

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

Impronta genómica en la placenta y su relación con la preeclampsia

Egilea /Autor/a:

Paula Mercado Ozcariz

Zuzendaria / Director/a:

Leire Reguero Acebal

© 2020, Paula Mercado Ozcariz

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CDKN1C - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
CHR - Cromosoma
DLK1 - Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1
DLX5 - Distal-less homeobox 5
DMR - Differentially methylated region
GNAS - Guanine nucleotide binding proteine Alpha stimulating
ICR - Imprinting control región
IGF2 - Insuline like growth factor 2
MEG - Genes de expresión materna, maternally expressed genes
MEST - Mesoderm-specific transcript
NCBI - National center for biotechnology
NLM - National library of medicine
PCR - Reacción en cadena de la polimerasa
PEG - Genes de expresión paterna, paternally expressed gene
PEG10 - Paternally expressed gene 10
PHLDA2 - Pleckstrin homologylike domain family A member 2
Pref-1 - Pre adipocyte factor 1
RCIU - Restricción del crecimiento intrauterino
REF - Referencia
TDAH - Trastorno de déficit de atención e hiperactividad

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA IMPRONTA GENÓMICA	1
1.2 PREECLAMPSIA	3
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
4. RESULTADOS	14
4.1. GENES IMPRONTADOS DESCUBIERTOS EN LA PLACENTA.....	14
4.2. IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LOS GENES IMPRONTADOS EN LA PLACENTA	16
4.3. IMPRONTA GENÓMICA ALTERADA EN LA PREECLAMPSIA	19
4.3.1. Gen CDKN1C.....	20
4.3.2. Gen DLX5.....	20
4.3.3. Gen PEG10	21
4.3.4. Gen PHLDA2	21
4.3.5. Gen H19.....	22
4.3.6. Genes MEST y DLK1.....	23
4.3.7. Genes IGF2 y GNAS	23
4.4. IMPRONTA GENÓMICA EN LA PLACENTA Y METABOLISMO MATERNO	24
5. DISCUSIÓN	26
5.1. ¿CAUSA O CONSECUENCIA? FUTUROS ESTUDIOS.....	31
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA IMPRONTA GENÓMICA

La epigenética es el conjunto de mecanismos que regulan la expresión genética y que son heredables, pero que no suponen cambios en la secuencia de ADN. Estos mecanismos están relacionados con el desarrollo, la homeostasis fisiológica y la adaptación al estrés externo (1). En concreto, la impronta genómica es un proceso epigenético por el cual la expresión de un alelo varía en función del sexo del progenitor del que haya sido heredado (2). La mayoría de los genes autosómicos se expresan de forma codominante. Sin embargo, en algunos loci, uno de los alelos heredados es silenciado por medio de mecanismos epigenéticos, dando como resultado la expresión monoalelica (3,4).

Durante la década de los años 80 una serie de experimentos demostraron que las dos copias haploides del genoma no son intercambiables y, por tanto, que el genoma de ambos progenitores es necesario para el correcto desarrollo embrionario (5–10). En esos experimentos, se crearon embriones de ratón diploides para copias del genoma materno y otros diploides para el genoma paterno. Aunque ambos modelos de embrión comenzaban a desarrollarse, ninguno de ellos conseguía llegar a término: los embriones diploides paternos mantenían un buen desarrollo de tejidos placentarios, pero escaso desarrollo embrionario; mientras que en los embriones diploides maternos ocurría lo contrario (5,7). Posteriormente, la creación de embriones con regiones concretas de disomía uniparental, es decir, cuando las dos copias de un cromosoma provienen de un mismo progenitor, permitió identificar regiones del genoma que presentan una expresión de alelos monoparental de forma fisiológica (6).

Al mismo tiempo, los descubrimientos sobre las alteraciones genéticas de los Síndromes de Prader Willi (disomía uniparental materna del cromosoma 15) y Angelman (disomía uniparental paterna del cromosoma 15) ayudaron a entender el funcionamiento y los mecanismos epigenéticos implicados en la expresión monoalelica de ciertos genes. En definitiva, ayudaron al descubrimiento de la impronta genómica (6,7).

Aunque no se conoce el origen de la impronta genómica, parece estar relacionado con la evolución de la placenta en mamíferos. La tendencia evolutiva ha sido aumentar el número de regiones susceptibles de impronta a medida que se avanza en la escala evolutiva. En este sentido, no se han encontrado mecanismos de impronta genómica en los mamíferos ovíparos y los encontrados en los marsupiales son mucho menores que en los mamíferos placentarios (7,11).

Respecto a su función e importancia, también es desconocida (3), pero la teoría del conflicto genético (Moore y Haig 1991) es la más aceptada hoy en día (10). Ésta propone que existe un conflicto entre los alelos correspondientes al padre y a la madre. Los alelos paternos promueven la extracción de recursos de la madre, para aumentar el crecimiento fetal, mientras que los alelos maternos buscan la restricción del mismo, para conservar sus recursos (5,10,12,13).

En los mamíferos, donde los recursos en el periodo fetal y neonatal provienen únicamente de la madre, los genes de expresión paterna estarían interesados en promover el crecimiento lo máximo posible mientras que los de expresión materna deben asegurar, además, su propia supervivencia. Un crecimiento excesivo del feto podría suponer la inviabilidad del parto o una pérdida sanguínea excesiva durante el mismo. Además, los genes de expresión materna estarían interesados en conservar recursos para futuros embarazos (2,14).

Por todo ello, se cree que los genes improntados son la cara visible de este conflicto (14) y que la impronta genómica habría evolucionado para solucionar el conflicto entre ambos genomas (3).

La placenta, especialmente el trofoblasto, es un órgano que está en el centro de este conflicto y desempeña un papel muy importante ya que es directamente responsable del intercambio de nutrientes entre la madre y el feto (6). De hecho, son muchos los estudios que han demostrado una alta expresión de genes improntados en la placenta y tejidos embrionarios (2,5). En concreto, la placenta tiene características epigenéticas únicas, como bajos niveles de metilación del ADN y patrones específicos de impronta (1,15). Se ha demostrado que la impronta tiene un papel importante en funciones prenatales y que es, en parte, responsable de la regulación del crecimiento fetal y del desarrollo de la placenta (2,3,14). Además, los genes

asociados a la placentación se encuentran sujetos a impronta en un porcentaje mayor que los asociados a otros procesos (16). Por eso, parece razonable pensar que las alteraciones de la impronta genómica podrían estar relacionadas con la insuficiencia placentaria en patologías como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y la preeclampsia.

1.2 PREECLAMPSIA

La preeclampsia es un trastorno hipertensivo del embarazo. Sin embargo, durante la gestación se pueden producir diversos trastornos hipertensivos, los cuales se clasifican en dos grandes grupos:

De presentación precoz (antes de la semana 20 de gestación):

- Hipertensión arterial crónica
- Hipertensión de bata blanca
- Hipertensión enmascarada

De presentación tardía (después de la semana 20 de gestación):

- Hipertensión gestacional
- Hipertensión gestacional transitoria
- Preeclampsia

Centrándonos en la preeclampsia, clásicamente se definía por la presencia de hipertensión ($\geq 140/90$ mmHg) y proteinuria (≥ 300 mg en orina de 24h), a partir de la semana 20 de gestación (4,15,17,18) o antes si era un embarazo gemelar o existía enfermedad trofoblástica. Sin embargo, desde hace unos años, la proteinuria ya no se considera necesaria para el diagnóstico (19). En la actualidad, la preeclampsia se define como la nueva aparición de hipertensión igual o mayor de 140/90 mmHg, medida en dos tomas diferentes separadas por 4-6 horas, en conjunto con una de estas condiciones:

- Proteinuria (demostrada por un ratio proteinuria/creatinuria >0.3 mg/mg o 300mg en orina de 24h)
- Disfunción de órganos maternos

- Disfunción uteroplacentaria

Asimismo, se define como preeclampsia grave aquella con cifras de tensión arterial por encima de 160/110mmHg. La preeclampsia grave puede evolucionar a síndrome de HELLP; eclampsia o bien, no progresar. El síndrome de HELLP consiste en hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y plaquetas bajas (19), mientras que la eclampsia se define por la nueva aparición de convulsiones generalizadas tónico clónicas o coma en una mujer con preeclampsia, hipertensión gestacional o síndrome de HELLP (20).

Otra forma de clasificar la preeclampsia es según el momento de aparición: se denomina preeclampsia temprana a aquella que se manifiesta antes de la semana 34 de gestación y tardía a aquella que se manifiesta, por primera vez, pasada la semana 34 de gestación. Normalmente, la preeclampsia temprana es más severa que la tardía (4,19). Sin embargo, algunos autores consideran que la preeclampsia temprana y la tardía son dos entidades diferenciadas y que, por tanto, deberían estudiarse de forma independiente (4).

Desde el punto de vista clínico, la preeclampsia puede manifestarse como un síndrome materno (hipertensión arterial, proteinuria con o sin afectación multiorgánica) y/o como un síndrome fetal con restricción del crecimiento (17,21).

En general, afecta al 5-7% de todas las gestaciones (18) con una incidencia que varía en función de las características poblacionales, llegando a ser incluso del 10% en algunas regiones (19). Entre los factores de riesgo asociados a la enfermedad se incluyen: los antecedentes personales de preeclampsia en embarazos previos, la hipertensión crónica, la diabetes mellitus, una gestación múltiple, la obesidad, padecer enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y síndrome antifosfolípido, ser nulípara, sufrir enfermedad renal crónica, la edad materna alta, tener una historia familiar de preeclampsia o haber nacido de un embarazo con preeclampsia (13,19,22).

Sobre su fisiopatología, hoy en día casi todos los autores coinciden en dividirla en dos fases: una primera, en la que produce una placentación anormal y una segunda fase, en la que se produce una respuesta inflamatoria sistémica materna (17,19,22–24).

Durante la placentación normal, el citotrofoblasto debe invadir la decidua materna y proceder a la llamada invasión intramural de los vasos (19,22,23). Para llevar a cabo esta tarea, las células del citotrofoblasto se transforman: dejan de expresar moléculas propias de células epiteliales y comienzan a sobreregular receptores y ligandos típicos del endotelio (23). Una vez producido este cambio, el citotrofoblasto penetra a través de las arterias espirales uterinas y comienza en ellas un proceso de remodelado (23). Destruye la túnica media de las arterias y procede a su reendotelización (17,19,22). Tras este proceso, el diámetro de los vasos aumenta, consiguiendo un sistema de baja resistencia y alta capacidad que permitirá el flujo adecuado y necesario para un correcto intercambio materno-fetal (17,19,22). En condiciones normales, la reendotelización ocurre en aproximadamente el 90% de las arterias espirales y penetra hasta el miometrio (4,22,23).

Sin embargo, en placentas con preeclampsia, el citotrofoblasto no se transforma ni invade la decidua de forma adecuada (22,24), el remodelado de las arterias se encuentra reducido, sobre todo en la parte central de la placenta y la reendotelización se produce de forma parcheada e incompleta no llegando a alcanzar el miometrio como en la placentación normal (17,19,22,23). Como consecuencia de todo ello, los vasos uterinos presentan un menor diámetro y no son capaces de proporcionar el flujo sanguíneo necesario, produciendo así una situación de isquemia (17,19,22,23). Además, los vasos defectuosos sufren procesos de aterosclerosis, depósito de fibrina y acumulación de macrófagos, lo que reduce aún más el flujo sanguíneo y agrava la situación de isquemia (19,23). En este sentido, las arterias espirales no son las únicas en las que ocurren alteraciones durante esta enfermedad, sino que también se observan alteraciones y cambios ateroscleróticos en las arterias radiales uterinas (19,22,23).

En cualquier caso, ninguna de estas alteraciones de la placentación es específica de la preeclampsia, ya que también se han observado en casos de RCIU y prematuridad (23). Por lo tanto, en la actualidad, el principal campo de estudio está centrado en averiguar por qué en unos embarazos la placentación anormal produce preeclampsia y en otros no (23); es decir, en la segunda fase de la fisiopatología de la enfermedad (la respuesta inflamatoria sistémica materna).

Se cree que la hipoxia, el estrés oxidativo y el desbalance de factores angiogénicos son los causantes de la respuesta inflamatoria. El círculo de isquemia-reperusión que se produce en la placenta causado por la reducción del flujo sanguíneo, produciría radicales libres y otras sustancias con acción proinflamatoria que se liberarían al torrente sanguíneo materno y ocasionarían los síntomas de la enfermedad (13,17,19,22).

Aunque en los últimos años se han realizado avances en el campo de la fisiopatología y de la prevención de la enfermedad, todavía no existe un tratamiento efectivo más allá de los antihipertensivos clásicos y de la terminación del embarazo (25). Es importante destacar que la preeclampsia sigue siendo una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en el embarazo (19). En el ranking de la morbimortalidad materna la preeclampsia y la eclampsia constituyen la segunda y la tercera causa, por detrás de las hemorrágicas (19). Además, las causas de la preeclampsia siguen siendo uno de los grandes misterios médicos de nuestra época (23) y su fisiopatología no ha sido todavía del todo descrita (19). Por todo ello, resulta de gran interés estudiar el papel que pueda tener la impronta genómica en esta patología.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en:

- Estudiar la posible relación entre las alteraciones de la impronta genómica y la preeclampsia.

Además, como objetivos secundarios, se han planteado los siguientes:

- Estudiar cuáles son los genes improntados descubiertos en la placenta hasta el momento, cuáles son sus funciones, cuál es su relación con el desarrollo de la placenta y del feto y cuál es su papel en la fisiología del embarazo y el metabolismo materno.
- Investigar los cambios en la placenta producidos por las alteraciones de la impronta genómica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura entre marzo de 2019 y marzo de 2020 utilizando Pubmed como fuente principal. Pubmed es una base datos de uso gratuito desarrollada en Estados Unidos, en la National Library of Medicine (NLM), por el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Contiene más de 30 millones de citas y resúmenes de literatura biomédica. No incluye los textos completos, pero sí los links a las revistas externas donde poder consultar los textos completos. Se encuentra disponible al público desde 1996. Su principal base de datos es MEDLINE, pero también contiene citas de múltiples revistas científicas y libros online. Contiene información publicada desde 1966 hasta el presente, además de las referencias de OLDMEDLINE que se remontan a 1953 (26).

La búsqueda bibliográfica realizada puede dividirse en 4 apartados: la búsqueda principal, en la que se estudió la relación de la impronta genómica con la preeclampsia; una segunda búsqueda sobre impronta genómica en la placenta; un tercer apartado en el que se buscaron las últimas revisiones sobre la preeclampsia y el último apartado, donde se buscó información relacionada con alteraciones de genes improntados concretos en la preeclampsia.

1. En cuanto a la búsqueda principal, para estudiar la relación entre la impronta genómica y la preeclampsia se utilizaron los siguientes términos:

“genomic imprinting + preeclampsia” (“genomic imprinting”[MeSH Terms] OR (“genomic”[All Fields] AND “imprinting”[All Fields]) OR “genomic imprinting”[All Fields]) AND (“pre-eclampsia”[MeSH Terms] OR “pre-eclampsia”[All Fields] OR “preeclampsia”[All Fields]), obteniéndose 46 resultados.

“epigenetics + preeclampsia” y “epigenética + preeclampsia” (“epigenomics”[MeSH Terms] OR “epigenomics”[All Fields] OR “epigenetics”[All Fields]) AND (“pre-eclampsia”[MeSH Terms] OR “pre-eclampsia”[All Fields] OR “preeclampsia”[All Fields]), obteniéndose 107 resultados.

“Parent of origin + preeclampsia” (“parents”[MeSH Terms] OR “parents”[All Fields] OR “parent”[All Fields] OR “parent of”[All Fields]) AND origin[All Fields] AND

("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields]), obteniéndose 31 resultados.

Se analizaron el total de 184 resultados obtenidos, aplicando los siguientes criterios de inclusión/exclusión.

En cuanto a los criterios de inclusión, se incluyeron los artículos que trataban:

- La relación entre las alteraciones de la impronta genómica y la preeclampsia.
- La relación entre las alteraciones de la impronta genómica y las enfermedades hipertensivas del embarazo.

En relación con los criterios de exclusión, se descartaron los artículos que:

- Estudiaban la relación entre alteraciones genéticas y la preeclampsia.
- Estudiaban la relación entre las alteraciones epigenéticas que no fuesen la impronta genómica y la preeclampsia.
- Fueran publicados antes del año 2000.
- Se encontraran en idiomas diferentes al inglés y español.

Finalmente, se seleccionaron 13 artículos.

2. Para estudiar la relación de los genes improntados en la placenta, se utilizaron los términos:

“genomic imprinting + placenta” aplicando un filtro para los últimos 10 años ("genomic imprinting"[MeSH Terms] OR ("genomic"[All Fields] AND "imprinting"[All Fields]) OR "genomic imprinting"[All Fields]) AND ("placenta"[MeSH Terms] OR "placenta"[All Fields]) (("genomic imprinting"[MeSH Terms] OR ("genomic"[All Fields] AND "imprinting"[All Fields]) OR "genomic imprinting"[All Fields]) AND ("placenta"[MeSH Terms] OR "placenta"[All Fields])) AND ("2010/01/01"[PDat] : "2020/12/31"[PDat]), obteniéndose 308 resultados.

Dado el gran número de publicaciones que trataban sobre la impronta genómica y terapias de reproducción asistida (Assisted Reproductive Therapy o ART), para concretar la búsqueda se utilizaron los términos: “genomic imprinting + placenta NOT ART” con un filtro para los últimos 20 años (("genomic imprinting"[MeSH

Terms] OR ("genomic"[All Fields] AND "imprinting"[All Fields]) OR "genomic imprinting"[All Fields]) AND ("placenta"[MeSH Terms] OR "placenta"[All Fields])) NOT ("art"[MeSH Terms] OR "art"[All Fields]) AND ("2000/01/01"[PDAT] : "2020/12/31"[PDAT]), obteniéndose 264 resultados.

Se analizaron los 264 resultados obtenidos de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión/exclusión.

En cuanto a los criterios de inclusión, se incluyeron los artículos que trataban:

- La función o importancia de la impronta en la placenta.
- La caracterización, estudio o búsqueda de la impronta en la placenta.

En relación con los criterios de exclusión, se descartaron los artículos que:

- Estudiaban la impronta genómica y su relación con la reproducción asistida.
- Estudiaban la impronta genómica en el cerebro como tema principal.
- Trataban sobre los síndromes producidos por alteraciones de la impronta: Prader Willi, Angelman, Silver Russel y Beckwith Wiedemann.
- Se encontraran en idiomas diferentes al inglés o español.

Finalmente, se seleccionaron 18 artículos.

3. Para estudiar la preeclampsia, su fisiopatología y los últimos avances en su etiología, inicialmente se utilizó el término:

“Preeclampsia” aplicando los filtros “review” y buscando publicaciones de los últimos 2 años (("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields]) AND ("review"[Publication Type] OR "review literature as topic"[MeSH Terms] OR "review"[All Fields])) AND (Review[ptyp] AND ("2017/01/01"[PDAT] : "2019/12/31"[PDAT])), obteniéndose un total de 1077 resultados.

Dado el gran número de publicaciones se introdujeron los términos “pathophysiology” y “placentation”:

“preeclampsia + pathophysiology” (("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields]) AND

("physiopathology"[Subheading] OR "physiopathology"[All Fields] OR "pathophysiology"[All Fields])) AND (Review[ptyp] AND ("2017/01/01"[PDAT] : "2020/12/31"[PDAT])), obteniéndose un total de 273 resultados.

“preeclampsia + placentation” (("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields]) AND ("placentation"[MeSH Terms] OR "placentation"[All Fields])) AND (Review[ptyp] AND "2015/01/01"[PDat] : "2020/12/31"[PDat]), obteniéndose un total de 144 resultados.

Los 417 resultados obtenidos se analizaron de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

En cuanto a los criterios de inclusión, se incluyeron los artículos que trataban:

- Los últimos avances respecto a la fisiopatología de la preeclampsia.

En relación con los criterios de exclusión, se descartaron los artículos que:

- Estudiaban las opciones terapéuticas de la preeclampsia.
- Estudiaban métodos de cribado de la preeclampsia.

Finalmente, se seleccionaron 7 artículos.

Además de la búsqueda bibliográfica en Pubmed, para conseguir definiciones clínicas actualizadas sobre la preeclampsia y la eclampsia, se utilizó la base de datos de UpToDate, que es una base de datos online que reúne y resume la evidencia médica más actualizada sobre diferentes patologías médicas.

4. Por último, para buscar la asociación entre genes imprintados concretos y la preeclampsia se utilizaron los términos:

“PHLDA2 + preeclampsia” (PHLDA2[All Fields] AND ("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields])), con 5 resultados.

“H19 + preeclampsia” (H19[All Fields] AND ("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields])), con 20 resultados.

“Dlx5 + preeclampsia” (Dlx5[All Fields] AND ("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields])), con 5 resultados.

“Igf2 + preeclampsia” (Igf2[All Fields] AND ("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields]), con 15 resultados.

“Mest + preeclampsia” (mest[All Fields] AND ("pre-eclampsia"[MeSH Terms] OR "pre-eclampsia"[All Fields] OR "preeclampsia"[All Fields]), con 4 resultados.

Por tanto, en total se obtuvieron 49 resultados y se analizaron de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

En cuanto a los criterios de inclusión, se incluyeron los artículos que:

- Estudiaban de forma experimental la relación de un gen improntado concreto con la preeclampsia.

En relación con los criterios de exclusión, se descartaron los artículos que:

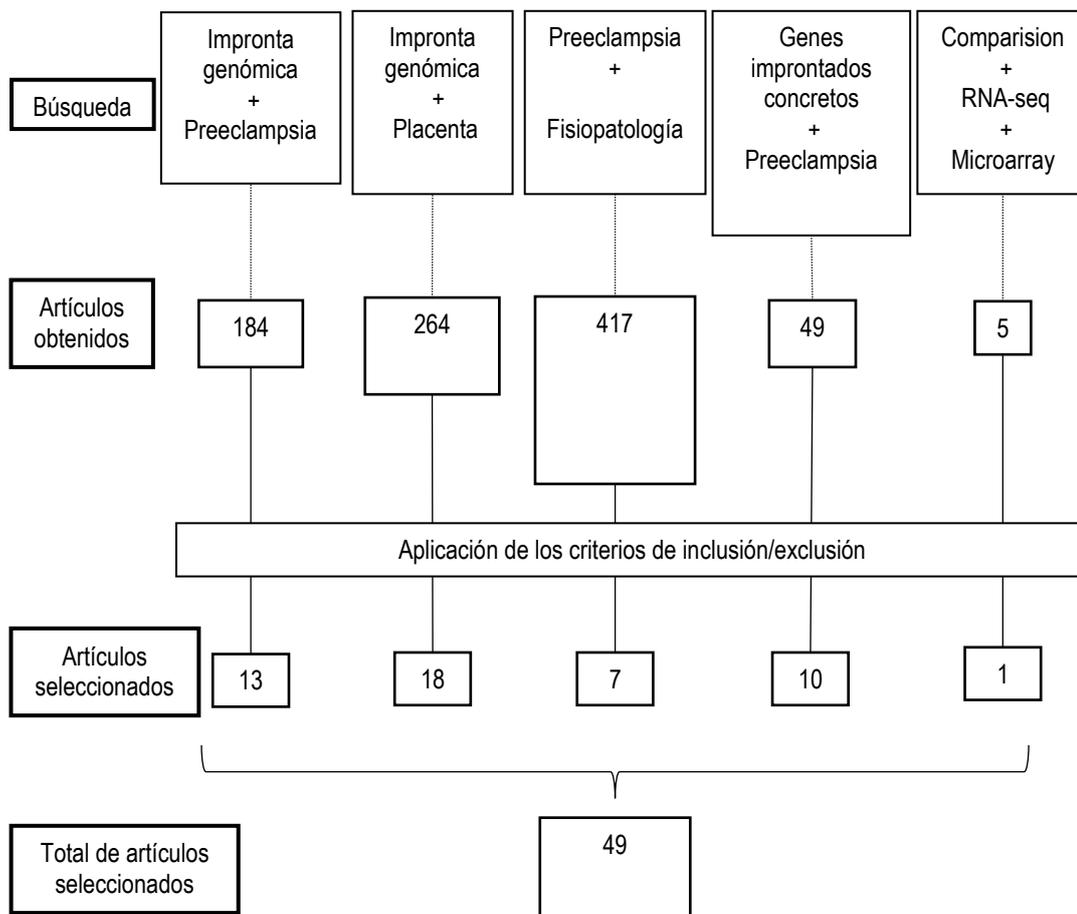
- Fueron publicados antes del año 2000.
- Sólo llevaban a cabo su estudio en modelos animales.
- Sólo estudiaban la RCIU u otras patologías del embarazo.

Finalmente, 13 artículos cumplieron los criterios, pero 3 de ellos ya se habían recogido en una búsqueda previa. Por lo tanto, se seleccionaron 10 artículos.

5. Por otro lado, se realizó una última búsqueda, no relacionada con el tema principal de esta revisión, utilizando los términos “comparision + RNA-seq + Microarray + transcriptome” y un filtro para los últimos 10 años (Comparison[All Fields] AND ("rna-seq"[MeSH Terms] OR "rna-seq"[All Fields] OR ("rna"[All Fields] AND "seq"[All Fields]) OR "rna seq"[All Fields]) AND Microarray[All Fields] AND ("transcriptome"[MeSH Terms] OR "transcriptome"[All Fields])) AND ("2010/01/01"[PDat] : "2020/12/31"[PDat]). Se analizaron los 5 artículos que mejor se ajustaron a la búsqueda y finalmente, se incluyó uno en esta revisión.

Por lo tanto, en resumen, se incluyeron un total de 49 artículos para la realización de este Trabajo de Fin de Grado, según la búsqueda bibliográfica descrita, tal como se resume en la **Figura 1**.

Figura 1. Esquema que representa la búsqueda bibliográfica realizada y la selección de artículos.



Además de Pubmed, se obtuvo información de la base de datos Geneimprint y su base de datos asociada, Catalogue of Parent of Origin Effects. Geneimprint es una base de datos online creada en 1995. Es de acceso libre y recoge artículos, revisiones, recortes de prensa, conferencias en audio y vídeo relacionadas con los campos de la epigenética e impronta genómica. En ella, se revisaron los genes improntados descubiertos hasta el momento, su localización y su patrón de expresión (27,28).

4. RESULTADOS

4.1. GENES IMPRONTADOS DESCUBIERTOS EN LA PLACENTA

Los análisis bioinformáticos realizados hasta el momento sugieren la existencia de un gran número de genes improntados en el genoma humano. Sin embargo, los estudios experimentales no consiguen demostrar el estatus de impronta de todos estos genes (29).

A día de hoy, se han identificado alrededor de 100-150 genes improntados en la especie humana (27,28) y un gran porcentaje de ellos también se expresan de forma monoaleica en la placenta (3,30).

La mayoría de estos genes sujetos a impronta se encuentran agrupados, formando clusters (9). Estos clusters están controlados por regiones específicas del genoma, conocidas como imprinting control regions (ICR) (16,30). Las ICR tienen características epigenéticas únicas que les permiten controlar la expresión monoaleica de los genes improntados (30). Además, las ICR no mantienen la misma metilación entre tejidos, individuos o sexos, por lo que de esta manera pueden alterar la expresión genética. Por otro lado, cuando una ICR cambia su metilación se denomina differentially methylated region (DMR).

Otros genes improntados, un número menor que los pertenecientes a clusters, se encuentran dispersos por el genoma, sin estar agrupados. Estas regiones de impronta se denominan micro-imprinted loci (9).

Son muchos los estudios que han analizado la expresión de genes improntados en la placenta, tanto los pertenecientes a clusters como los micro-imprinted loci (2,3,6–8,11,15,25,29,31–33). En la **Tabla 1** se recogen los genes sujetos a impronta genómica descubiertos en la placenta hasta el momento.

Tabla 1. Genes improntados descubiertos en la placenta.

GEN	CHR	REF	GEN	CHR	REF	GEN	CHR	REF
CYP2J2		33	MAGI2		3, 29	C14MC		3
DIRAS3		3, 8	MEST		3, 6, 8, 11, 33	DLK1		3, 6, 11
EPS15		3	PEG10		3, 6-8, 11, 25, 33	IG-DMR		33
GNG12-AS1	chr1	3	PPP1R9A	chr7	3, 6	MEG3/GTL2	chr14	3, 8, 11
PPIEL		3, 8	TFP12		3, 6	MEG8		3
THAP3		33	SGCE		3, 6	RTL1		3, 11
TP73		6	ERLIN2		3, 8	IGF1R		3, 33
EGR4		33	TRAPPC9		8, 33	IPW		29
GPR1-AS		3, 8, 33	ZFAT		3, 11, 29, 33	IRAIN		3
TMEM17	chr2	33	ZFAT-AS1		3, 29	RASGRF1		3
ZDBF2		3	DCAF10		8, 33	RGMA	chr15	8, 33
AK097792		3	GLIS3	chr9	8, 18, 29	SNRPN		3, 6, 8
MCCC1	chr3	3, 8, 33	AIFM2		3	SNURF		33
BANK1		33	ARMC3		3	SORD		33
NAP1L5	chr4	3, 8, 33	CTNNA3		3	UBE3A		3
PDE4D		8, 33	FAM196A		8, 33	CMTM3		3, 33
RHOBTB3	chr5	3	INPP5F		8, 29	NAA60	chr16	3
SNCB		3	ANO1		3	ZNF597		3, 6, 8, 29, 33
AIM1		3,8,11,32,33	CDKN1		3, 6	C17ORF97		33
CD83		33	H19		3, 6, 8, 11, 33	FAM20A	chr17	8, 33
FAM50B		3, 8, 33	IGF2		3, 6, 11, 31	SEPT4		33
HYMAI		3	INS		6	ZNF396	chr18	3, 8, 33
IGF2R		3	KCNQ1		6	DNMT1		3, 8
LIN28B	chr6	3, 8, 29, 33	KCNQ1OT1	chr11	3, 8	NLRP2		3
PLAGL1		3, 6, 8, 11, 33	KvDMR1		33	PEG 3	chr19	3, 6, 8, 33
SLC22A3		3	NAV2		33	ZIM2		3, 6
WDR27		3	NTM		29	ZNF331		3, 6, 8, 33
AGBL3		3, 8, 33	PHLDA2		3, 6, 11	GNAS		3
COPG2		3	SLC22A18		3, 6	GNAS XL		3, 6
DLX5		2, 15	ZC3H12C		3, 8, 29, 33	L3MBTL1	chr20	3, 8
GRB10		3, 6, 29, 33	ST8SIA1		3	MCTS2P		3, 33
HECW1	chr7	33	TBC1D30	chr12	33	NESP		3, 6
HTR5A		8, 33	WIF1		3	DSCAM		32
KLF14		3, 6	KLHL1		33	WRB	chr21	3
LEP		3	N4BP2L1	chr13	8, 33	MOV10L1	chr22	3
			RB1		33			

Se indica el nombre del gen, el cromosoma (CHR) en el que se localiza y las referencias (REF) de los estudios que los describen.

4.2. IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LOS GENES IMPRONTADOS EN LA PLACENTA

Muchos estudios concluyen que las alteraciones de la expresión de los genes sujetos a impronta producen anomalías del desarrollo de la placenta y el feto (6,10,12,34–37).

Por ejemplo, en 2012, Lambertini et al. analizaron la asociación de 22 genes improntados en la placenta con el crecimiento fetal. Tomaron como parámetros de crecimiento la circunferencia craneal, el peso al nacimiento y el tamaño ajustado por la edad gestacional, y demostraron la asociación de la mayoría de los genes analizados con el crecimiento fetal (35).

En octubre de 2019, Vincenz et al. analizaron la expresión de 91 genes improntados en 52 placentas de una serie multigeneracional compuesta en la República de Mali, en África occidental. Descubrieron que la pérdida de impronta de ciertos genes es bastante común y que esta pérdida de impronta se relaciona con mayor talla al nacimiento. Además, las placentas con mayor peso asociaban una mayor pérdida de impronta (34).

Algo que tienen en común las patologías causadas por alteraciones de la impronta, como el síndrome de Beckwith Wiedmann (sobrecrecimiento fetal y en la infancia temprana (10)) y el síndrome de Silver Russell (restricción severa del crecimiento prenatal y postnatal (10,37)), son los defectos del desarrollo, crecimiento y adquisición de nutrientes en las primeras etapas de la vida (6,16,38). Además, se han encontrado alteraciones de la impronta genómica en placentas de embarazos con RCIU y otras patologías del crecimiento en el embarazo (12).

Los estudios en modelos animales han permitido demostrar que los genes improntados regulan el desarrollo de la placenta actuando sobre su área de superficie, el tamaño del laberinto y el área de intercambio de nutrientes (10,12,16). Asimismo, regulan la densidad vascular tanto de la placenta, como del útero. Y también tienen la capacidad de modular el transporte transplacentario alterando la expresión de diferentes transportadores de nutrientes e iones (12). Incluso regulan procesos metabólicos y de utilización de glucosa (10,16). Además de regular procesos a nivel placentario, actúan directamente en las vías/rutas de crecimiento del embrión (por

ejemplo, a través de la vía del gen insuline like growth factor 2 o IGF2), por lo que al actuar sobre estas vías regulan la demanda fetal de nutrientes. Por último, también controlan y alteran la fisiología materna al controlar la diferenciación de las células endocrinas derivadas del trofoblasto y producir hormonas fetoplacentarias (16). Por todo ello, en resumen, los genes improntados en la placenta regulan directamente el crecimiento fetal, regulan indirectamente el crecimiento fetal modificando la función de la placenta, modulan procesos metabólicos postnatales, modifican el comportamiento postnatal y mantienen un equilibrio entre la oferta de nutrientes maternos y el crecimiento fetal (12,30,36).

De la misma manera que las mutaciones de clusters de genes improntados producen grandes alteraciones del desarrollo y síndromes complejos como el síndrome de Silver Russel y el de Beckwith Wiedmann, las alteraciones de un único gen producen pequeños cambios fenotípicos y alteraciones del desarrollo (10). Así, varios modelos animales mutantes *in vivo* con deleciones o pérdida de impronta de un solo gen han permitido explorar dichas alteraciones (10,12). Diversos estudios asocian el fenotipo de restricción del crecimiento fetal con la pérdida de la expresión de los genes de expresión paterna IGF2, PEG1, PEG10 o PEG3 y el sobrecrecimiento fetal con la pérdida de expresión de los genes de expresión materna IGF2R, H19 o PHLDA2, entre otros (9,10,39). En la **Tabla 2** se detallan los fenotipos asociados a la sobreexpresión o infraexpresión de ciertos genes improntados en la placenta.

Tabla 2. Fenotipos asociados a la sobreexpresión o infraexpresión de genes improntados en la placenta.

GEN	FUNCIÓN	FENOTIPO SI PÉRDIDA DE IMPRONTA	FENOTIPO SI PÉRDIDA DE EXPRESIÓN	REF
IGF2 (P)	Factor de crecimiento	Sobrecrecimiento fetal y placentario	Restricción del crecimiento. Placenta: menor área de trofoblasto, aumento del espesor de la barrera, menos células trofoblásticas glucogénicas	9-12, 39
IGF2R (M)	Controla la impronta de IGF2		Sobrecrecimiento	9, 12
GRB10 (B)	Fosforilación de protein kinasa y apoptosis	Restricción del crecimiento postnatal	Sobrecrecimiento fetal y placentario	7, 9, 10, 39
H19 (M)	ARN no codificante, controla impronta de IGF2	Crecimiento retardado postnatal	Sobrecrecimiento fetal. Placenta: mayor área trofoblástica, mayor número de células trofoblásticas glucogénicas	9, 10, 12
PEG1 (P)	Regulación del crecimiento		Restricción del crecimiento y alteraciones del comportamiento materno. Placenta: angiogénesis defectuosa	7, 9, 12
CDKN1C (M)	Regulador negativo de la proliferación celular	Restricción del crecimiento	Embrión 11% más grande Placenta: sobrecrecimiento placentario, más espongiotrofoblasto	9, 10, 12, 39
DLK1 (P)	Promotor del crecimiento	Sobrecrecimiento	Restricción del crecimiento, deformaciones del esqueleto	9, 10
KCNQ1OT1 (P)	ARN no codificante		Síndrome de Beckwith Wiedemann	10
MEST (P)	Diferenciación neuronal Invasión trofoblástica		Restricción del crecimiento fetal, menor tamaño placentario	10, 11, 39
PEG10 (P)	Proliferación celular y apoptosis		Restricción del crecimiento severa, reducción del espongiotrofoblasto	10, 11
PEG3 (P)	Supresor de la transcripción y apoptosis	Alteraciones metabólicas complejas	Restricción del crecimiento fetal y placentario	10, 16, 39
PLAGL1 (P)	Supresor tumoral y del crecimiento celular		Defectos del esqueleto, letalidad neonatal, RCIU	10, 11
PHLDA2 (M)	Apoptosis	Retraso del crecimiento placentario	Sobrecrecimiento placentario	7, 10, 39
RB1 (M)	Supresor tumoral		Proliferación excesiva del trofoblasto	10

(B) = expresión de ambos alelos, (M) = expresión del alelo materno, (P) = expresión del alelo paterno, RCIU = restricción del crecimiento intrauterino, REF = referencia.

4.3. IMPRONTA GENÓMICA ALTERADA EN LA PREECLAMPSIA

En 2015 Kobayashi et al. realizaron una revisión sistemática de la literatura sobre las alteraciones genéticas relacionadas con la preeclampsia. Encontraron 140 genes significativamente alterados (sobrerregulados o regulados negativamente) reportados en placentas de embarazos con preeclampsia (40,41), estando la mayoría de ellos relacionados con el crecimiento celular (110 genes) o con la restricción del mismo (30 genes) (41).

En un estudio posterior (42), Kobayashi analizó en profundidad los genes regulados negativamente recopilados en la revisión previa. Entre los 50 genes que analizaron, 25 (el 50%) se encontraron cerca o dentro de un cluster de impronta genómica.

En 2017, Christians et al. analizaron la expresión genética en 157 muestras de tejido placentario y concluyeron que los genes improntados estaban más desregulados en muestras con preeclampsia que lo esperado debido al azar. En concreto, los genes de expresión paterna (paternally expressed genes o PEG) se encontraron regulados negativamente y los genes de expresión materna (maternally expressed genes o MEG) sobrerregulados (2).

En 2017 J. Zadora et al. buscaron genes con expresión diferencial (differentially expressed genes o DEG) entre un grupo de placentas con preeclampsia y un grupo control. Posteriormente, cruzaron los DEG que encontraron con la lista de genes improntados en seres humanos descubiertos hasta el momento y encontraron hasta 150 genes improntados desregulados en las muestras de placentas con preeclampsia (15).

En base a los estudios revisados, a continuación, se exponen los genes improntados en relación con la preeclampsia. El papel de algunos de ellos en patologías del embarazo ha sido ampliamente estudiado, como es el caso de los genes IGF2 y PHLDA2 (6,10,14,39,43–45); mientras que otros genes, como DLX5, no han sido estudiados a fondo en relación con la patología del embarazo (15).

4.3.1. Gen CDKN1C

El gen CDKN1C (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C), localizado en el cromosoma 11 (3), se encuentra improntado tanto en humanos como en ratones (4). La expresión de este gen es materna, encontrándose improntado el alelo paterno. En cuanto a su función, se trata de un regulador negativo de la proliferación celular (10).

Diversos estudios en ratones han demostrado que madres heterocigotas para la deficiencia de CDKN1C (-/+) desarrollan síntomas tipo de la preeclampsia (hipertensión y proteinuria) (3,4,6,30,39). Los síntomas fueron desarrollados en hembras heterocigotas (-/+) emparejadas tanto con machos heterocigotos (-/+), como con machos wildtype (+/+). Sin embargo, no aparecieron dichos síntomas en hembras wildtype (+/+) emparejadas con machos heterocigotos (-/+) (4). Además, las hembras cuyos fetos resultaron homocigotos para la deficiencia de CDKN1C (-/-) mostraron síntomas muy graves de preeclampsia y una falta de invasión trofoblástica (4).

Asimismo, los estudios en humanos revelan que ocurre algo similar. Se ha observado que mujeres que gestan fetos afectados del síndrome de Beckwith Wiedmann (una enfermedad rara causada por alteraciones de la impronta genómica de los genes H19, CDKN1C y KCNQ1OT1), padecen una forma muy severa de preeclampsia y, en ocasiones, síndrome de HELLP (un tipo especial de preeclampsia grave) (3,30,38,46). Además, otros estudios han demostrado que los casos en los que el síndrome de Beckwith Wiedmann es causado por alteraciones del gen CDKN1C las madres son mucho más propensas a sufrir preeclampsia (6,38,46).

4.3.2. Gen DLX5

El DLX5 (distal-less homeobox 5) es un gen improntado paterno (expresión materna) que se localiza en el cromosoma 7. Ha sido bien estudiado tanto en ratones como en humanos y está implicado en el desarrollo del hueso y del cerebro, pero su función en la placenta no está bien descrita.

En el estudio de 2017, Zadora et al. demostraron que el trofoblasto expresa DLX5 y que su expresión está controlada por mecanismos de impronta. En el 70% de las muestras con preeclampsia, el gen DLX5 estaba sobrerregulado y esta

sobrerregulación se correspondía con una pérdida de su impronta. También existía una expresión aumentada de la proteína DLX5 en tejidos con preeclampsia respecto al grupo control (15). Posteriormente, Zadora et al. crearon un modelo *in vitro* en células de trofoblasto SGHPL-4 con sobrerregulación de DLX5 y lo compararon con las muestras recogidas de placentas con preeclampsia. Así, descubrieron que su modelo *in vitro* y las muestras *in vivo* compartían las mismas alteraciones en el transcriptoma celular y en algunas vías moleculares desreguladas (15).

4.3.3. Gen PEG10

El gen PEG10 (paternally expressed gene 10), localizado en el cromosoma 7, es un gen con impronta materna y expresión paterna. Codifica al menos dos proteínas: PEG10 RF1 y PEG10 RF1/2. Muestra una elevada expresión en células del trofoblasto y citotrofoblasto. Su relación con la patología tumoral ha sido ampliamente estudiada, sobre todo su rol en el cáncer metastásico y la apoptosis. También se ha relacionado previamente con patologías del embarazo como el aborto. En 2014 Liang et al. investigaron la expresión del gen PEG10 en tejido placentario de embarazos con preeclampsia y observaron que su expresión era significativamente menor en comparación con el grupo control (25).

4.3.4. Gen PHLDA2

El gen PHLDA2 (Pleckstrin homologylike domain family A member 2), localizado en el cromosoma 11, es un gen improntado paterno, de expresión materna. Este gen regula de forma negativa el tamaño del espongiotrofoblasto, ya que su pérdida reduce en un 50% el tamaño de este compartimento (14). Su pérdida de impronta se ha asociado previamente con un desarrollo placentario anormal y con restricción del crecimiento fetal (6,43), siendo varios los estudios que han demostrado que los niveles de PHLDA2 están significativamente aumentados en placentas con RCIU (14,43,44).

En un estudio de 2015, F. Jing et al. compararon las diferencias de expresión del gen PHLDA2 en 15 placentas con preeclampsia y 15 placentas control (44) y observaron que su expresión estaba aumentada en las placentas con preeclampsia. Además,

vieron que la sobreexpresión resultó en defectos de la proliferación, migración e invasión del trofoblasto en modelos *in vitro* de células JEG-3 (30,44).

Sin embargo, en enero de 2020, Ding et al. no han encontrado asociación entre la expresión aberrante o la pérdida de impronta del gen PHLDA2 y el síndrome de HELLP y la preeclampsia grave en un estudio con 162 casos y 33 controles (43).

4.3.5. Gen H19

El gen H19, localizado en el cromosoma 11, muestra un modelo de expresión cambiante: durante las primeras 10 semanas de gestación se expresa de forma bialeica (sin estar sujeto a impronta) y a partir de esa semana, el alelo paterno pasa a estar improntado (47,48).

Se trata de ARN no-codificante y desarrolla su función en forma de ARN. Parece que su función está muy relacionada con contrarregular el gen improntado de expresión paterna IGF2. Está muy expresado en tejidos embrionarios y tiene algún papel en la diferenciación del citotrofoblasto, dado que los modelos animales con pérdida de este gen desarrollan hiperplasia de todas las capas de la placenta. Por tanto, pertenece al grupo de genes que regulan el desarrollo de la placenta, aunque su función no está del todo definida (47,48).

En 2009, L.Yu et al. descubrieron que un porcentaje significativo de muestras de placentas con preeclampsia tenían expresión bialeica de H19, demostrando que la pérdida de impronta ocurre en pacientes con preeclampsia. Además, había una diferencia significativa entre los síntomas de las pacientes con preeclampsia y expresión bialeica de H19 y las pacientes con preeclampsia y expresión monoaleica de dicho gen. Las primeras sufrían hipertensión severa, las segundas solo moderada (48).

En 2011, W. Gao et al. analizaron el nivel de metilación del promotor de este gen en un grupo de placentas con preeclampsia. Encontraron una marcada hipermetilación de la región promotora del gen H19 en el grupo con preeclampsia en comparación con el grupo control, así como una expresión reducida de H19 (47).

4.3.6. Genes MEST y DLK1

El gen MEST (mesoderm-specific transcript), localizado en el cromosoma 7, es de expresión paterna e impronta materna. Codifica una proteína de la familia de la α/β -hidroxilasa y se cree que participa en la angiogénesis del trofoblasto y la decidua (37).

El gen DLK1 (Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1) es un gen improntado, localizado en el cromosoma 14, que tiene una expresión del alelo paterno. Codifica una proteína transmembrana llamada Pref-1 (pre adipocyte factor 1) y funciona como un regulador del crecimiento celular. La Pref-1 se ha visto aumentada en la sangre de fetos con peso bajo para la edad gestacional y se considera un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta (37).

Tanto MEST como DLK1 son genes improntados que han sido relacionados previamente con la regulación de la diferenciación de los adipocitos y están por tanto involucrados en patologías como la obesidad, hipertensión y diabetes mellitus (37).

En 2017, X. Wang et al. analizaron los niveles de metilación de DMRs de MEST y DLK1 en el cordón umbilical de neonatos nacidos de embarazos con preeclampsia y sin ella. Los cambios en la metilación de algunas DMRs fueron estadísticamente significativos entre los embarazos con preeclampsia y sin ella. Sin embargo, no había grandes cambios en la metilación entre los casos graves de preeclampsia y los leves (37).

4.3.7. Genes IGF2 y GNAS

El gen IGF2 (insuline like growth factor 2) fue uno de los primeros genes improntados descubiertos. Es de expresión paterna y se localiza en el cromosoma 11. Se trata de un factor de crecimiento que promueve el crecimiento del embrión y la placenta. Además, está implicado en la regulación y metabolismo de insulina y glucosa (45).

El GNAS (guanine nucleotide binding proteine Alpha stimulating), localizado en el cromosoma 20, tiene un patrón de expresión más complejo y variado: expresión materna, paterna o bialeica. Es un locus complejo que codifica varias proteínas (45).

Estudios previos demostraron que eventos adversos en el medio producían cambios en la metilación de los DMRs de estos genes y que los fetos con estas alteraciones desarrollaban bajo peso al nacimiento y desarrollaban diabetes e hipertensión a lo largo de su vida (45).

En un estudio de 2013, muy parecido al de Wang et al., Jing He et al. buscaron cambios en la metilación de los DMRs de los genes IGF2 y GNAS en el cordón umbilical de 160 neonatos (56 de madres con preeclampsia, 23 de madres con hipertensión y 81 de madres sin complicaciones) (45). Aunque no encontraron diferencias significativas en la metilación de GNAS, sí que observaron que los niveles de metilación del DMR de IGF2 fueron significativamente menores en el grupo de preeclampsia que en el resto de los grupos (45).

4.4. IMPRONTA GENÓMICA EN LA PLACENTA Y METABOLISMO MATERNO

Siguiendo la teoría del conflicto genético de Moore y Haig, las hormonas placentarias, que tienen capacidad para manipular el comportamiento de la madre durante el embarazo, serían candidatas para estar reguladas de alguna forma por la impronta genómica (14). Como se ha mencionado antes, los genes improntados tienen capacidad para regular la producción de hormonas fetoplacentarias e influenciar el comportamiento materno (14,16,30).

Diferentes estudios han demostrado que productos de genes improntados como el gen DLK1 llegan a la circulación materna y modulan el metabolismo materno durante el embarazo (14). Además, se ha asociado la expresión de genes improntados como el PHLDA2, CDKN1C, PEG3 y PEG10 con los niveles de lactógeno placentario (14). Pero, sin duda, los descubrimientos más interesantes en este campo son los relacionados con el gen improntado de expresión paterna PEG3.

El gen PEG3, localizado en el cromosoma 19, codifica una proteína de la familia de las proteínas con dedo de zinc, implicada en mecanismos supresores de la transcripción y apoptosis (16,39). Además, regula estirpes de células endocrinas en la placenta y tiene una expresión importante en el hipotálamo (14).

Estudios en ratones han demostrado que los ratones con mutaciones en este gen tienen un crecimiento retardado y entran de forma retrasada en la pubertad. Además, en la edad adulta, muestran alteraciones de la homeostasis de energía. Durante el embarazo, las hembras gestantes de ratones con mutaciones del gen PEG3 no modifican su comportamiento; es decir, no consumen más alimentos y como consecuencia, tienen fetos pequeños. Además, tras el nacimiento, no construyen nidos y no alimentan a su descendencia de forma apropiada (16).

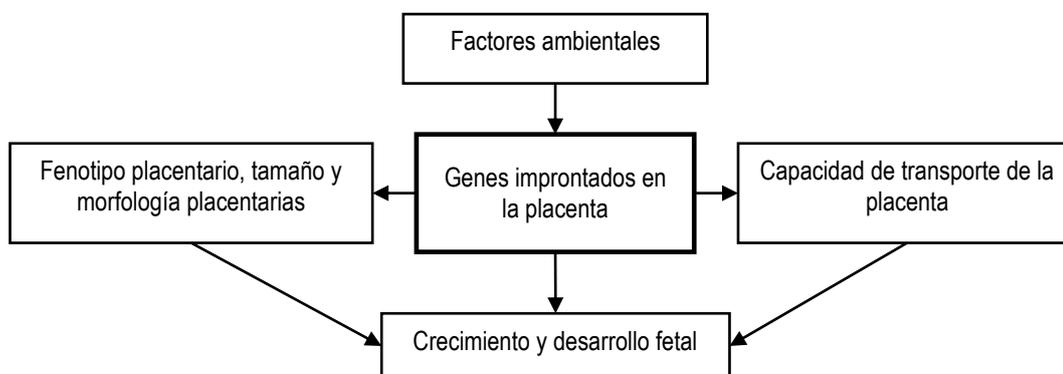
En humanos, se ha descubierto que los estados depresivos en el embarazo, tanto la depresión durante el embarazo como la depresión postparto, están asociados a niveles bajos de expresión de PEG3. Además, como se mencionaba anteriormente en la **Tabla 2**, la pérdida de expresión de PEG3 produce restricción del crecimiento fetal (10,14,16,39). Por último, niveles bajos de expresión de PEG3 se correlacionan con los niveles de lactógeno placentario. La relación entre los estados depresivos del embarazo, la reducción del crecimiento fetal y un menor periodo de lactancia o incluso la ausencia de lactancia materna ya era conocida. Sin embargo, la asociación de todos ellos con un nivel reducido de la expresión de PEG3 sugiere que podrían ser manifestaciones de la misma entidad: una disfunción endocrina placentaria creada por alteraciones de la impronta del gen PEG3 (14).

5. DISCUSIÓN

Tras analizar los diferentes estudios, parece clara la importancia de los genes improntados en el desarrollo y funciones de la placenta. Los síndromes y fenotipos causados por la alteración de la impronta genómica en la placenta demuestran la relación de los mismos con las vías y procesos de desarrollo, función y crecimiento tanto de la placenta como del feto.

En resumen, como se refleja en la **Figura 2**, los genes improntados tienen una función importante en la determinación del fenotipo de la placenta, regulan el crecimiento de muchos tipos celulares y controlan otros aspectos como la superficie del área de intercambio de nutrientes y la densidad vascular. También influyen en el intercambio de recursos entre la madre y el feto, controlando el crecimiento placentario y fetal. Además, actúan en la programación del fenotipo en la primera infancia y, posiblemente, en la edad adulta. Y a su vez, dichos genes se encuentran influenciados por el entorno. Todo ello da muestra de la gran complejidad del tema de estudio y de la importancia de profundizar en su conocimiento, ya que las alteraciones de la impronta genómica en la placenta pueden afectar no sólo durante el desarrollo prenatal, sino también extenderse al periodo postnatal.

Figura 2. Relación de los genes improntados en la placenta con los factores ambientales y el desarrollo placentario y fetal.



Sin embargo, la asociación de la impronta genómica con la preeclampsia no está tan clara. Son muchos los estudios que plantean una hipótesis sobre la posible relación de las alteraciones de la impronta genómica con la enfermedad, pero no tantos los que proporcionan una evidencia. Aunque algunos estudios que analizan de forma experimental la relación entre ambas encuentran diferencias estadísticamente significativas y son pocos los estudios consultados que no logran encontrar una relación entre un gen improntado y la preeclampsia (21,36), el principal problema reside en la gran heterogeneidad de los estudios, la falta de reproductibilidad, el pequeño tamaño muestral y el reducido número de publicaciones.

Existe una gran heterogeneidad entre los estudios publicados tanto en lo referente a la impronta genómica en la placenta como a su relación con la preeclampsia. Así, aunque la mayoría coinciden en ciertos genes, cada estudio detecta un nuevo gen o una nueva alteración de la impronta o la metilación que otros estudios no son capaces de reproducir, lo que puede ser debido a muchas razones.

En primer lugar, los diferentes estudios utilizan distintas técnicas para la identificación de los genes improntados. Tradicionalmente, el método para el estudio e identificación de estos genes ha sido la creación de embriones de ratón diploides para genes maternos, o bien paternos; de esta manera se caracterizaron la mayoría de los grandes clusters de impronta (3,7,29). El equivalente en humanos, ha sido el estudio de molas trofoblásticas completas, que por su naturaleza son diploides para genes paternos (3). Los estudios más recientes, utilizan sobre todo técnicas de microarrays (chips de ADN o ARN) (2,8,18,29,32) o técnicas de secuenciación del ARN (11,18,34), mientras que los estudios que analizan un único gen utilizan técnicas de inmunohistoquímica y PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (25,47–49). Cada una de estas técnicas tiene una especificidad y sensibilidad diferentes y, aunque los estudios hablen de una gran correlación entre los resultados de los análisis realizados con secuenciación de ARN y chips de ARN, también hablan de una capacidad mayor de la secuenciación de ARN para la detección de DEG (50).

En segundo lugar, las mutaciones que ocurren en los clusters de impronta producen grandes alteraciones fenotípicas que son más fácilmente detectables, de hecho, casi

todos los estudios coinciden en lo referente a estos clusters. Sin embargo, los genes sujetos a impronta que se encuentran diseminados por el genoma son más difíciles de detectar (29). Las dificultades para identificar nuevos genes improntados pueden deberse a la falta de una secuencia caracterizada común a todos ellos (29).

En tercer lugar, los estudios se centran en buscar diferencias en la metilación de los promotores de las regiones de impronta, en lugar de analizar la metilación y la expresión de forma conjunta. Esto cobra especial importancia tras descubrimientos como los de Monteagudo-Sánchez et al., que en 2019 han encontrado diferencias en la expresión del gen improntado PHLDA2 en placentas de embarazos con RCIU sin encontrarse alterada la metilación de su promotor (51). De igual manera, se han encontrado diferencias en la expresión de los genes improntados IGF2R y SLC22A sin existir diferencias en la metilación de su ADN (8). Asimismo, otros estudios tampoco encuentran correlación entre la metilación del promotor del ADN de ciertos genes improntados y su expresión (18).

Otro problema que surge al centrarse únicamente en la búsqueda de diferencias en la metilación es que se pasan por alto otros mecanismos epigenéticos que también son esenciales para la impronta genómica: el código de histonas y los micro ARN. Aunque sí que existen estudios que analizan el papel de los micro ARN en la placenta (52), son mucho menos frecuentes que los centrados en las diferencias de metilación; lo que resulta algo desafortunado, ya que su análisis en sangre periférica materna podría usarse para el cribado de la preeclampsia (1).

En cuarto lugar, la ausencia de bases de datos actualizadas de genes improntados por tejidos dificulta su estudio. Cada vez se descubren más genes que muestran una expresión monoalélica exclusivamente en la placenta u otro tejido específico, pero las bases de datos más importantes y conocidas (27,28) separan los genes improntados por especies y no por tejidos.

Por otro lado, la preeclampsia es un síndrome muy complejo que se clasifica en función de diferencias fenotípicas (18,53) y existen diferentes definiciones para esta patología. En general, las definiciones clínicas agrupan a mujeres que necesitan ser vigiladas de forma más exhaustiva, mientras que las definiciones teóricas, tienen criterios más estrictos para incluir a una mujer en el grupo de preeclampsia (53).

Además, las técnicas que se utilizan en la práctica clínica para definir los marcadores de preeclampsia, como son la tensión arterial y la albuminuria, son poco precisas. Es conocido que la medida de la tensión arterial es un procedimiento tremendamente variable, y para el cálculo de la excreción de albúmina en orina en 24 horas, cada vez se usa menos la recogida de orina de 24 horas por su dificultad, por lo que en su lugar, se utilizan ratios albúmina/creatinina que no son tan fiables (53). Los estudios consultados, utilizan diferentes definiciones de preeclampsia y, en algunos casos, los casos de preeclampsia son auto reportados. Esto puede suponer que algunos de los casos clasificados como preeclampsia no lo sean en realidad. Un tema muy estudiado en la preeclampsia es la diferencia entre la preeclampsia temprana y la tardía. Algunos estudios sugieren que podría tratarse de dos entidades bien diferenciadas con diferentes etiologías, que deberían estudiarse por separado (53), mientras que otros autores afirman que se trataría de 2 formas de gravedad de la misma enfermedad (47).

Además, existen dificultades asociadas a la naturaleza de la impronta genómica. Ésta varía en función del tiempo y del espacio (29). Aunque algunos estudios hablan de que la impronta genómica es bastante estable durante todos los trimestres del embarazo (1), está sujeta a variaciones durante la gestación (12). Las variaciones en el espacio vienen dadas tanto por la especificidad de cada tejido (un gen puede hallarse improntado en la placenta y tener una expresión bialélica en otros tejidos) como por el lugar dentro de la propia placenta (se ha encontrado mayor expresión de PHLDA2 en la parte distal de la placenta en comparación con la parte central y el cordón umbilical) (51). Esto toma una especial importancia a la hora de recoger las muestras de tejido para los casos y los controles a estudiar.

Otro problema a la hora de emparejar los casos y los controles es el tamaño de la placenta. Por el curso natural de la enfermedad, las placentas y los fetos de embarazos con preeclampsia son más pequeños que los de embarazos sin patología. Para igualar el tamaño, muchos estudios buscan sus controles entre los recién nacidos prematuros y los de bajo peso para la edad gestacional, lo que podría suponer sesgos (18). De la misma manera, los embarazos con preeclampsia y especialmente con preeclampsia grave, son más cortos que una gestación sin patología. Por tanto, sus placentas podrían no ser comparables (47).

Además, la impronta genómica se encuentra bajo influencia del entorno. Se han comprobado diferencias en la impronta genómica de placentas de madres en función de su exposición a la falta o abundancia de nutrientes tanto en el periodo preconcepcional como durante el embarazo (30). También se sabe que el hábito tabáquico altera la impronta genómica en la placenta (18). En general, cualquier cambio en los hábitos de vida y/o entorno de la madre tiene capacidad para alterar la impronta en su placenta (51). Los estudios consultados son, en su mayoría, estudios de casos y controles, siendo una limitación de éstos la falta de información sobre el entorno y los hábitos de vida de las madres en el grupo control (47).

Así, son muchas las variables que hay que tener en consideración dada la alta variabilidad de la impronta genómica. La mayoría de los estudios consultados tienen en cuenta variables como la edad de la madre, la severidad de los síntomas, el hábito tabáquico, las enfermedades crónicas, etc. Pero son pocos los estudios analizados que tienen en cuenta el sexo del feto o la forma de parto. Éstas son variables especialmente importantes ya que se han encontrado diferencias en la metilación del ADN de la placenta en función del sexo del feto (18). Además, se ha comprobado que los niveles de expresión del gen improntado CDKN1C aumentan en las madres que han tenido un parto vaginal en comparación con las que han tenido cesárea (30).

Otro problema que surge al estudiar tejidos placentarios es la posible contaminación de las muestras con tejidos de la decidua materna, especialmente en los estudios en ratones, en los que las células de la decidua son difíciles de separar, lo que podría llevar a falsos positivos de expresión materna (3,34). Un ejemplo es el gen *Gatm*. Durante años se consideró al gen *Gatm* un gen improntado de expresión materna localizado en el cromosoma 2 (5), pero estudios posteriores determinaron que se trataba de un falso positivo propiciado por la contaminación de la decidua materna, por lo que hoy en día se acepta que el gen *Gatm* se encuentra improntado en la placenta murina, pero no en la humana (3).

Otro aspecto que la mayoría de los estudios pasan por alto cuando se investiga sobre preeclampsia, son los factores paternos. Existen artículos que se centran en estudiar cómo el genotipo fetal influye en la tensión arterial de la madre (38,46). Sin

embargo, todavía queda tener en cuenta variables asociadas al padre, ya que hay estudios prometedores respecto al rol de éste (31).

Finalmente, otra dificultad para el estudio de la preeclampsia es que al ser una enfermedad exclusiva del ser humano la creación de modelos animales es compleja. Además, los modelos en ratón creados hasta el momento desarrollan los síntomas tipo de la preeclampsia, pero no las mismas alteraciones en la placenta que las vistas en humanos (23).

5.1. ¿CAUSA O CONSECUENCIA? FUTUROS ESTUDIOS

Aunque se han encontrado asociaciones entre las alteraciones de la impronta genómica y la preeclampsia u otras patologías del embarazo, la naturaleza de la impronta y su gran variabilidad hacen que no sea posible distinguir si son una causa o una consecuencia de la enfermedad.

Las muestras de tejido placentario utilizadas en los estudios son recogidas una vez terminado el embarazo (2,15,25,36,37,43–45,47–49,51) y, por tanto, no permiten caracterizar en qué momento de la gestación se produjeron las alteraciones de impronta.

En este sentido, la pregunta que se hacen varios estudios analizados es si las alteraciones en la impronta de un gen son las que producen un desarrollo deficiente de la placenta, o el desarrollo deficiente de la placenta produce un estrés que hace que se altere la impronta genómica.

Para responder a esta pregunta es necesaria la creación de más modelos *in vitro* con alteraciones específicas de impronta, como realizan Zadora et al. con el gen DLX5 (15) o F. Jing et al. con el PHLDA2 (44). Sus resultados indican que los defectos del desarrollo del trofoblasto están causados por alteraciones de la impronta y no al revés, abriendo un campo de estudio muy interesante para el resto de las alteraciones de la impronta detectadas en casos de preeclampsia.

Hasta entonces, el descubrimiento de las alteraciones de la impronta estaría más enfocado a la creación de marcadores de peligro o de herramientas de screening.

Otro campo de estudio obligado para el futuro es la asociación de la impronta genómica con el comportamiento materno y el desarrollo de los bebés y niños tras el parto. Muchos estudios han asociado los trastornos en el embarazo (tanto los relacionados con estados hipertensivos, como el RCIU y la prematuridad) con alteraciones del desarrollo neuroadaptativo en niños (30,35). Así, los niños nacidos de un embarazo con preeclampsia tienen más riesgo de sufrir patologías del espectro autista, trastornos del lenguaje y TDAH (trastorno de déficit de atención e hiperactividad) y algunos autores creen que este riesgo estaría asociado con los genes improntados (30).

Los resultados de los estudios respecto a la importancia de los genes improntados y a los síndromes causados por sus alteraciones (10,12,16,30) y, en especial, respecto a la asociación del gen PEG3 con patologías del embarazo, alteraciones de la fisiología y conducta materna y el desarrollo en la primera infancia (14,16), hacen pensar que las alteraciones de la impronta genómica podrían ser el hilo conductor de la relación entre las patologías del embarazo y las patologías y las dificultades en el aprendizaje en la infancia. En tal caso, su estudio sería muy interesante para poder identificar los bebés con alto riesgo antes del desarrollo de las patologías.

Las patologías clínicas asociadas a alteraciones de la impronta genómica han servido para comprender la importancia de los genes improntados en el desarrollo de la placenta, la interacción materno-fetal y el embarazo. Sin embargo, son pocos los estudios que han analizado de forma experimental la relación de la impronta genómica con la preeclampsia. No obstante, los artículos publicados hasta el momento dejan claro que se trata de un campo con mucho potencial de estudio. De cara a futuros estudios, resultaría indispensable caracterizar y agrupar los más de 100 genes sujetos a impronta descubiertos en la placenta y solucionar las limitaciones descritas en esta revisión.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

- Los estudios analizados sugieren que las alteraciones de la impronta genómica parecen estar relacionadas con la preeclampsia. En concreto, se han encontrado diferencias en la expresión de los genes improntados CDKN1C, DLX5, PEG10, PHLDA2, H19, MEST, DLK1 e IGF2 en placentas con preeclampsia respecto a placentas control. Sin embargo, resulta imprescindible realizar más estudios experimentales y solucionar las limitaciones descritas en esta revisión.
- Se han descubierto más de 100 genes sujetos a impronta en la placenta, muchos de ellos relacionados con el desarrollo y crecimiento de la placenta y del feto. Además, parece que podrían tener un papel importante en el desarrollo del embarazo y el metabolismo materno.
- Las alteraciones de la impronta genómica producen cambios concretos en la placenta y en su desarrollo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Vaiman D. Genes, epigenetics and miRNA regulation in the placenta. *Placenta*. 2017;52:127-33.
- (2) Christians JK, Leavey K, Cox BJ. Associations between imprinted gene expression in the placenta, human fetal growth and preeclampsia. *Biol Lett*. 2017;13(11):20170643.
- (3) Monk D. Genomic imprinting in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2015;213(4):S152-62.
- (4) Dijk M van, Oudejans C. (Epi)genetics of pregnancy-associated diseases. *Front Genet* [Internet]. 2013 [consulta, 11 Feb 2020];4. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00180/abstract>
- (5) Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta – A review. *Placenta*. 2005;26:S10-20.
- (6) Frost JM, Moore GE. The Importance of Imprinting in the Human Placenta. Ferguson-Smith AC, editor. *PLoS Genet*. 2010;6(7):e1001015.
- (7) Keverne EB. Genomic imprinting, action, and interaction of maternal and fetal genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(22):6834-40.
- (8) Hanna CW, Peñaherrera MS, Saadeh H, Andrews S, McFadden DE, Kelsey G, et al. Pervasive polymorphic imprinted methylation in the human placenta. *Genome Res*. 2016;26(6):756-67.
- (9) Thamban T, Agarwaal V, Khosla S. Role of genomic imprinting in mammalian development. *J Biosci*. 2020;45(1):20.
- (10) Piedrahita JA. The role of imprinted genes in fetal growth abnormalities. *Birth Defects Res A: Clin Mol Teratol*. 2011;91(8):682-92.
- (11) Pilvar D, Reiman M, Pilvar A, Laan M. Parent-of-origin-specific allelic expression in the human placenta is limited to established imprinted loci and it is stably maintained across pregnancy. *Clin Epigenet*. 2019;11(1):94.

- (12) Fowden AL, Coan PM, Angiolini E, Burton GJ, Constancia M. Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011;106(1):281-8.
- (13) M. Reslan O, A. Khalil R. Molecular and Vascular Targets in the Pathogenesis and Management of the Hypertension Associated with Preeclampsia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2010;8(4):204-26.
- (14) John RM. Imprinted genes and the regulation of placental endocrine function: Pregnancy and beyond. *Placenta.* 2017;56:86-90.
- (15) Zadora J, Singh M, Herse F, Przybyl L, Haase N, Golic M, et al. Disturbed Placental Imprinting in Preeclampsia Leads to Altered Expression of DLX5, a Human-Specific Early Trophoblast Marker. *Circulation.* 2017;136(19):1824-39.
- (16) Cassidy FC, Charalambous M. Genomic imprinting, growth and maternal–fetal interactions. *J Exp Biol.* 2018;221(Suppl 1):jeb164517.
- (17) Hariharan N, Shoemaker A, Wagner S. Pathophysiology of hypertension in preeclampsia. *Microvasc Res.* 2017;109:34-7.
- (18) Chu T, Bunce K, Shaw P, Shridhar V, Althouse A, Hubel C, et al. Comprehensive Analysis of Preeclampsia-Associated DNA Methylation in the Placenta. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107318.
- (19) Mayrink J, Costa ML, Cecatti JG. Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. *Sci World J.* 2018;2018:1-9.
- (20) UpToDate [Internet] Waltham: UpToDate; 2020-. Eclampsia [consulta, 28 Mar 2020]; [20]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/eclampsia#H27>
- (21) Soellner L, Kopp KM, Mütze S, Meyer R, Begemann M, Rudnik S, et al. NLRP genes and their role in preeclampsia and multi-locus imprinting disorders. *J. Perinat. Med.* 2018;46(2):169-73.
- (22) Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia Pathophysiology, Challenges and Perspectives. *Circ Res.* 2019;124: 1094-112.
- (23) Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015;213(4):S115-22.

- (24) Napolés C.D. Actualización sobre las bases fisiopatológicas de la preeclampsia. *MEDSAN*. 2015; 18(8):1020.
- (25) Liang XY, Chen X, Jin YZ, Chen XO, Chen QZ. Expression and significance of the imprinted gene PEG10 in placenta of patients with preeclampsia. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):10607-14.
- (26) Pubmed [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 1966-[consulta, 30 Mar 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>
- (27) Geneimprint [Internet]. Durham: Duke University Press; 2020-[consulta, 2 Mar 2020]. Disponible en: <http://www.geneimprint.com>
- (28) Morrison IM, Ramsay JP, Spencer HG. A census of mammalian imprinting. *Trends Genet*. 2005; 21: 457-65
- (29) Barbaux S, Gascoin-Lachambre G, Buffat C, Monnier P, Mondon F, Tonanny M-B, et al. A genome-wide approach reveals novel imprinted genes expressed in the human placenta. *Epigenetics*. 2012;7(9):1079-90.
- (30) Nomura Y, John RM, Janssen AB, Davey C, Finik J, Buthmann J, et al. Neurodevelopmental consequences in offspring of mothers with preeclampsia during pregnancy: underlying biological mechanism via imprinting genes. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(6):1319-29.
- (31) Dekker G, Robillard PY, Roberts C. The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J. Reprod. Immunol*. 2011;89(2):126-32.
- (32) Allach El Khattabi L, Backer S, Pinard A, et al. A genome-wide search for new imprinted genes in the human placenta identifies DSCAM as the first imprinted gene on chromosome 21. *Eur J Hum Genet*. 2019;27(1):49-60.
- (33) Hamada H, Okae H, Toh H, et al. Allele-Specific Methylome and Transcriptome Analysis Reveals Widespread Imprinting in the Human Placenta. *Am. J Hum Genet*. 2016;99(5):1045-58.
- (34) Vincenz C, Lovett JL, Wu W, Shedden K, Strassmann BI. Loss of Imprinting in Human Placentas Is Widespread, Coordinated, and Predicts Birth Phenotypes. *Mol. Biol. Evol*. 2020;37(2):429-41.

- (35) Lambertini L, Marsit CJ, Sharma P, Maccani M, Ma Y, Hu J, et al. Imprinted gene expression in fetal growth and development. *Placenta*. 2012;33(6):480-6.
- (36) Bourque DK, Avila L, Peñaherrera M, von Dadelszen P, Robinson WP. Decreased Placental Methylation at the H19/IGF2 Imprinting Control Region is Associated with Normotensive Intrauterine Growth Restriction but not Preeclampsia. *Placenta*. 2010;31(3):197-202.
- (37) Wang X, Wan L, Weng X, Xie J, Zhang A, Liu Y, et al. Alteration in methylation level at differential methylated regions of MEST and DLK1 in fetus of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2018;37(1):1-8.
- (38) Petry CJ, Ong KK, Dunger DB. Does the fetal genotype affect maternal physiology during pregnancy? *Trends Mol. Med*. 2007;13(10):414-21.
- (39) Tycko B. Imprinted genes in placental growth and obstetric disorders. *Cytogenet Genome Res*. 2006;113(1-4):271-8.
- (40) Naruse K, Tsunemi T, Kawahara N, Kobayashi H. Preliminary evidence of a paternal-maternal genetic conflict on the placenta: Link between imprinting disorder and multi-generational hypertensive disorders. *Placenta*. 2019;84:69-73.
- (41) Kobayashi H. The Impact of Maternal-Fetal Genetic Conflict Situations on the Pathogenesis of Preeclampsia. *Biochem Genet*. 2015;53(9-10):223-34
- (42) Kobayashi H. Characterization of the down-regulated genes identified in preeclampsia placenta. *Hypertens Pregnancy*. 2016;35(1):15-21.
- (43) Ding L, Blitz MJ, Wing DA, Epstein AJ, Gjessing HK, Wilson ML. PHLDA2 gene polymorphisms and risk of HELLP syndrome and severe preeclampsia. *PREGNANCY HYPERTENS*. 2020;19:190-4.
- (44) Jin F, Qiao C, Luan N, Shang T. The expression of the imprinted gene pleckstrin homology-like domain family A member 2 in placental tissues of preeclampsia and its effects on the proliferation, migration and invasion of trophoblast cells JEG-3. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(11):1142-51.

- (45) He J, Zhang A, Fang M, Fang R, Ge J, Jiang Y, et al. Methylation levels at IGF2 and GNAS DMRs in infants born to preeclamptic pregnancies. *BMC Genomics*. 2013;14(1):472.
- (46) Petry CJ, Beardsall K, Dunger DB. The potential impact of the fetal genotype on maternal blood pressure during pregnancy: *J Hypertens*. 2014;32(8):1553-61.
- (47) Gao W, Li D, Xiao Z, Liao Q, Yang H, Li Y, et al. Detection of global DNA methylation and paternally imprinted H19 gene methylation in preeclamptic placentas. *Hypertens Res*. 2011;34(5):655-61.
- (48) Yu L, Chen M, Zhao D, Yi P, Lu L, Han J, et al. The H19 Gene Imprinting in Normal Pregnancy and Pre-eclampsia. *Placenta*. 2009;30(5):443-7.
- (49) van Dijk M, Drewlo S, Oudejans CBM. Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics*. 2010;5(8):736-42.
- (50) Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e78644.
- (51) Monteagudo-Sánchez A, Sánchez-Delgado M, Mora JRH, Santamaría NT, Gratacós E, Esteller M, et al. Differences in expression rather than methylation at placenta-specific imprinted loci is associated with intrauterine growth restriction. *Clin Epigenet*. 2019;11(1):35.
- (52) Malnou EC, Umlauf D, Mouysset M, Cavaillé J. Imprinted MicroRNA Gene Clusters in the Evolution, Development, and Functions of Mammalian Placenta. *Front Genet*. 2019;9:706.
- (53) Redman CW. Pre-eclampsia: Definitions, paternal contributions and a four stage model. *PREGNANCY HYPERTENS*. 2011;1(1):2-5.