diana de miRNAs que trabajan sinérgicamente sinérgico de miRNAs. (Figura 16)

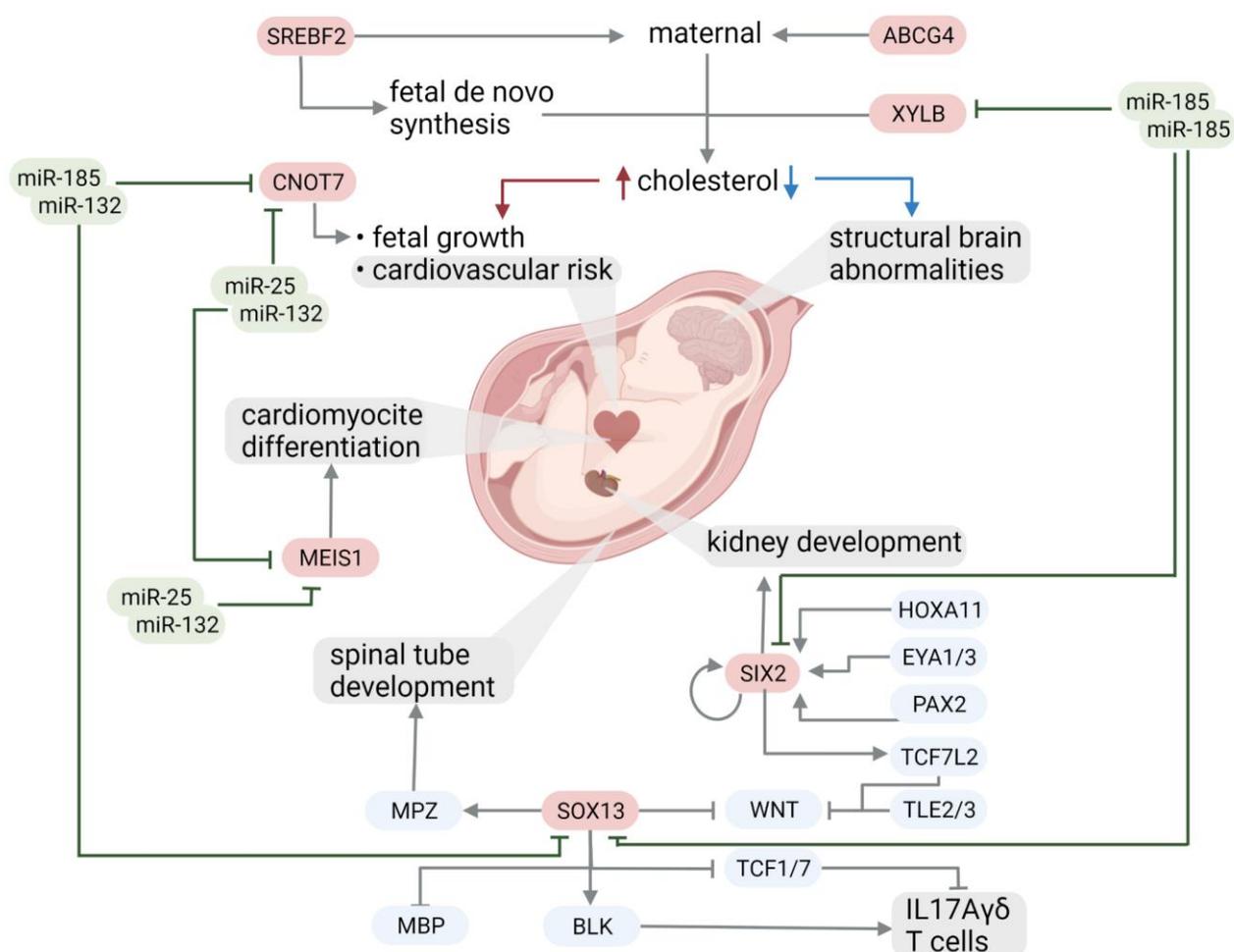


Figura 16. Red de dianas-factores de transcripción de miRNAs

6. PARTE 2: ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SANGRE MATERNA

6.1 VALIDACIÓN POR RT-QPCR DE MIRNA-25-3P, MIRNA-132-3P Y MIRNA-185-5P EN MUESTRAS DE SANGRE MATERNA

Una vez hallado los miRNAs expresados significativamente, se procedió validar los mismos en 30 muestras de sangre materna emparejadas con las muestras de cordón analizadas:

- 18 RCF-tardío
- 12 crecimiento normal

Se debe señalar que de las 48 muestras de sangre materna emparejadas con la sangre de cordón analizada previamente, 15 no pasaron el control de calidad por hemólisis y 3 no amplificaron en la PCR.

El análisis RT-qPCR demostró que la expresión diferencial de los miRNAs seleccionados, observada en la circulación fetal, NO persistía en las muestras maternas (Table 9)

miRNAs	RCF-tardío	Crecimiento Normal	p-value
miRNA-25-3p	1.15±0.72	1.26±0.84	n.s
miRNA-132-3p	1.02±0.62	1.36±1.10	n.s
miRNA-185-5p	1.20±0.84	1.33±0.91	n.s

Tabla 9. Expresión diferencial de miRNAs entre fetos con RCF y normales

6.2 ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO

En resumen, la media de la edad materna, la paridad y el índice de masa corporal fueron 31,8, 0,53 y 22,1 respectivamente.

La mayoría de los partos se iniciaron tras la inducción del parto (73,3%) y finalizaron con un parto vaginal espontáneo (60%), un 60% de ellos fueron fetos femeninos.

La EG media en el momento del examen y del parto fue de 37,6 y 38,5 semanas.

Por último, la mayoría de los neonatos nacieron sin incidencias y acompañaron a la madre a la maternidad (83,3%). (Tabla 10)

VARIABLES CONTINUAS	MEDIA(SD)	MEDIANA (1° Q, 3° cuartiles)
Edad materna (años)	31.8 (6.2)	31.5 (28.5, 37)
Paridad	0.53 (0.62)	0 (0, 1)
Índice de masa corporal	22.1(3.1)	21.9 (19.9, 24.2)
Edad gestacional al momento de la exploración (semanas)	37.6 (2.12)	37.7 (36.9, 39)
Edad gestacional al parto (semanas)	38.5 (1.6)	38.3 (37.5, 39.6)
Intervalo exploración-parto	3.9 (3.18)	3 (1, 6.2)
CPR MoM	0.82 (0.25)	0.88 (0.59,1.04)
Peso al nacimiento (g)	2476(515)	2555 (2138, 2778)
Centil de peso al nacimiento	7.9 (10.3)	3.5 (1,13.8)
VARIABLES CATEGÓRICAS	N (%)	
Tabaco	10 (33.3)	
Sexo fetal (masculino)	12 (40)	
Tipo de comienzo de parto		
Parto espontáneo	5 (16.6)	
Parto inducido	22 (73.3)	
Cesárea electiva	3 (10)	
Apgar <7 at 5 minutos	0 (0)	
pH Arterial < 7.10	0(0)	
Vía de parto		
Cesárea (RCTG anormal)	7 (23.3)	
Cesárea (distocia)	2 (6.6)	
Cesárea electiva	3 (10)	
Parto vaginal asistido	7 (23.3)	
Parto espontáneo	11(36.6)	
Destino del neonato		
Guarda materna	25 (83.3)	
Neonatología	4 (13,3)	
Cuidados intensivos neonatales	1 (3.33)	

Tabla 10. Estadística descriptiva de las 30 muestras de sangre materna validadas por RT-PCR.

En la figura 17 se puede apreciar la expresión de miR-25, miR-132 y miR-185 en muestras de sangre materna de ambos grupos. Los recuadros representan la mediana y el rango intercuartílico, mientras que los bigotes representan los centiles 90 y 10.

Al comparar los niveles de expresión para cada miRNA entre los 2 grupos de estudio (test U de Mann Withney), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los 3 miRNAs evaluados en las muestras de sangre maternas. (Tabla 9)

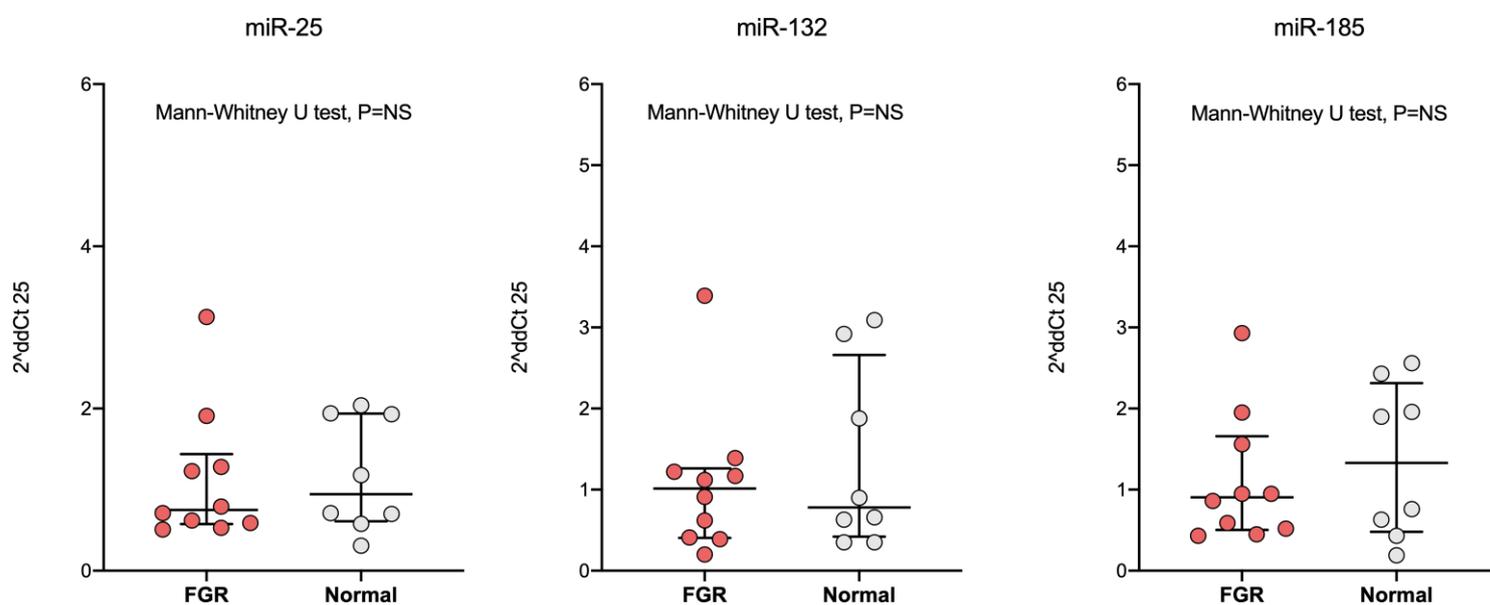


Figura 17. Expresión de miR-25, miR-132 y miR-185 en sangre materna en fetos normales y en fetos afectados con RCF tardío.

En la figura 18 se puede apreciar la expresión de miR-25, miR-132 y miR-185 en fetos normales y en fetos afectados de RCF tardío.

En este caso, se comparan los casos extremos (fetos con PC <3er centil y CPR MoM anormal frente a fetos con Circunferencia abdominal >10º centil y CPR MoM normal).

Los recuadros representan la mediana y el rango intercuartílico, mientras que los bigotes representan los centiles 90 y 10.

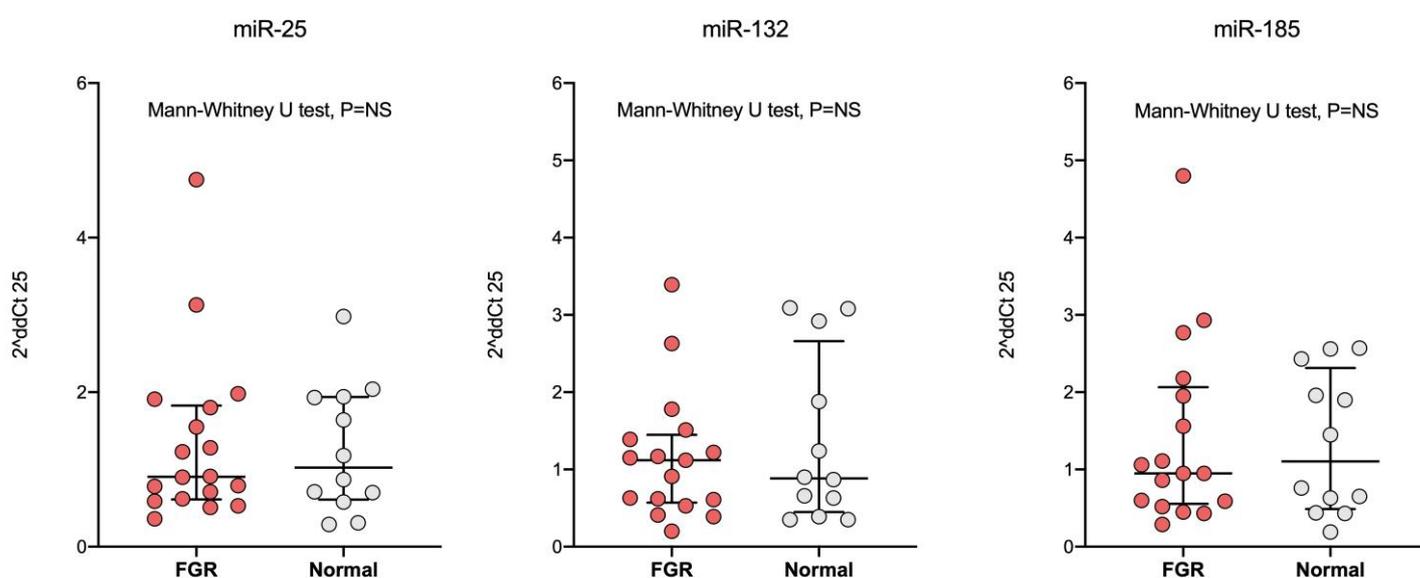


Figura 18. Comparación de la expresión de miR-25, miR-132 y miR-185 en fetos normales y en fetos afectados de RCF tardío.

6. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN

La influencia de un ambiente subóptimo durante el periodo fetal produce cambios epigenéticos que inducen patrones de expresión génica a corto y largo plazo favoreciendo la susceptibilidad a ciertas enfermedades crónicas (metabólicas, neurológicas, renales y cardiovasculares).

La presencia de micro-RNA circulante puede explicarse desde diferentes perspectivas, siendo las más aceptadas que sean parte de un mecanismo de comunicación intercelular, o que sean el resultado de la liberación del contenido celular al torrente sanguíneo como respuesta a lesión o daño celular.

En este estudio no solo intentamos hallar los marcadores de alteración del neurodesarrollo sino que hemos evaluado los miRNAs expresados diferencialmente entre los dos grupos y luego de realizarse el análisis funcional de los mismos, se observó que sus dianas estaban íntimamente relacionados con ciertas alteraciones descritas en la literatura en los fetos con restricción de crecimiento[163][164][165].

Principalmente describimos 3 de los miRNAs con expresión diferencial más significativa:

➤ miR-25-3p

Este miRNA forma parte del clúster miR-106b/25. Los tres miembros del clúster, miR-106b, miR-93 y miR-25, están implicados en la regulación de las helicasas de ADN que son esenciales en el inicio de la replicación del ADN en las células eucariotas [166].

El miR-25 se expresa en una gran variedad de tejidos, tipos de células y se dirige a muchos ARNm. Hay ARNm diana comunes de miR-25 en diferentes tejidos y tipos celulares que regulan el mismo proceso biológico. Los cambios de expresión de estos ARNm diana comunes podrían dar lugar a diferentes enfermedades que comparten mecanismos generales comunes[166].

En condiciones normales, muchos de los ARNm diana de miR-25 participan en procesos biológicos como “la respuesta al daño del ADN, la regulación del ciclo celular, la proliferación, la migración y la diferenciación celular, la regulación del estrés oxidativo, la inflamación, y el transporte del calcio en la célula.” Además, muchas de las moléculas diana de miR-25 se encuentran entre los componentes de la matriz extracelular y los receptores de membrana [167].

En condiciones fisiopatológicas, tanto la sobreexpresión como la represión de este miRNA han demostrado estar asociados al desarrollo de diferentes enfermedades como por ejemplo en muchos tipos de tumores, como cerebro, pulmón, mama y ovario[168][169][170][171], así como también, en muchas enfermedades tales infarto agudo de miocardio, la insuficiencia cardíaca [172], la diabetes mellitus, la nefropatía diabética[173] y tubulointersticial [174], y en la lesiones por isquemia/reperfusión cerebral [175].

Si analizamos con detalle los estudios relacionados al rol del miR 25, alrededor de un 60% han sido relacionados con enfermedades de la microvasculatura. Por lo que teniendo en cuenta la fisiopatología de la restricción fetal, no nos sorprende que este miRNA se encontrara desregulado en nuestro estudio.

Un ejemplo de estos cambios, es el remodelado vascular como consecuencia de la exposición a la hipoxia, ya sea en edades gestacionales tempranas o tardías que sufren los fetos con RCF [176]. En estudios post-mortem [160][161] de éstos fetos se ha observado un aumento en el grosor de la pared arterial (íntima-media). Este aumento del grosor de la pared arterial parece ser el resultado de la presión global y posiblemente de la sobrecarga de volumen en la circulación fetal, en la que el estrés de la pared vascular induce la hipertrofia de la capa íntima-media, afectando la homeostasis vascular y provocando una disfunción endotelial. [163][164].

Esto tiene relación con un estudio realizado para evaluar la función del miR-25 en la sistema vascular, que demostró que los niveles de expresión de miR 25-3p disminuían significativamente en las células musculares lisas vasculares en respuesta a un tratamiento con trombospondina-1, un factor clave en la migración de las células musculares lisas vasculares luego de una lesión vascular [177], lo que pone en evidencia que una alteración en

los niveles de expresión de este miRNA podrían contribuir al desarrollo de la aterosclerosis y la hiperplasia intimal.

Por otro lado, este miRNA ha sido relacionado por su rol en la remodelación cardíaca[178] [179][180]. Durante el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, un programa genético cardíaco fetal es activado por un conjunto definido de factores de transcripción como respuesta inicialmente adaptativa al estrés. La expresión anormal de las proteínas fetales incluye elementos contráctiles (por ejemplo, alfa-MHC, beta-MHC), componentes de la matriz ECM (por ejemplo, colágenos), transporte del calcio (por ejemplo, SERCA2a) y proteínas mitocondriales (por ejemplo, elementos oxidados de la cadena de transporte de electrones), etc. Estos cambios conducen a una respuesta inadaptada al estrés que da lugar al desarrollo de fibrosis, insuficiencia cardíaca y arritmias mortales[181][182].

Diversos estudios llevados a cabo en animales y humanos relacionaban este miRNA con la hipertrofia cardíaca. Por ejemplo, un estudio experimental en ratones demostró que la transfección de miR-25 en fibroblastos cardíacos aislados disminuyó la expresión de colágeno-1a2 [183]. Por el contrario, otro estudio demostró que la sobreexpresión de miR-25 en condiciones de hipoxia/reoxigenación inhibía la fibrosis y la apoptosis celular, además de revertir el bloqueo del ciclo celular[167].

La heterogeneidad de los resultados, nos demuestra que los miRNAs no solo pueden tener diferentes dianas sino que dependiendo del nivel de expresión pueden presentar diferente rol.

➤ miR-185-5p

El precursor de este miRNA consta de 82 nucleótidos y es la fuente de las dos moléculas maduras miR-185-5p y miR-185-3p; el gen está localizado en el cromosoma 22q11.21.

Un creciente número de estudios sugiere que miR-185 puede contribuir a regular una serie de enfermedades, como el trastorno del metabolismo de los lípidos, trastornos neurológico[184], la fibrosis hepática [185], la cardiomiopatía dilatada[186] y la fibrosis pulmonar [187] [167] y un importante rol en la patogénesis de cáncer del tracto digestivo.[188]. Además, el miR-185, también ha sido estudiado por su rol en la angiogénesis y la activación de los factores de crecimiento endotelial ante condiciones de hipoxia[189].

El desarrollo de la placenta humana implica la coordinación de la angiogénesis y el crecimiento de los trofoblastos, que se ven comprometidos en la restricción del crecimiento intrauterino. La angiogénesis adaptativa en las vellosidades placentarias con RCF es el resultado de un desequilibrio en la progresión ordenada del perfil de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento placentario y la angiopoyetina durante el desarrollo placentario. Los receptores de VEGF y el receptor de angiopoyetina Tie-2 se expresan en el trofoblasto, y su activación conduce a la proliferación del trofoblasto, la migración y la producción de óxido nítrico. Así pues, estos factores vasculares actúan como reguladores autocrinos del comportamiento de los trofoblastos en el desarrollo de la circulación útero/fetoplacentaria, una acción independiente de sus funciones bien establecidas en el endotelio vascular[190][191].

El VEGF es un factor específico del endotelio, que promueve no sólo la angiogénesis sino también la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares, el aumento de la permeabilidad vascular y la degeneración de la matriz extracelular[192]. Muchos estudios han identificado el VEGF como un factor angiogénico clave tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

El miR-185, ha sido identificado como un modulador de los niveles del VEGF y su receptor (VEGFR) bajo la influencia de los factores inducibles por hipoxia (HIF)[193]. Considerando que miR-185 inhibe la expresión de HIF y VEGF [194] mediante la inhibición de DICER, una ribonucleasa miembro de la familia de las ARNasasIII involucrada en la formación de un miRNA maduro, la regulación a la baja de miR-185 durante la hipoxia, inducirá la expresión de VEGF y, de esta manera, promoverá la angiogénesis, la neurogénesis y la proliferación celular.

Por el contrario, la sobreexpresión de miR-185 tendría el efecto contrario. Esto ha sido ampliamente estudiado por su rol en oncología. Dado que el crecimiento tumoral y la apoptosis dependen en gran medida de la angiogénesis, se ha propuesto que la terapia con miR-185 sea un inhibidor de la angiogénesis y, por tanto, de la proliferación tumoral, convirtiendo a miR-185 en un supresor tumoral [194][195][196].

Nuestros resultados mostraron que los fetos con RCF presentaban una "regulación al alza". A priori, esto podría parecer una contradicción con trabajos anteriores que sugerían que la regulación a la baja de miR-185 durante la hipoxia promovía la angiogénesis del VEGF y la

protección neuronal. Sin embargo, esto podría no ser absolutamente cierto, ya que el mecanismo por el que miR-185 y VEGF interactúan podría depender del tejido afectado y/o nivel de hipoxia.

Ejemplos de que la respuesta podría depender del tejido afectado es en el cáncer colorrectal, en el que la sobreexpresión de miR-185 reduce la supervivencia, un fenómeno que suele estar relacionado con el aumento de la angiogénesis [197], el carcinoma renal de células claras, en el que la regulación al alza de miR-185 se asocia a una mayor expresión de VEGFR-2 y a una mayor densidad de microvasos[198] y también el carcinoma de células escamosas, en el que se ha descubierto que la hipoxia disminuye el VEGF[199]. Además, “Huayu Tongmai”, un compuesto herbal chino capaz de tratar la angiopatía diabética, ejerce su efecto antiapoptótico en las células endoteliales mediante la sobreexpresión de miR-185 [200].

Un ejemplo de que la respuesta podría depender del nivel de hipoxia sería la acción del VEGF en los pulmones. La hipoxia relativa activa HIF-2 α , promoviendo la secreción de VEGF, el desarrollo y la maduración del pulmón. Sin embargo, la hipoxia crónica inactiva HIF-1 α y 2 α disminuyendo la expresión de VEGF y VEGFR y perjudicando la maduración y producción de surfactante [201].

Por lo tanto, el aumento de los niveles de VEGF en el cordón umbilical descrito anteriormente durante la hipoxia[202] podría ser también compatible con la regulación al alza de miR-185.

Además, estudios realizados en células endoteliales de la vena umbilical humana demostraron que el aumento de expresión de miR-185-5p reducía la proliferación, la migración y la formación de tubos de las células endoteliales y, a la inversa, su expresión a la baja aumentaba la proliferación, la migración y la formación de tubos de las células endoteliales[203].

En un estudio experimental en pacientes con la enfermedad de Parkinson, se observó que la sobreexpresión de miR-185 inhibe la autofagia y la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas y que ésto podría prevenir el desarrollo de la enfermedad [204].

Por otra parte, hallazgos más recientes han revelado que el VEGF también tiene efectos directos sobre las células neuronales, ya que los receptores del VEGF están presentes en estas células. Se ha observado en modelos animales que el deterioro de la expresión del VEGF conduce a la manifestación de signos de degeneración de las neuronas motoras [192]. Por lo

tanto, la disminución de los niveles de VEGF limitaría la perfusión del tejido neural y la protección neural del feto, lo que provocaría trastornos neuronales.

➤ miR-132-3p

Como se ha explicado en el apartado de resultados, si bien este miRNA no ha sido resultado directo de la secuenciación de la sangre de cordón umbilical decidimos realizar un análisis del mismo por la fuerte evidencia descrita en la literatura de su asociación con el desarrollo neuronal. Este miRNA proviene de la familia del cluster miR-212/132 y su papel fundamental se relaciona con la regulación de varias vías de señalización en el desarrollo neuronal (morfogénesis neuronal y plasticidad sináptica)[137][205]. Por otro lado ha sido investigado por su papel en la carcinogénesis de tumores sólidos [206] y en la regulación de la hipertrofia cardíaca y la autofagia en los cardiomiocitos [207][208] y se relaciona con diferentes condiciones anormales en el tejido hepático[209] y adiposo[210].

La producción de miR-132 es crucial para la función neuronal y se incrementa siempre que el tejido neuronal se ve amenazado, no sólo por la hipoxia fetal[211][212] sino también por otros agentes nocivos como la bupivacaína[213], o el valproato. En este sentido, a pesar de que los mecanismos de estimulación de miR-132 no se han descrito completamente, parece ser un punto final común para diferentes vías de protección, como las que actúan mediante acetilcolina [214], la melatonina[214][215] y especialmente los factores neurotróficos derivados del cerebro (BDNF).[216][217].

En nuestro estudio, cuando se realizó el análisis de expresión ha llamado la atención su sobreexpresión significativa en los fetos con RCF. Sin embargo al realizar un análisis de asociación de este miRNA con los parámetros clínicos, solo se observó asociación con el percentil de peso corporal y no así con los parámetros Doppler (CPR MoM) que de alguna manera esperábamos que ocurriese para elegir a este miRNA como biomarcador del neurodesarrollo.

Una posible explicación de esta aparente incongruencia podría ser la existencia de diferentes fuentes de expresión de miR-132, no necesariamente el cerebro en relación directa con la vasodilatación cerebral. La evidencia acumulada indica que los miRNAs se secretan en exosomas o formas encapsuladas en microvesículas [218][219] o se liberan en formas libres de vesículas unidas a proteínas. Además, como se describió anteriormente la producción de miR-132 también se ha relacionado con la actividad hepática, cardíaca, y del tejido adiposo, que

también son fuentes plausibles de producción de miR-132 en fetos con RCF. Por lo tanto, los niveles sanguíneos de miR-132 no tienen por qué reflejar la actividad de miR-132 en el cerebro, que puede ser de hecho un objetivo de producción externa, también podrían ser el resultado de la producción de miR-132 en diferentes lugares.

Otro hallazgo importante en nuestro estudio fue el hallazgo de la acción sinérgica de miR-185-5p y miR-25-3p (figura 10). La identificación de los miRNAs que trabajan de forma sinérgica reveló dos dianas de interés SREBF2 y ABCG4 y como se ha dicho antes, ambos involucrado en la biosíntesis y homeostasis del colesterol.

Esto nos resultó novedoso ya que hasta el momento, sólo se han identificado y confirmado unos pocos casos de regulación sinérgica de dianas por miRNAs cooperantes[220][161].

Como se ha mencionado previamente los pares de miRNAs pueden regular sinérgicamente las dianas mutuas para facilitar una represión más eficaz de la diana, un posible mecanismo sofisticado de regulación de las dianas de miRNA.[160][161].

Esto es de gran importancia ya que, la expresión selectiva de miRNAs cooperantes podría ser adoptada por las células para facilitar patrones de expresión génica distintivos y afinados para satisfacer los requerimientos en diferentes escenarios biológicos. Tampoco es casualidad que su acción cooperante esté relacionada con la biosíntesis y homeostasis de colesterol, ambas cruciales en el desarrollo fetal[221].

El feto tiene dos formas de regular el colesterol, una por el paso a través de la barrera placentaria y la otra por la síntesis fetal "de novo". Estudios anteriores han demostrado que, en la RCF, la reducción del colesterol se debe sobre todo a una disminución de su síntesis[222]. La proteína de unión al elemento de respuesta al esterol (SREBP)-2 es un factor de transcripción que desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo del colesterol mediante el control de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de novo del colesterol y la captación de LDL[222].

Los estudios sobre miR-185-5p han demostrado que su sobreexpresión en células hepáticas reprime la expresión y el nivel de SREBP-2, la captación de LDL y la actividad de la HMG-CoA reductasa[223][224]. También hemos encontrado mismas dianas entre miR-132-3p y miR-25-3p, por ejemplo, ambos tienen como diana al gen MEIS1, implicado principalmente en la diferenciación de los cardiomiocitos y la hipertrofia del músculo cardíaco.

En la figura 16 podemos ver la interacción de los miRNAs seleccionados, sus dianas y las funciones anteriormente descritas[225].

Al realizar un análisis de asociación pudimos observar que la adición de la expresión de miR-132 a la CPR MoM podría mejorar la detección del compromiso fetal intraparto o que la expresión de miR 185-5p muestra una fuerte correlación negativa con la CPR MoM, pero estos datos no son reproducibles, al menos en este momento, en la práctica clínica por que los valores de expresión de éstos miRNAs fueron obtenidos del sangre de cordón umbilical; y la cordocentesis es una técnica invasiva que está reservada para casos particulares, ya que no está exenta de riesgos.

En una segunda parte del estudio y habiendo encontrado una gran asociación entre la fisiopatología de la restricción de crecimiento y los miRNAs hallados en el cordón umbilical, procedimos a buscar éstos mismos en muestras de sangre materna pareadas con las muestras de cordón analizadas para poder analizar la interacción materno-fetal de éstos factores epigenéticos.

La interacción materno-fetal representa, no solo, una comunicación hormonal y metabólica sino también inmunológica coordinada y bidireccional entre dos seres vivos. Parte de esta interacción está mediada por los cambios epigenéticos que se producen a lo largo del embarazo, causados por factores ambientales que influyen en la unidad materno-fetal desde el inicio de la gestación[226][227][228]. En este sentido, el descubrimiento de que la placenta es una fuente importante de ácidos nucleicos fetales, que se liberan constantemente en la sangre materna desde la implantación nos ha permitido pensar en la posibilidad de que los miRNAs hallados en sangre de cordón podían estar presentes en la sangre materna.

Diferentes estudios han demostrado que los miRNAs placentarios que se producen en las células del trofoblasto, pueden ser exportados tanto a la circulación fetal como a la materna [229][230][231]. Lamentablemente, nuestros resultados muestran que los diferentes perfiles de expresión de varios miRNA observados en la sangre fetal no persisten en la circulación materna.

Posiblemente, porque a pesar de la existencia de una transferencia bien conocida de miRNA entre la sangre fetal y materna, las diferencias de concentración en el lado fetal causadas por la secreción específica de órganos fetales no pueden trasladarse completamente a la circulación materna.

Esto podría ser explicado que mientras que la liberación de miRNA de los trofoblastos al compartimento materno es directa y no requiere atravesar otras capas tisulares, el tráfico de los trofoblastos al compartimento fetal y viceversa requiere atravesar la membrana basal y las células endoteliales.

Esta evidencia ha sido apoyada en varios estudios. Por ejemplo en un estudio llevado a cabo por Mouillet et al.[111] no han observado diferencias significativas en los niveles circulantes de miRNA específicos de la placenta (mir-517a y miR-518b) en muestras de plasma materno de embarazos con evolución normal y embarazos con RCF. Los estudios de Hromadnikova et al. [232] tampoco observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos maternos de miRNA específicos de la placenta (miR-520a, 520h, 525, 526a, 516-5p, 517 y 518b) entre embarazos de evolución normal y aquellos con RCF clínicamente establecido.

Por otro lado, un estudio reciente donde se analizó el patrón de expresión en plasma materno y fetal de los miRNAs C19MC[233] descubrió que los miRNAs C19MC en plasma materno y fetal eran menos abundantes pero mostraban una mayor varianza que su patrón de expresión en la placenta. Además, no había correlación entre el nivel total de miRNAs C19MC en la placenta y su nivel en el plasma materno y fetal [233]. Esto podría explicar una posible hipótesis de que la disfunción de la placenta conocida en la restricción de crecimiento sería el causante de la atenuación la biogénesis de miRNA, alterando su posterior liberación en el plasma.

Los patrones de expresión de los miRNAs difieren para tejidos específicos y estados de diferenciación. No siempre está claro si los patrones de miRNA alterados son la causa directa de la patología o más bien un efecto indirecto de los cambios en el fenotipo celular [100]. Por lo que antes de que estos miRNAs se utilicen clínicamente como biomarcadores de complicaciones maternas o fetales, es importante entender el origen de estos miRNAs y la forma en la que se regula su producción; y comprender los motivos en las diferencias de concentración entre los compartimentos.

7. CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Nuestro estudio ha permitido no solo poner en evidencia los cambios moleculares que se producen en la restricción de crecimiento tardía sino también comprender de qué manera muchas de las afecciones del adulto tienen su origen en la vida intrauterina.

Por otro lado el análisis de los miRNAs nos ha permitido concluir:

1. Los fetos con RCF tardío expresan un perfil de miRNA en sangre de cordón umbilical diferente, que incluye la sobreexpresión de miR-25-3p, miR-185-5p y miR-132-3p.
2. El análisis de las vías y la ontología génica reveló una sobrerrepresentación de ciertas vías moleculares asociadas al desarrollo cardíaco y la muerte neuronal. Además, la priorización de miRNAs sinérgicos puso de manifiesto la importancia de miR-185-5p y miR-25-3p en el metabolismo de colesterol.
3. La mayoría de los casos con sobreexpresión de miR-132-3p presentan centiles de peso corporal bajos lo que explicaría una correlación entre la expresión de miR-132-3p y el percentil de peso al nacer.
4. La sobreexpresión de miR-185-5p está inversamente correlacionada con CPR MoM y su papel fundamental está relacionado con la respuesta a la hipoxia que modula el metabolismo del VEGF y la plasticidad neuronal.
5. El perfil diferencial de miRNA observado en la sangre de los fetos con RCF no se transmite significativamente a través de la placenta y, por lo tanto, no puede detectarse mediante muestras de sangre materna; y
Por el momento, la sobreexpresión de miRNAs hallada en sangre de cordón umbilical no es reproducible en la práctica clínica ya que al ser aislados en sangre de cordón umbilical, la {única manera de reproducir estos resultados intraútero sería con cordocentesis, y ésta, es una técnica no exenta de complicaciones fetales.
6. La investigación futura dirigida debe centrarse en perfiles diferenciales de miRNAs específicos en sangre materna.
7. Se necesitan más trabajos para evaluar sus niveles en la sangre materna con el fin de valorar si podría mejorar la comprensión de la RCF de aparición tardía y la predicción de la discapacidad neurocognitiva.

CONTINUACIÓN DEL ESTUDIO

Los métodos presentados y los resultados obtenidos en esta tesis nos han permitido realizar un nuevo enfoque en la investigación, esta vez, centrada directamente en el análisis de las muestras de sangre materna, ya que con este trabajo concluimos que el perfil diferencial de miRNA observado en la sangre de los fetos con RCF tardío no se transmite significativamente a través de la placenta y no puede verse reflejado en el análisis de sangre materna.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. J. Barker, 'The fetal and infant origins of adult disease.', *BMJ*, vol. 301, no. 6761, pp. 1111–1111, Nov. 1990, doi: 10.1136/bmj.301.6761.1111.
- [2] D. J. . Barker, C. Osmond, P. . Winter, B. Margetts, and S. . Simmonds, 'WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE', *Lancet*, vol. 334, no. 8663, pp. 577–580, Sep. 1989, doi: 10.1016/S0140-6736(89)90710-1.
- [3] D. J. Barker, A. R. Bull, C. Osmond, and S. J. Simmonds, 'Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life.', *BMJ*, vol. 301, no. 6746, pp. 259–262, Aug. 1990, doi: 10.1136/bmj.301.6746.259.
- [4] A. Seremak-Mrozikiewicz, M. Barlik, and K. Drews, 'Fetal programming as a cause of chronic diseases in adult life', *Polish Gynaecol.*, vol. 85, no. 1, 2014, doi: 10.17772/gp/1689.
- [5] P. D. Gluckman, M. A. Hanson, C. Cooper, and K. L. Thornburg, 'Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease', *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 1, pp. 61–73, Jul. 2008, doi: 10.1056/NEJMra0708473.
- [6] L. Rasmussen *et al.*, 'The Impact of Lifestyle, Diet and Physical Activity on Epigenetic Changes in the Offspring—A Systematic Review', *Nutrients*, vol. 13, no. 8, p. 2821, Aug. 2021, doi: 10.3390/nu13082821.
- [7] 'Practice Bulletin No. 134', *Obstet. Gynecol.*, vol. 121, no. 5, pp. 1122–1133, May 2013, doi: 10.1097/01.AOG.0000429658.85846.f9.
- [8] J. F. Frøen, J. O. Gardosi, A. Thurmann, A. Francis, and B. Stray-Pedersen, 'Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death', *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, vol. 83, no. 9, pp. 801–807, Sep. 2004, doi: 10.1111/j.0001-6349.2004.00602.x.
- [9] J. Gardosi, T. Mul, M. Mongelli, and D. Fagan, 'Analysis of birthweight and gestational age in antepartum stillbirths', *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 105, no. 5, pp. 524–530, May 1998, doi: 10.1111/j.1471-0528.1998.tb10153.x.
- [10] C. V. Ananth and A. M. Vintzileos, 'Distinguishing pathological from constitutional small for gestational age births in population-based studies', *Early Hum. Dev.*, vol. 85, no. 10, pp. 653–658, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2009.09.004.
- [11] S. Savchev, F. Figueras, R. Cruz-Martinez, M. Illa, F. Botet, and E. Gratacos, 'Estimated weight centile as a predictor of perinatal outcome in small-for-gestational-age

- pregnancies with normal fetal and maternal Doppler indices', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 39, no. 3, pp. 299–303, Mar. 2012, doi: 10.1002/uog.10150.
- [12] O. M. Turan *et al.*, 'Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 32, no. 2, pp. 160–167, Aug. 2008, doi: 10.1002/uog.5386.
- [13] F. Figueras *et al.*, 'Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: longitudinal changes in ductus venosus and aortic isthmus flow', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 33, no. 1, pp. 39–43, Jan. 2009, doi: 10.1002/uog.6278.
- [14] J. Morales-Roselló and A. Khalil, 'Fetal cerebral redistribution: a marker of compromise regardless of fetal size', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 46, no. 4, pp. 385–388, Oct. 2015, doi: 10.1002/uog.15664.
- [15] F. Figueras and E. Gratacós, 'Update on the Diagnosis and Classification of Fetal Growth Restriction and Proposal of a Stage-Based Management Protocol', *Fetal Diagn. Ther.*, vol. 36, no. 2, pp. 86–98, 2014, doi: 10.1159/000357592.
- [16] R. Hershkovitz, J. C. P. Kingdom, M. Geary, and C. H. Rodeck, 'Fetal cerebral blood flow redistribution in late gestation: identification of compromise in small fetuses with normal umbilical artery Doppler', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 15, no. 3, pp. 209–212, Mar. 2000, doi: 10.1046/j.1469-0705.2000.00079.x.
- [17] F. M. Severi *et al.*, 'Uterine and fetal cerebral Doppler predict the outcome of third-trimester small-for-gestational age fetuses with normal umbilical artery Doppler', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 19, no. 3, pp. 225–228, Mar. 2002, doi: 10.1046/j.1469-0705.2002.00652.x.
- [18] D. Oros, F. Figueras, R. Cruz-Martinez, E. Meler, M. Munmany, and E. Gratacos, 'Longitudinal changes in uterine, umbilical and fetal cerebral Doppler indices in late-onset small-for-gestational age fetuses', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 37, no. 2, pp. 191–195, Feb. 2011, doi: 10.1002/uog.7738.
- [19] F. Crovetto *et al.*, 'First-trimester screening with specific algorithms for early- and late-onset fetal growth restriction', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 48, no. 3, pp. 340–348, Sep. 2016, doi: 10.1002/uog.15879.
- [20] T. C. Chang, S. C. Robson, J. A. D. Spencer, and S. Gallivan, 'Prediction of perinatal morbidity at term in small fetuses: comparison of fetal growth and Doppler ultrasound', *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 101, no. 5, pp. 422–427, May 1994,

- doi: 10.1111/j.1471-0528.1994.tb11916.x.
- [21] P. Vergani *et al.*, 'Doppler predictors of adverse neonatal outcome in the growth restricted fetus at 34 weeks' gestation or beyond', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 189, no. 4, pp. 1007–1011, Oct. 2003, doi: 10.1067/S0002-9378(03)00836-6.
- [22] M. Parra-Saavedra *et al.*, 'Placental findings in late-onset SGA births without Doppler signs of placental insufficiency', *Placenta*, vol. 34, no. 12, pp. 1136–1141, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.placenta.2013.09.018.
- [23] R. J. Morrow, S. L. Adamson, S. B. Bull, and J. W. Knox Ritchie, 'Effect of placental embolization on the umbilical arterial velocity waveform in fetal sheep', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 161, no. 4, pp. 1055–1060, Oct. 1989, doi: 10.1016/0002-9378(89)90783-7.
- [24] J. Morales-Roselló, S. Buongiorno, G. Loscalzo, B.-R. Villarroya Alfonso, D. Hervas-Marín, and A. Perales-Marín, 'Mathematical simulation of Doppler changes in late-onset smallness; progression patterns of cerebral and umbilical anomalies define two types of late-onset fetal growth restriction', *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 34, no. 17, Sep. 2021, doi: 10.1080/14767058.2019.1671346.
- [25] R. S. Thompson and R. J. Stevens, 'Mathematical model for interpretation of doppler velocity waveform indices', *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 27, no. 3, pp. 269–276, May 1989, doi: 10.1007/BF02441484.
- [26] Y. Tian and X. Yang, 'A Review of Roles of Uterine Artery Doppler in Pregnancy Complications', *Front. Med.*, vol. 9, Mar. 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.813343.
- [27] R. Cruz-Martinez *et al.*, 'Cerebral blood perfusion and neurobehavioral performance in full-term small-for-gestational-age fetuses', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 201, no. 5, pp. 474.e1-474.e7, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.ajog.2009.05.028.
- [28] P. Arbeille *et al.*, 'Assessment of the fetal Po₂ changes by cerebral and umbilical Doppler on lamb fetuses during acute hypoxia', *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 21, no. 7, pp. 861–870, 1995, doi: 10.1016/0301-5629(95)00025-M.
- [29] J. Morales-Roselló, A. Khalil, M. Morlando, A. Papageorghiou, A. Bhide, and B. Thilaganathan, 'Changes in fetal Doppler indices as a marker of failure to reach growth potential at term', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 43, no. 3, pp. 303–310, Mar. 2014, doi: 10.1002/uog.13319.
- [30] J. Morales-Roselló and A. Khalil, 'Fetal cerebroplacental ratio and adverse perinatal

- outcome', *J. Perinat. Med.*, vol. 44, no. 3, Jan. 2016, doi: 10.1515/jpm-2016-0040.
- [31] G. Ghosh and S. Gudmundsson, 'Uterine and umbilical artery Doppler are comparable in predicting perinatal outcome of growth-restricted fetuses', *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 116, no. 3, pp. 424–430, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.02057.x.
- [32] F. Crispi, F. Crovetto, and E. Gratacos, 'Intrauterine growth restriction and later cardiovascular function', *Early Hum. Dev.*, vol. 126, pp. 23–27, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.013.
- [33] P. Tsyvian, K. Malkin, and J. W. Wladimiroff, 'Assessment of fetal left cardiac isovolumic relaxation time in appropriate and small-for-gestational-age fetuses', *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 739–743, Jan. 1995, doi: 10.1016/0301-5629(95)00016-K.
- [34] F. Crispi, F. Crovetto, M. Rodríguez-López, Á. Sepúlveda-Martínez, J. Miranda, and E. Gratacós, 'Postnatal persistence of cardiac remodelling and dysfunction in late fetal growth restriction', *Minerva Obstet. Gynecol.*, May 2021, doi: 10.23736/S2724-606X.21.04823-5.
- [35] F. Crispi, J. Miranda, and E. Gratacós, 'Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 218, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.ajog.2017.12.012.
- [36] L. Bjarkø, D. Fugelseth, N. Harsem, T. Kiserud, G. Haugen, and E. Nestaas, 'Cardiac morphology in neonates with fetal growth restriction', *J. Perinatol.*, Oct. 2022, doi: 10.1038/s41372-022-01538-8.
- [37] M. Rodríguez-López *et al.*, 'Descriptive analysis of different phenotypes of cardiac remodeling in fetal growth restriction', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 50, no. 2, pp. 207–214, Aug. 2017, doi: 10.1002/uog.17365.
- [38] T. T. N. Nguyen *et al.*, 'Assessment of myocardial performance index in late-onset fetal growth restriction.', *Nagoya J. Med. Sci.*, vol. 83, no. 2, pp. 259–268, May 2021, doi: 10.18999/nagjms.83.2.259.
- [39] S. D. Chernausk, 'Update: Consequences of Abnormal Fetal Growth', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 3, pp. 689–695, Mar. 2012, doi: 10.1210/jc.2011-2741.
- [40] M. Tsubahara *et al.*, 'Glucose metabolism soon after birth in very premature infants

- with small- and appropriate-for-gestational-age birth weights', *Early Hum. Dev.*, vol. 88, no. 9, pp. 735–738, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2012.03.003.
- [41] M. Aoki, T. Urakami, N. Nagano, R. Aoki, and I. Morioka, 'Association of Plasma Cortisol Levels with Gestational Age and Anthropometric Values at Birth in Preterm Infants', *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 19, no. 18, p. 11448, Sep. 2022, doi: 10.3390/ijerph191811448.
- [42] E. A. Osterholm, C. E. Hostinar, and M. R. Gunnar, 'Alterations in stress responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in small for gestational age infants', *Psychoneuroendocrinology*, vol. 37, no. 10, pp. 1719–1725, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.03.005.
- [43] A. A. Baschat, 'Neurodevelopment after Fetal Growth Restriction', *Fetal Diagn. Ther.*, vol. 36, no. 2, pp. 136–142, 2014, doi: 10.1159/000353631.
- [44] J. I. P. de Vries, G. H. A. Visser, E. J. H. Mulder, and H. F. R. Prechtl, 'Diurnal and other variations in fetal movement and heart rate patterns at 20–22 weeks', *Early Hum. Dev.*, vol. 15, no. 6, pp. 333–348, Nov. 1987, doi: 10.1016/0378-3782(87)90029-6.
- [45] F. A. Manning, 'FETAL BIOPHYSICAL PROFILE', *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, vol. 26, no. 4, pp. 557–577, Dec. 1999, doi: 10.1016/S0889-8545(05)70099-1.
- [46] D. Arduini, G. Rizzo, C. Giorlandino, H. Valensise, S. Dell'Acqua, and C. Romanini, 'The development of fetal behavioural states: A longitudinal study', *Prenat. Diagn.*, vol. 6, no. 2, pp. 117–124, Mar. 1986, doi: 10.1002/pd.1970060207.
- [47] J. van Eyck, J. W. Wladimiroff, M. J. Noordam, H. M. Tonge, and H. F. R. Prechtl, 'The blood flow velocity waveform in the fetal descending aorta: its relationship to fetal behavioural states in normal pregnancy at 37–38 weeks', *Early Hum. Dev.*, vol. 12, no. 2, pp. 137–143, Nov. 1985, doi: 10.1016/0378-3782(85)90176-8.
- [48] G. Rizzo, D. Arduini, H. Valensise, and C. Romanini, 'Effects of behavioural states on cardiac output in the healthy human fetus at 36–38 weeks of gestation', *Early Hum. Dev.*, vol. 23, no. 2, pp. 109–115, Aug. 1990, doi: 10.1016/0378-3782(90)90134-5.
- [49] J. G. Gleeson and F. Polleux, 'Neurodevelopment and disease', *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 22, no. 5, pp. 735–736, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.conb.2012.07.010.
- [50] D. Arduini, G. Rizzo, L. Caforio, M. R. Boccolini, C. Romanini, and S. Mancuso, 'Behavioural state transitions in healthy and growth retarded fetuses', *Early Hum. Dev.*, vol. 19, no. 3, pp. 155–165, Jun. 1989, doi: 10.1016/0378-3782(89)90076-5.

- [51] I. J. M. Nijhuis *et al.*, 'Temporal organization of fetal behavior from 24-weeks gestation onwards in normal and complicated pregnancies', *Dev. Psychobiol.*, vol. 34, no. 4, pp. 257–268, May 1999, doi: 10.1002/(SICI)1098-2302(199905)34:2<257::AID-DEV2>3.0.CO;2-V.
- [52] I. J. M. Nijhuis *et al.*, 'Fetal heart rate in relation to its variation in normal and growth retarded fetuses', *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 89, no. 1, pp. 27–33, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0301-2115(99)00162-1.
- [53] J. C. DORNAN, J. W. K. RITCHIE, and S. RUFF, 'The rate and regularity of breathing movements in the normal and growth-retarded fetus', *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 91, no. 1, pp. 31–36, Jan. 1984, doi: 10.1111/j.1471-0528.1984.tb05275.x.
- [54] M. A. T. van Vliet, C. B. Martin, J. G. Nijhuis, and H. F. R. Prechtl, 'The relationship between fetal activity and behavioral states and fetal breathing movements in normal and growth-retarded fetuses', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 153, no. 5, pp. 582–588, Nov. 1985, doi: 10.1016/0002-9378(85)90483-1.
- [55] A. E. Richter *et al.*, 'Fetal Brain-Sparing, Postnatal Cerebral Oxygenation, and Neurodevelopment at 4 Years of Age Following Fetal Growth Restriction', *Front. Pediatr.*, vol. 8, May 2020, doi: 10.3389/fped.2020.00225.
- [56] A. Spinillo, B. Gardella, S. Bariselli, A. Alfei, E. M. Silini, and B. D. Bello, 'Cerebroplacental Doppler ratio and placental histopathological features in pregnancies complicated by fetal growth restriction', *J. Perinat. Med.*, vol. 42, no. 3, Jan. 2014, doi: 10.1515/jpm-2013-0128.
- [57] A. O. Odibo, C. Riddick, E. Pare, D. M. Stamilio, and G. A. Macones, 'Cerebroplacental Doppler Ratio and Adverse Perinatal Outcomes in Intrauterine Growth Restriction', *J. Ultrasound Med.*, vol. 24, no. 9, pp. 1223–1228, Sep. 2005, doi: 10.7863/jum.2005.24.9.1223.
- [58] D. Mureşan, I. C. Rotar, and F. Stamatian, 'The usefulness of fetal Doppler evaluation in early versus late onset intrauterine growth restriction. Review of the literature.', *Med. Ultrason.*, vol. 18, no. 1, p. 103, Mar. 2016, doi: 10.11152/mu.2013.2066.181.dop.
- [59] A. Conde-Agudelo, J. Villar, S. H. Kennedy, and A. T. Papageorghiou, 'Predictive accuracy of cerebroplacental ratio for adverse perinatal and neurodevelopmental

- outcomes in suspected fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 52, no. 4, pp. 430–441, Oct. 2018, doi: 10.1002/uog.19117.
- [60] E. Hernandez-Andrade, H. Figueroa-Diesel, T. Jansson, H. Rangel-Nava, and E. Gratacos, 'Changes in regional fetal cerebral blood flow perfusion in relation to hemodynamic deterioration in severely growth-restricted fetuses', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 32, no. 1, pp. 71–76, Jul. 2008, doi: 10.1002/uog.5377.
- [61] G. Egaña-Ugrinovic, S. Savchev, C. Bazán-Arcos, B. Puerto, E. Gratacós, and M. Sanz-Cortés, 'Neurosonographic Assessment of the Corpus Callosum as Imaging Biomarker of Abnormal Neurodevelopment in Late-Onset Fetal Growth Restriction', *Fetal Diagn. Ther.*, vol. 37, no. 4, pp. 281–288, 2015, doi: 10.1159/000366160.
- [62] G. Egaña-Ugrinovic, M. Sanz-Cortés, F. Figueras, C. Couve-Perez, and E. Gratacós, 'Fetal MRI insular cortical morphometry and its association with neurobehavior in late-onset small-for-gestational-age fetuses', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 44, no. 3, pp. 322–329, Sep. 2014, doi: 10.1002/uog.13360.
- [63] G. Egaña-Ugrinovic, M. Sanz-Cortés, F. Figueras, N. Bargalló, and E. Gratacós, 'Differences in cortical development assessed by fetal MRI in late-onset intrauterine growth restriction', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 209, no. 2, pp. 126.e1–126.e8, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ajog.2013.04.008.
- [64] C. Paules *et al.*, 'Fetal neurosonography detects differences in cortical development and corpus callosum in late-onset small fetuses', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 58, no. 1, pp. 42–47, Jul. 2021, doi: 10.1002/uog.23592.
- [65] S. L. Miller, P. S. Huppi, and C. Mallard, 'The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome', *J. Physiol.*, vol. 594, no. 4, pp. 807–823, Feb. 2016, doi: 10.1113/JP271402.
- [66] A. Takeuchi *et al.*, 'Neurodevelopment in full-term small for gestational age infants: A nationwide Japanese population-based study', *Brain Dev.*, vol. 38, no. 6, pp. 529–537, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.013.
- [67] M. Stoknes *et al.*, 'Cerebral Palsy and Neonatal Death in Term Singletons Born Small for Gestational Age', *Pediatrics*, vol. 130, no. 6, pp. e1629–e1635, Dec. 2012, doi: 10.1542/peds.2012-0152.
- [68] T. Arcangeli, B. Thilaganathan, R. Hooper, K. S. Khan, and A. Bhide,

- 'Neurodevelopmental delay in small babies at term: a systematic review', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 40, no. 3, pp. 267–275, Sep. 2012, doi: 10.1002/uog.11112.
- [69] E. Maciejewski, I. Hamon, J. Fresson, and J.-M. Hascoet, 'Growth and neurodevelopment outcome in symmetric versus asymmetric small for gestational age term infants', *J. Perinatol.*, vol. 36, no. 8, pp. 670–675, Aug. 2016, doi: 10.1038/jp.2016.48.
- [70] M. Parra-Saavedra *et al.*, 'Neurodevelopmental outcomes of near-term small-for-gestational-age infants with and without signs of placental underperfusion', *Placenta*, vol. 35, no. 4, pp. 269–274, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.placenta.2014.01.010.
- [71] F. Figueras *et al.*, 'Neurobehavior in Term, Small-for-Gestational Age Infants With Normal Placental Function', *Pediatrics*, vol. 124, no. 5, pp. e934–e941, Nov. 2009, doi: 10.1542/peds.2008-3346.
- [72] J. H. Becker *et al.*, 'Effects on (neuro)developmental and behavioral outcome at 2 years of age of induced labor compared with expectant management in intrauterine growth-restricted infants: long-term outcomes of the DIGITAT trial', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2012, doi: 10.1016/j.ajog.2012.02.003.
- [73] M. J. Benítez Marín, J. A. Blanco Elena, J. Marín Clavijo, J. Jiménez López, D. M. Lubián López, and E. González Mesa, 'Neurodevelopment Outcome in Children with Fetal Growth Restriction at Six Years of Age: A Retrospective Cohort Study', *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 19, no. 17, p. 11043, Sep. 2022, doi: 10.3390/ijerph191711043.
- [74] C. Deans and K. A. Maggert, 'What Do You Mean, "Epigenetic"?', *Genetics*, vol. 199, no. 4, pp. 887–896, Apr. 2015, doi: 10.1534/genetics.114.173492.
- [75] A. D. Riggs, 'X inactivation, differentiation, and DNA methylation', *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 14, no. 1, pp. 9–25, 1975, doi: 10.1159/000130315.
- [76] T. Suganuma and J. L. Workman, 'Crosstalk among Histone Modifications', *Cell*, vol. 135, no. 4, pp. 604–607, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.10.036.
- [77] M. Esteller, 'Non-coding RNAs in human disease', *Nat. Rev. Genet.*, vol. 12, no. 12, pp. 861–874, Dec. 2011, doi: 10.1038/nrg3074.
- [78] C. C. Pritchard, H. H. Cheng, and M. Tewari, 'MicroRNA profiling: approaches and considerations', *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 5, pp. 358–369, May 2012, doi: 10.1038/nrg3198.
- [79] M. Ha and V. N. Kim, 'Regulation of microRNA biogenesis', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*,

- vol. 15, no. 8, pp. 509–524, Aug. 2014, doi: 10.1038/nrm3838.
- [80] M. Tafrihi and E. Hasheminasab, 'MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases', *MicroRNA*, vol. 8, no. 1, pp. 4–27, Nov. 2018, doi: 10.2174/2211536607666180827111633.
- [81] A. Marson *et al.*, 'Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells', *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 521–533, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.020.
- [82] M. Giner, M. J. Montoya, M. A. Vázquez, C. Miranda, M. J. Miranda, and R. Pérez-Cano, '¿Qué son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica', *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.*, vol. 8, no. 1, pp. 40–44, Mar. 2016, doi: 10.4321/S1889-836X2016000100007.
- [83] A. W. Wark, H. J. Lee, and R. M. Corn, 'Multiplexed Detection Methods for Profiling MicroRNA Expression in Biological Samples', *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 47, no. 4, pp. 644–652, Jan. 2008, doi: 10.1002/anie.200702450.
- [84] D. P. Bartel, 'MicroRNAs', *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–297, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [85] A. Valoczi, 'Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes', *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 22, pp. e175–e175, Dec. 2004, doi: 10.1093/nar/gnh171.
- [86] T. X. Lu and M. E. Rothenberg, 'MicroRNA', *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 141, no. 4, pp. 1202–1207, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.034.
- [87] M. L. Metzker, 'Sequencing technologies — the next generation', *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2010, doi: 10.1038/nrg2626.
- [88] E. van Rooij, 'The Art of MicroRNA Research', *Circ. Res.*, vol. 108, no. 2, pp. 219–234, Jan. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227496.
- [89] A. Kozomara and S. Griffiths-Jones, 'miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data', *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, pp. D68–D73, Jan. 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1181.
- [90] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, Jan. 2009, doi: 10.1101/gr.082701.108.
- [91] T. Zhou, J. Yao, and Z. Liu, 'Gene Ontology, Enrichment Analysis, and Pathway

- Analysis', in *Bioinformatics in Aquaculture*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 150–168.
- [92] M. Kanehisa, 'KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes', *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 27–30, Jan. 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- [93] A. Subramanian *et al.*, 'Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 43, pp. 15545–15550, Oct. 2005, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- [94] F. Al-Shahrour, R. Diaz-Uriarte, and J. Dopazo, 'FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes', *Bioinformatics*, vol. 20, no. 4, pp. 578–580, Mar. 2004, doi: 10.1093/bioinformatics/btg455.
- [95] M. Ashburner *et al.*, 'Gene Ontology: tool for the unification of biology', *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 1, pp. 25–29, May 2000, doi: 10.1038/75556.
- [96] A. Vishnoi and S. Rani, 'MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview', 2017, pp. 1–10.
- [97] M. Budakoti *et al.*, 'Micro-RNA: The darkhorse of cancer', *Cell. Signal.*, vol. 83, p. 109995, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.cellsig.2021.109995.
- [98] G. Cui, J. Zhu, Y. Wang, J. Wu, J. Liu, and H. Guo, 'Effects of exosomal miRNAs in the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease', *Mech. Ageing Dev.*, vol. 200, p. 111593, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.mad.2021.111593.
- [99] A. Wojciechowska, A. Osiak, and K. Kozar-Kamińska, 'MicroRNA in cardiovascular biology and disease', *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 26, no. 5, pp. 868–874, Aug. 2017, doi: 10.17219/acem/62915.
- [100] L.-A. MacFarlane and P. R. Murphy, 'MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer', *Curr. Genomics*, vol. 11, no. 7, pp. 537–561, Nov. 2010, doi: 10.2174/138920210793175895.
- [101] M. Zhang, S. Muralimanoharan, A. C. Wortman, and C. R. Mendelson, 'Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 45, Nov. 2016, doi: 10.1073/pnas.1607849113.
- [102] C. L. Whitehead, W. T. Teh, S. P. Walker, C. Leung, L. Larmour, and S. Tong, 'Circulating MicroRNAs in Maternal Blood as Potential Biomarkers for Fetal Hypoxia In-Utero', *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e78487, Nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0078487.

- [103] N.-Y. Ko, L.-R. Chen, and K.-H. Chen, 'The Role of Micro RNA and Long-Non-Coding RNA in Osteoporosis', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, p. 4886, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21144886.
- [104] D. M. Morales-Prieto, S. Ospina-Prieto, W. Chaiwangyen, M. Schoenleben, and U. R. Markert, 'Pregnancy-associated miRNA-clusters', *J. Reprod. Immunol.*, vol. 97, no. 1, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jri.2012.11.001.
- [105] N. Engedal *et al.*, 'From Oxidative Stress Damage to Pathways, Networks, and Autophagy via MicroRNAs', *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1155/2018/4968321.
- [106] G. V. A. Gusar, T. A. V. Timofeeva, K. N. E. Kan, C. V. V. Chagovets, G. M. B. Ganichkina, and F. V. E. Frankevich, 'The expression profile of placental microRNAs as regulators of oxidative stress in fetal growth restriction', *Akush. Ginekol. (Sofiia)*, vol. 1_2019, pp. 74–80, Feb. 2019, doi: 10.18565/aig.2019.1.74-80.
- [107] M. Serocki, S. Bartoszewska, A. Janaszak-Jasiecka, R. J. Ochocka, J. F. Collawn, and R. Bartoszewski, 'miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target', *Angiogenesis*, vol. 21, no. 2, pp. 183–202, May 2018, doi: 10.1007/s10456-018-9600-2.
- [108] M. Y. Koh and G. Powis, 'Passing the baton: the HIF switch', *Trends Biochem. Sci.*, vol. 37, no. 9, pp. 364–372, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.004.
- [109] K. Lisy and D. J. Peet, 'Turn me on: regulating HIF transcriptional activity', *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 4, pp. 642–649, Apr. 2008, doi: 10.1038/sj.cdd.4402315.
- [110] J. J. D. Ho *et al.*, 'Functional Importance of Dicer Protein in the Adaptive Cellular Response to Hypoxia', *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 34, pp. 29003–29020, Aug. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.373365.
- [111] J.-F. Mouillet, T. Chu, C. A. Hubel, D. M. Nelson, W. T. Parks, and Y. Sadovsky, 'The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction', *Placenta*, vol. 31, no. 9, pp. 781–784, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.placenta.2010.07.001.
- [112] A. Higashijima *et al.*, 'Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy', *Prenat. Diagn.*, vol. 33, no. 3, pp. 214–222, Mar. 2013, doi: 10.1002/pd.4045.
- [113] Hu and Zhang, 'MicroRNAs in Uteroplacental Vascular Dysfunction', *Cells*, vol. 8, no.

- 11, p. 1344, Oct. 2019, doi: 10.3390/cells8111344.
- [114] C. Tiozzo *et al.*, 'Placental extracellular vesicles-associated microRNA-519c mediates endotoxin adaptation in pregnancy', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 225, no. 6, pp. 681.e1-681.e20, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ajog.2021.06.075.
- [115] L. Xie *et al.*, 'C19MC MicroRNAs Regulate the Migration of Human Trophoblasts', *Endocrinology*, vol. 155, no. 12, pp. 4975–4985, Dec. 2014, doi: 10.1210/en.2014-1501.
- [116] I. Hromadnikova *et al.*, 'Expression Profile of C19MC microRNAs in Placental Tissue in Pregnancy-Related Complications', *DNA Cell Biol.*, vol. 34, no. 6, pp. 437–457, Jun. 2015, doi: 10.1089/dna.2014.2687.
- [117] D. M. Morales-Prieto *et al.*, 'MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells', *Placenta*, vol. 33, no. 9, pp. 725–734, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.placenta.2012.05.009.
- [118] I. Hromadnikova, K. Kotlabova, K. Ivankova, and L. Krofta, 'First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR', *PLoS One*, vol. 12, no. 2, p. e0171756, Feb. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0171756.
- [119] M. Noguer-Dance *et al.*, 'The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta', *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 18, pp. 3566–3582, Sep. 2010, doi: 10.1093/hmg/ddq272.
- [120] S. Apostolidou *et al.*, 'The 14q32 maternally imprinted locus is a major source of longitudinally stable circulating microRNAs as measured by small RNA sequencing', *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 15787, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-51948-6.
- [121] K. R. Bounds, V. L. Chiasson, L. J. Pan, S. Gupta, and P. Chatterjee, 'MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia', *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 4, Sep. 2017, doi: 10.3389/fcvm.2017.00060.
- [122] E. Binda *et al.*, 'The EphA2 Receptor Drives Self-Renewal and Tumorigenicity in Stem-like Tumor-Propagating Cells from Human Glioblastomas', *Cancer Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 765–780, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.005.
- [123] K. Obernier and A. Alvarez-Buylla, 'Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain', *Development*, vol. 146, no. 4, Feb. 2019, doi: 10.1242/dev.156059.
- [124] A. Kriegstein and A. Alvarez-Buylla, 'The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural

- Stem Cells', *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 32, no. 1, pp. 149–184, Jun. 2009, doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- [125] J. Frisé, 'Neurogenesis and Gliogenesis in Nervous System Plasticity and Repair', *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 32, no. 1, pp. 127–141, Oct. 2016, doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-124953.
- [126] E. Horgusluoglu-Moloch *et al.*, 'Targeted neurogenesis pathway-based gene analysis identifies ADORA2A associated with hippocampal volume in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Neurobiol. Aging*, vol. 60, pp. 92–103, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.010.
- [127] M. Stevanovic, D. Stanisavljevic Ninkovic, M. Mojsin, D. Drakulic, and M. Schwirtlich, 'Interplay of SOX transcription factors and microRNAs in the brain under physiological and pathological conditions', *Neural Regen. Res.*, vol. 17, no. 11, p. 2325, 2022, doi: 10.4103/1673-5374.338990.
- [128] M. Stevanovic, N. Kovacevic-Grujicic, M. Mojsin, M. Milivojevic, and D. Drakulic, 'SOX transcription factors and glioma stem cells: Choosing between stemness and differentiation', *World J. Stem Cells*, vol. 13, no. 10, pp. 1417–1445, Oct. 2021, doi: 10.4252/wjsc.v13.i10.1417.
- [129] K. Prodromidou and R. Matsas, 'Species-Specific miRNAs in Human Brain Development and Disease', *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 13, Dec. 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00559.
- [130] M. Cao, H. Huang, Y. Peng, Q. Dong, and Y. He, 'Toward Developmental Connectomics of the Human Brain', *Front. Neuroanat.*, vol. 10, Mar. 2016, doi: 10.3389/fnana.2016.00025.
- [131] Y. Hoshiba, T. Toda, H. Ebisu, M. Wakimoto, S. Yanagi, and H. Kawasaki, 'Sox11 Balances Dendritic Morphogenesis with Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex', *J. Neurosci.*, vol. 36, no. 21, pp. 5775–5784, May 2016, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3250-15.2016.
- [132] H. E. Kinser and Z. Pincus, 'MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process', *Hum. Genet.*, vol. 139, no. 3, pp. 291–308, Mar. 2020, doi: 10.1007/s00439-019-02046-0.
- [133] B. Martinez and P. Peplow, 'MicroRNA biomarkers in frontotemporal dementia and to distinguish from Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis', *Neural Regen.*

- Res.*, vol. 17, no. 7, p. 1412, 2022, doi: 10.4103/1673-5374.330591.
- [134] D. Grimm *et al.*, 'The role of SOX family members in solid tumours and metastasis', *Semin. Cancer Biol.*, vol. 67, pp. 122–153, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.03.004.
- [135] P. Zhu *et al.*, 'MicroRNA profile as potential molecular signature for attention deficit hyperactivity disorder in children', *Biomarkers*, vol. 27, no. 3, pp. 230–239, Apr. 2022, doi: 10.1080/1354750X.2021.2024600.
- [136] R. R. Couto, F. Kubaski, M. Siebert, T. M. Félix, A. C. Brusius-Facchin, and S. Leistner-Segal, 'Increased Serum Levels of miR-125b and miR-132 in Fragile X Syndrome', *Neurol. Genet.*, vol. 8, no. 6, p. e200024, Dec. 2022, doi: 10.1212/NXG.0000000000200024.
- [137] Y. Qian *et al.*, 'Advances in Roles of miR-132 in the Nervous System', *Front. Pharmacol.*, vol. 8, Oct. 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00770.
- [138] J. Remenyi *et al.*, 'miR-132/212 Knockout Mice Reveal Roles for These miRNAs in Regulating Cortical Synaptic Transmission and Plasticity', *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e62509, Apr. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0062509.
- [139] S. T. Magill *et al.*, 'microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 47, pp. 20382–20387, Nov. 2010, doi: 10.1073/pnas.1015691107.
- [140] G. A. Wayman *et al.*, 'An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 26, pp. 9093–9098, Jul. 2008, doi: 10.1073/pnas.0803072105.
- [141] S. Impey *et al.*, 'An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling', *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 43, no. 1, pp. 146–156, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.mcn.2009.10.005.
- [142] J. Morales-Roselló, A. Khalil, M. Morlando, D. Hervás-Marín, and A. Perales-Marín, 'Doppler reference values of the fetal vertebral and middle cerebral arteries, at 19–41 weeks gestation', *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 28, no. 3, pp. 338–343, Feb. 2015, doi: 10.3109/14767058.2014.916680.
- [143] G. Acharya, T. Wilsgaard, G. K. R. Berntsen, J. M. Maltau, and T. Kiserud, 'Reference ranges for serial measurements of umbilical artery Doppler indices in the second half of pregnancy', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 192, no. 3, pp. 937–944, Mar. 2005, doi:

- 10.1016/j.ajog.2004.09.019.
- [144] J. Morales-Roselló, A. Khalil, M. Morlando, A. Papageorghiou, A. Bhide, and B. Thilaganathan, 'Changes in fetal Doppler indices as a marker of failure to reach growth potential at term', *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 43, no. 3, pp. 303–310, Mar. 2014, doi: 10.1002/uog.13319.
- [145] F. Figueras *et al.*, 'Customized birthweight standards for a Spanish population', *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 136, no. 1, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.ejogrb.2006.12.015.
- [146] Y. Liao, G. K. Smyth, and W. Shi, 'The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote', *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 10, pp. e108–e108, May 2013, doi: 10.1093/nar/gkt214.
- [147] Y. Liao, G. K. Smyth, and W. Shi, 'featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features', *Bioinformatics*, vol. 30, no. 7, pp. 923–930, Apr. 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
- [148] M. D. Robinson and A. Oshlack, 'A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data', *Genome Biol.*, vol. 11, no. 3, p. R25, 2010, doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r25.
- [149] M. D. Robinson and G. K. Smyth, 'Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data', *Biostatistics*, vol. 9, no. 2, pp. 321–332, Jul. 2007, doi: 10.1093/biostatistics/kxm030.
- [150] M. D. Robinson and G. K. Smyth, 'Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance', *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2881–2887, Nov. 2007, doi: 10.1093/bioinformatics/btm453.
- [151] I. S. Vlachos *et al.*, 'DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support', *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. W1, pp. W460–W466, Jul. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv403.
- [152] J. S. Shah, P. S. Soon, and D. J. Marsh, 'Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs', *PLoS One*, vol. 11, no. 4, p. e0153200, Apr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153200.
- [153] M. B. Kirschner, J. J. B. Edelman, S. C.-H. Kao, M. P. Vallety, N. van Zandwijk, and G. Reid, 'The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers', *Front. Genet.*, vol. 4, 2013, doi: 10.3389/fgene.2013.00094.

- [154] M. A. Crawford, 'The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition', *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 5, pp. 703S-710S, May 1993, doi: 10.1093/ajcn/57.5.703S.
- [155] A. S. B. Olsen and N. J. Færgeman, 'Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases', *Open Biol.*, vol. 7, no. 5, p. 170069, May 2017, doi: 10.1098/rsob.170069.
- [156] H. Mogami *et al.*, 'Isocaloric high-protein diet as well as branched-chain amino acids supplemented diet partially alleviates adverse consequences of maternal undernutrition on fetal growth', *Growth Horm. IGF Res.*, vol. 19, no. 6, pp. 478-485, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.ghir.2009.03.002.
- [157] D. Chen, S. Hu, Z. Wu, J. Liu, and S. Li, 'The Role of MiR-132 in Regulating Neural Stem Cell Proliferation, Differentiation and Neuronal Maturation', *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 47, no. 6, 2018, doi: 10.1159/000491543.
- [158] T. J. Qazi, J. Lu, L. Duru, J. Zhao, and H. Qing, 'Upregulation of mir-132 induces dopaminergic neuronal death via activating SIRT1/P53 pathway', *Neurosci. Lett.*, vol. 740, p. 135465, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.neulet.2020.135465.
- [159] U. Schmitz, X. Lai, F. Winter, O. Wolkenhauer, J. Vera, and S. K. Gupta, 'Cooperative gene regulation by microRNA pairs and their identification using a computational workflow', *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 12, pp. 7539-7552, Jul. 2014, doi: 10.1093/nar/gku465.
- [160] X. Lai *et al.*, 'Computational analysis of target hub gene repression regulated by multiple and cooperative miRNAs', *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 18, pp. 8818-8834, Oct. 2012, doi: 10.1093/nar/gks657.
- [161] P. Sætrom, B. S. E. Heale, O. Snøve, L. Aagaard, J. Alluin, and J. J. Rossi, 'Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity', *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 2333-2342, Apr. 2007, doi: 10.1093/nar/gkm133.
- [162] J. D. Horton, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, 'SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver', *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 9, pp. 1125-1131, May 2002, doi: 10.1172/JCI15593.
- [163] F. Crispi *et al.*, 'Fetal Growth Restriction Results in Remodeled and Less Efficient Hearts in Children', *Circulation*, vol. 121, no. 22, pp. 2427-2436, Jun. 2010, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.937995.

- [164] F. Crispi, F. Figueras, M. Cruz-Lemini, J. Bartrons, B. Bijmens, and E. Gratacos, 'Cardiovascular programming in children born small for gestational age and relationship with prenatal signs of severity', *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 207, no. 2, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.ajog.2012.05.011.
- [165] T. Stampalija, C. Ciardo, M. Barbieri, F. M. Risso, and L. Travan, 'Neurodevelopment of infant with late fetal growth restriction', *Minerva Obstet. Gynecol.*, May 2021, doi: 10.23736/S2724-606X.21.04807-3.
- [166] L. Polisenò *et al.*, 'Identification of the *miR-106b* ~ 25 MicroRNA Cluster as a Proto-Oncogenic *PTEN* -Targeting Intron That Cooperates with Its Host Gene *MCM7* in Transformation', *Sci. Signal.*, vol. 3, no. 117, Apr. 2010, doi: 10.1126/scisignal.2000594.
- [167] M. Sárközy, Z. Kahán, and T. Csont, 'A myriad of roles of miR-25 in health and disease'. [Online]. Available: www.oncotarget.com.
- [168] X. Li, C. Yang, X. Wang, J. Zhang, R. Zhang, and R. Liu, 'The expression of miR-25 is increased in colorectal cancer and is associated with patient prognosis', *Med. Oncol.*, vol. 31, no. 1, p. 781, Jan. 2014, doi: 10.1007/s12032-013-0781-7.
- [169] F. Petrocca *et al.*, 'E2F1-Regulated MicroRNAs Impair TGF β -Dependent Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Gastric Cancer', *Cancer Cell*, vol. 13, no. 3, pp. 272–286, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2008.02.013.
- [170] Y. Li *et al.*, 'Role of the *miR-106b-25* microRNA cluster in hepatocellular carcinoma', *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 7, pp. 1234–1242, Jul. 2009, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01164.x.
- [171] Z. Hong *et al.*, 'MicroRNA-138 and MicroRNA-25 Down-regulate Mitochondrial Calcium Uniporter, Causing the Pulmonary Arterial Hypertension Cancer Phenotype', *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 195, no. 4, pp. 515–529, Feb. 2017, doi: 10.1164/rccm.201604-0814OC.
- [172] Z. V. Varga *et al.*, 'MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart', *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 62, pp. 111–121, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.05.009.
- [173] D. Setyowati Karolina, S. Sepramaniam, H. Z. Tan, A. Armugam, and K. Jeyaseelan, 'miR-25 and miR-92a regulate insulin I biosynthesis in rats', *RNA Biol.*, vol. 10, no. 8,

- pp. 1365–1378, Aug. 2013, doi: 10.4161/rna.25557.
- [174] Y. Zhang and X. Zuo, 'miR-25-3p protects renal tubular epithelial cells from apoptosis induced by renal IRI by targeting DKK3', *Open Life Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 1393–1404, Dec. 2021, doi: 10.1515/biol-2021-0127.
- [175] M. Sárközy, Z. Kahán, and T. Csont, 'A myriad of roles of miR-25 in health and disease', *Oncotarget*, vol. 9, no. 30, pp. 21580–21612, Apr. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24662.
- [176] C. Zydorczyk *et al.*, 'Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches', *J. Dev. Orig. Health Dis.*, vol. 8, no. 4, pp. 448–464, Aug. 2017, doi: 10.1017/S2040174417000265.
- [177] K. G. Maier, B. Ruhle, J. J. Stein, K. L. Gentile, F. A. Middleton, and V. Gahtan, 'Thrombospondin-1 differentially regulates microRNAs in vascular smooth muscle cells', *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 412, no. 1–2, pp. 111–117, Jan. 2016, doi: 10.1007/s11010-015-2614-9.
- [178] J. Miranda *et al.*, 'Metabolic profiling and targeted lipidomics reveals a disturbed lipid profile in mothers and fetuses with intrauterine growth restriction', *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 13614, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31832-5.
- [179] N. Korkalainen, T. Mäkikallio, J. Räsänen, H. Huikuri, and K. Mäkikallio, 'Antenatal hemodynamic findings and heart rate variability in early school-age children born with fetal growth restriction', *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 34, no. 14, pp. 2267–2273, Jul. 2021, doi: 10.1080/14767058.2019.1663816.
- [180] D. M. Harrild and G. R. Marx, 'Fetal Growth Restriction and Long-Term Cardiovascular Risk', *Circ. Cardiovasc. Imaging*, vol. 10, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1161/CIRCIMAGING.116.005731.
- [181] J. Heineke and J. D. Molkentin, 'Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 8, pp. 589–600, Aug. 2006, doi: 10.1038/nrm1983.
- [182] E. Dirx *et al.*, 'Nfat and miR-25 cooperate to reactivate the transcription factor Hand2 in heart failure', *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 1282–1293, Nov. 2013, doi: 10.1038/ncb2866.
- [183] V. Divakaran *et al.*, 'Adaptive and Maladaptive Effects of SMAD3 Signaling in the Adult

- Heart After Hemodynamic Pressure Overloading', *Circ. Hear. Fail.*, vol. 2, no. 6, pp. 633–642, Nov. 2009, doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.823070.
- [184] A. J. Forstner *et al.*, 'Investigation of the involvement of *MIR185* and its target genes in the development of schizophrenia', *J. Psychiatry Neurosci.*, vol. 39, no. 6, pp. 386–396, Nov. 2014, doi: 10.1503/jpn.130189.
- [185] B. Li *et al.*, 'Potentials of the elevated circulating miR-185 level as a biomarker for early diagnosis of HBV-related liver fibrosis', *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 34157, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep34157.
- [186] M. Yu *et al.*, 'Circulating miR-185 might be a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy', *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 33580, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep33580.
- [187] G.-S. Lei, H. L. Kline, C.-H. Lee, D. S. Wilkes, and C. Zhang, 'Regulation of Collagen V Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition by miR-185 and miR-186 during Idiopathic Pulmonary Fibrosis', *Am. J. Pathol.*, vol. 186, no. 9, pp. 2310–2316, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.ajpath.2016.04.015.
- [188] E. Babaeenezhad *et al.*, 'The Roles of microRNA miR-185 in Digestive Tract Cancers', *Non-Coding RNA*, vol. 8, no. 5, p. 67, Oct. 2022, doi: 10.3390/ncrna8050067.
- [189] M. Fang, Y. Li, Y. Wu, Z. Ning, X. Wang, and X. Li, 'miR-185 silencing promotes the progression of atherosclerosis via targeting stromal interaction molecule 1', *Cell Cycle*, vol. 18, no. 6–7, pp. 682–695, Apr. 2019, doi: 10.1080/15384101.2019.1580493.
- [190] A. Ahmed and J. Perkins, 'Angiogenesis and intrauterine growth restriction', *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 14, no. 6, Dec. 2000, doi: 10.1053/beog.2000.0139.
- [191] E. A. Kuczynski and A. R. Reynolds, 'Vessel co-option and resistance to anti-angiogenic therapy', *Angiogenesis*, vol. 23, no. 1, pp. 55–74, Feb. 2020, doi: 10.1007/s10456-019-09698-6.
- [192] E. Storkebaum, D. Lambrechts, and P. Carmeliet, 'VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection', *BioEssays*, vol. 26, no. 9, pp. 943–954, Sep. 2004, doi: 10.1002/bies.20092.
- [193] S. Thamocharan *et al.*, 'Differential microRNA expression in human placentas of term intra-uterine growth restriction that regulates target genes mediating angiogenesis and amino acid transport', *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0176493, May 2017, doi:

- 10.1371/journal.pone.0176493.
- [194] Z.-J. LU *et al.*, 'MicroRNA-185 suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of the hypoxia-inducible factor-2 α pathway in vitro and in vivo', *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 5, pp. 2401–2408, Nov. 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2562.
- [195] R. Agrawal, P. Pandey, P. Jha, V. Dwivedi, C. Sarkar, and R. Kulshreshtha, 'Hypoxic signature of microRNAs in glioblastoma: insights from small RNA deep sequencing', *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, p. 686, Dec. 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-686.
- [196] L. Fan *et al.*, 'Upregulation of miR-185 promotes apoptosis of the human gastric cancer cell line MGC803', *Mol. Med. Rep.*, Dec. 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.8206.
- [197] P. Akizakaya, 'miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer', *Int. J. Oncol.*, May 2011, doi: 10.3892/ijo.2011.1043.
- [198] H.-X. Yuan *et al.*, 'Elevated microRNA-185 is associated with high vascular endothelial growth factor receptor 2 expression levels and high microvessel density in clear cell renal cell carcinoma', *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 12, pp. 12757–12763, Dec. 2014, doi: 10.1007/s13277-014-2602-9.
- [199] P. I. A. S. M. I. D. T. B. L. B. R. Eilertsen M, 'In NSCLC, VEGF-A response to hypoxia may differ between squamous cell and adenocarcinoma histology.', *Anticancer Res.*, vol. 32, no. 11, pp. 4729-4736., Nov. 2012.
- [200] X. Liu, D. Wang, X. Yang, and L. Lei, 'Huayu Tongmai Granules protects against vascular endothelial dysfunction via up-regulating miR-185 and down-regulating RAGE', *Biosci. Rep.*, vol. 38, no. 6, Dec. 2018, doi: 10.1042/BSR20180674.
- [201] P.-N. Tsao and S.-C. Wei, 'Prenatal Hypoxia Downregulates the Expression of Pulmonary Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Fetal Mice', *Neonatology*, vol. 103, no. 4, pp. 300–307, 2013, doi: 10.1159/000347103.
- [202] A. Malamitsi-Puchner *et al.*, 'Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Intrauterine Growth-Restricted Fetuses and Neonates', *Mediators Inflamm.*, vol. 2005, no. 5, pp. 293–297, 2005, doi: 10.1155/MI.2005.293.
- [203] C.-C. Li *et al.*, 'Endogenous reduction of miR-185 accelerates cardiac function recovery in mice following myocardial infarction via targeting of cathepsin K', *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 23, no. 2, pp. 1164–1173, Feb. 2019, doi: 10.1111/jcmm.14016.

- [204] Z. Wen, J. Zhang, P. Tang, N. Tu, K. Wang, and G. Wu, 'Overexpression of miR-185 inhibits autophagy and apoptosis of dopaminergic neurons by regulating the AMPK/mTOR signaling pathway in Parkinson's disease', *Mol. Med. Rep.*, Oct. 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.7897.
- [205] T. J. Qazi, J. Lu, L. Duru, J. Zhao, and H. Qing, 'Upregulation of mir-132 induces dopaminergic neuronal death via activating SIRT1/P53 pathway', *Neurosci. Lett.*, vol. 740, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.neulet.2020.135465.
- [206] M. Rafat, M. Moraghebi, M. Afsa, and K. Malekzadeh, 'The outstanding role of miR-132-3p in carcinogenesis of solid tumors', *Hum. Cell*, vol. 34, no. 4, pp. 1051–1065, May 2021, doi: 10.1007/s13577-021-00544-w.
- [207] A. Ucar *et al.*, 'The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy', *Nat. Commun.*, vol. 3, no. 1, Jan. 2012, doi: 10.1038/ncomms2090.
- [208] Y. Zhou, K. Li, L. Liu, and S. Li, 'MicroRNA-132 promotes oxidative stress-induced pyroptosis by targeting sirtuin 1 in myocardial ischaemia-reperfusion injury', *Int. J. Mol. Med.*, Mar. 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4557.
- [209] G. Hanin *et al.*, 'miRNA-132 induces hepatic steatosis and hyperlipidaemia by synergistic multitarget suppression', *Gut*, vol. 67, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312869.
- [210] S. Kim *et al.*, 'Ginger Extract Ameliorates Obesity and Inflammation via Regulating MicroRNA-21/132 Expression and AMPK Activation in White Adipose Tissue', *Nutrients*, vol. 10, no. 11, p. 1567, Oct. 2018, doi: 10.3390/nu10111567.
- [211] Z.-Z. Sun, Z.-Y. Lv, W.-J. Tian, and Y. Yang, 'RETRACTED: MicroRNA-132 protects hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis', *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 30, no. 3, pp. 253–263, Sep. 2017, doi: 10.1177/0394632017715837.
- [212] M. P. . Keasey, H. L. Scott, I. Bantounas, J. B. Uney, and S. Kelly, 'MiR-132 Is Upregulated by Ischemic Preconditioning of Cultured Hippocampal Neurons and Protects them from Subsequent OGD Toxicity', *J. Mol. Neurosci.*, vol. 59, no. 3, pp. 404–410, Jul. 2016, doi: 10.1007/s12031-016-0740-9.
- [213] H. Zhang, J. Lin, T. Hu, Z. Ren, W. Wang, and Q. He, 'Effect of miR-132 on bupivacaine-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cell line', *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 139,

- no. 3, pp. 186–192, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jphs.2019.01.014.
- [214] T. Shrestha, T. Takahashi, C. Li, M. Matsumoto, and H. Maruyama, 'Nicotine-induced upregulation of miR-132-5p enhances cell survival in PC12 cells by targeting the anti-apoptotic protein Bcl-2', *Neurol. Res.*, vol. 42, no. 5, pp. 405–414, May 2020, doi: 10.1080/01616412.2020.1735817.
- [215] Y. Zhao *et al.*, 'Melatonin protects against A β -induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway', *BioFactors*, vol. 44, no. 6, pp. 609–618, Nov. 2018, doi: 10.1002/biof.1411.
- [216] K. Wibrand *et al.*, 'MicroRNA Regulation of the Synaptic Plasticity-Related Gene Arc', *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e41688, Jul. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0041688.
- [217] J. Remenyi *et al.*, 'Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins', *Biochem. J.*, vol. 428, no. 2, pp. 281–291, Jun. 2010, doi: 10.1042/BJ20100024.
- [218] Z. Zhao and B. V. Zlokovic, 'Remote control of BBB: A tale of exosomes and microRNA', *Cell Res.*, vol. 27, no. 7, pp. 849–850, Jul. 2017, doi: 10.1038/cr.2017.71.
- [219] V. Gillet *et al.*, 'miRNA Profiles in Extracellular Vesicles From Serum Early in Pregnancies Complicated by Gestational Diabetes Mellitus', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 104, no. 11, pp. 5157–5169, Nov. 2019, doi: 10.1210/jc.2018-02693.
- [220] M. C. Vella, E.-Y. Choi, S.-Y. Lin, K. Reinert, and F. J. Slack, 'The *C. elegans* microRNA *let-7* binds to imperfect *let-7* complementary sites from the *lin-41* 3'UTR', *Genes Dev.*, vol. 18, no. 2, pp. 132–137, Jan. 2004, doi: 10.1101/gad.1165404.
- [221] U. Pecks *et al.*, 'Estimating fetal cholesterol synthesis rates by cord blood analysis in intrauterine growth restriction and normally grown fetuses', *Lipids Health Dis.*, vol. 18, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12944-019-1117-1.
- [222] U. Pecks *et al.*, 'Serum cholesterol acceptor capacity in intrauterine growth restricted fetuses', *J. Perinat. Med.*, vol. 45, no. 7, Oct. 2017, doi: 10.1515/jpm-2016-0270.
- [223] M. Yang *et al.*, 'Identification of miR-185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake', *J. Lipid Res.*, vol. 55, no. 2, Feb. 2014, doi: 10.1194/jlr.M041335.
- [224] D. Dlouha *et al.*, 'Analysis of circulating miRNAs in patients with familial hypercholesterolaemia treated by LDL/Lp(a) apheresis', *Atheroscler. Suppl.*, vol. 30, pp. 128–134, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2017.05.037.

- [225] A. Krek *et al.*, 'Combinatorial microRNA target predictions', *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 5, pp. 495–500, May 2005, doi: 10.1038/ng1536.
- [226] C. E. Bowman, Z. Arany, and M. J. Wolfgang, 'Regulation of maternal–fetal metabolic communication', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 78, no. 4, pp. 1455–1486, Feb. 2021, doi: 10.1007/s00018-020-03674-w.
- [227] E. A. Rhon-Calderon, L. A. Vrooman, L. Riesche, and M. S. Bartolomei, 'The effects of Assisted Reproductive Technologies on genomic imprinting in the placenta', *Placenta*, vol. 84, pp. 37–43, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.placenta.2019.02.013.
- [228] E. de Waal *et al.*, 'The cumulative effect of assisted reproduction procedures on placental development and epigenetic perturbations in a mouse model', *Hum. Mol. Genet.*, p. ddv400, Sep. 2015, doi: 10.1093/hmg/ddv400.
- [229] S.-S. Luo *et al.*, 'Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes¹', *Biol. Reprod.*, vol. 81, no. 4, pp. 717–729, Oct. 2009, doi: 10.1095/biolreprod.108.075481.
- [230] K. Miura *et al.*, 'Identification of Pregnancy-Associated MicroRNAs in Maternal Plasma', *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 11, pp. 1767–1771, Nov. 2010, doi: 10.1373/clinchem.2010.147660.
- [231] M. Cai, G. K. Kolluru, and A. Ahmed, 'Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications', *J. Pregnancy*, vol. 2017, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1155/2017/6972732.
- [232] I. Hromadnikova, K. Kotlabova, J. Doucha, K. Dlouha, and L. Krofta, 'Absolute and Relative Quantification of Placenta-Specific MicroRNAs in Maternal Circulation with Placental Insufficiency–Related Complications', *J. Mol. Diagnostics*, vol. 14, no. 2, pp. 160–167, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.003.
- [233] A. G. Paquette, T. Chu, X. Wu, K. Wang, N. D. Price, and Y. Sadovsky, 'Distinct communication patterns of trophoblastic miRNA among the maternal-placental-fetal compartments', *Placenta*, vol. 72–73, pp. 28–35, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.placenta.2018.10.004.

**TRABAJOS
PUBLICADOS Y EN VÍAS
DE PUBLICACIÓN**



Article

Overexpression of microRNAs miR-25-3p, miR-185-5p and miR-132-3p in Late Onset Fetal Growth Restriction, Validation of Results and Study of the Biochemical Pathways Involved

Gabriela Loscalzo^{1,2,*}, Julia Scheel^{3,*}, José Santiago Ibañez-Cabellos^{4,5}, Eva García-Lopez⁴, Shailendra Gupta³, José Luis García-Gimenez^{4,5,6,7}, Salvador Mena-Mollá^{4,6,7}, Alfredo Perales-Marín^{1,2,8} and José Morales-Roselló^{1,2,8}

Fetal Diagnosis
and Therapy

Original Paper

Fetal Diagn Ther
DOI: 10.1159/000507619

Received: August 5, 2019
Accepted: March 25, 2020
Published online: June 25, 2020

MicroRNA-148b-3p and MicroRNA-25-3p Are Overexpressed in Fetuses with Late-Onset Fetal Growth Restriction

José Morales-Roselló^{a, b} José Luis García-Giménez^{c, d}
Llucia Martínez Priego^e Daymé González-Rodríguez^c Salvador Mena-Mollá^{c, d}
Angel Maquieira Catalá^f Gabriela Loscalzo^a Silvia Buongiorno^a
Vaidile Jakaite^a Antonio José Cañada Martínez^g Alfredo Perales Marín^{a, b}

^aServicio de Obstetricia, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain; ^bDepartamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^cEpiDisease SL, and Consortium Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain; ^dDepartamento de Fisiología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^eServicio de Secuenciación, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad valenciana (FISABIO), Valencia, Spain; ^fDepartamento de Química, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain; ^gUnidad de Bioestadística, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

EPIGENETICS
<https://doi.org/10.1080/15592294.2021.2023271>



RESEARCH PAPER



MicroRNA-185-5p: a marker of brain-sparing in foetuses with late-onset growth restriction

José Morales-Roselló^{a, b}, Gabriela Loscalzo^a, Eva María García-Lopez^c, José Santiago Ibañez Cabellos^c, José Luis García-Gimenez^{c, d}, Antonio José Cañada Martínez^e, and Alfredo Perales Marín^{a, b}

^aServicio de Obstetricia, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain; ^bDepartamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^cEpiDisease SL, and Consortium Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Valencia, Spain; ^dDepartamento de Fisiología, Facultad de Medicina i Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^eUnidad de Bioestadística, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

Received: 2 July 2021 | Revised: 25 December 2021 | Accepted: 11 February 2022
DOI: 10.1002/hsr.2.558

ORIGINAL RESEARCH

Health Science Reports
WILEY

MicroRNA-132 is overexpressed in fetuses with late-onset fetal growth restriction

José Morales-Roselló^{1,2} | Gabriela Loscalzo¹ | Eva María García-Lopez³ |
José Luis García-Gimenez^{3,4} | Alfredo Perales-Marín^{1,2}