



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL ÁNGELES MÉXICO**

**Dimorfismo sexual en el metabolismo de la vitamina D y la  
respuesta inflamatoria placentaria en embarazos con obesidad y  
preeclampsia.**

**T E S I S**

Para obtener el título de:

**Especialista en Ginecología y Obstetricia**

**P R E S E N T A**

**Nicolás Salva Pastor**

**CO-DIRECTORAS**

**Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz**

**Dra. Lorenza Díaz Nieto**

Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

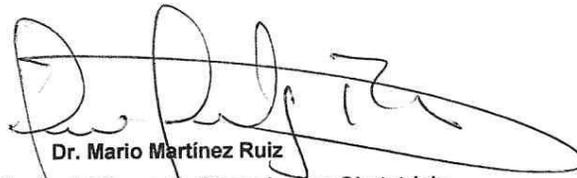
**Autorizaciones**



**Dra. María del Pilar Velázquez Sánchez**  
Jefe de la División de Educación Médica  
Hospital Ángeles México



**Dr. Francisco Javier Borrajo Carbajal**  
Profesor Titular del Curso de Ginecología y Obstetricia  
Hospital Ángeles México



**Dr. Mario Martínez Ruiz**  
Profesor Adjunto del Curso de Ginecología y Obstetricia  
Hospital Ángeles México



**Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz**  
Directora de tesis  
ICM C. SNI-1  
Departamento de Inmunobioquímica  
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de  
los Reyes



**Dra. Lorenza Díaz Nieto**  
Directora de Tesis  
ICM E. SNI-3  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán

**Este trabajo de investigación fue financiado tanto por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (BRE-4343-22-25-1) como por el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes y forma parte del proyecto INPer: “Obesidad y perfil metabólico materno como predictor de la composición corporal fetal, obesidad y neurodesarrollo en la infancia” (3300-11402-01-575-17).**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis tutoras, la Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz y la Dra. Lorenza Díaz Nieto, por su paciencia y apoyo constante. Con su amplia experiencia y conocimiento me han dirigido para concluir esta etapa profesional. Su disposición para resolver mis dudas, su capacidad para brindarme retroalimentación constructiva y su humildad al permitirme trabajar con ellas, han sido una fuente inagotable de inspiración y aprendizaje para mí. A través de su compromiso con mi progreso, sus valiosas sugerencias, su enfoque meticuloso y su disponibilidad para discutir conceptos complejos, han enriquecido enormemente mi admiración y agradecimiento hacia ellas.

Agradecemos a la Dra. Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez, Directora de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología y responsable del proyecto 3300-11402-01-575-17 e INPer 2017-1-575, por colaborar con el banco de muestras de cotiledones placentarios y sangre de cordón umbilical. Agradecemos al Dr. Fernando Larrea Gallo, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por permitir el uso de las instalaciones para el análisis experimental.

Agradecemos a la Dra. Janice García Quiroz, investigadora del Departamento de Biología de la Reproducción, y al Biol. Rafael Vargas Castro por su apoyo experimental en la obtención de cDNAs y corridas de qPCR.

Agradecemos a la Biol. Sandra Berenice Parra Hernández, investigadora del Laboratorio de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología, por su apoyo para la entrega y organización de las muestras biológicas, así como para la obtención de RNA de los cotiledones placentarios.

Agradecemos al Dr. Juan Mario Solís Paredes, investigador del Departamento de Genética y Genómica Humana del Instituto Nacional de Perinatología, por su apoyo para la búsqueda e identificación de pacientes candidatas en el banco de muestras.

Agradezco de manera especial a Toño, por tu aliento constante que me ha dado fortaleza en los momentos de desafío y agotamiento. Agradezco tu amor, apoyo emocional y motivación incondicional para alcanzar mis metas profesionales; y por permitirme ser parte de tu vida.

Agradezco a mi mamá, por ser una fuente de apoyo y motivación. Su amor y comprensión me han dado fuerza y determinación a lo largo de la residencia. Tu sencillez es mi inspiración.

Agradezco sinceramente a todas las personas que han contribuido de manera significativa a lo largo de mi vida académica, a mis amigos, maestros y mentores, su influencia positiva ha dejado una huella que perdurará en mi vida y mi trabajo.

Quiero agradecer a Dios por su guía, y bendiciones, por ser mi refugio en momentos de desafío. Su presencia y dirección han sido fundamentales en cada paso que he dado.

**Nico.**

# ÍNDICE

<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	9
1.1 Vitamina D .....	9
1.2 Estado nutricional de la vitamina D en el embarazo .....	12
1.3 Asociación de la VD con la inflamación e inmunidad en el embarazo .....	12
1.4 Obesidad y vitamina D .....	14
1.5 Preeclampsia y VD3 .....	16
1.6 Respuesta inmunológica y diferencias ligadas al sexo .....	20
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	22
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	23
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	23
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	24
7.5 Técnicas y Procedimientos .....	28
7.7 Análisis estadístico .....	30
<b>8. RESULTADOS</b> .....	31
8.1 Características maternas y del recién nacido. ....	31
8.2 Metabolitos de VD en suero materno y de cordón umbilical. ....	33
8.3 Implicaciones inmunitarias dependientes del sexo del recién nacido. ....	37
8.3.1 Citocinas inflamatorias .....	37
8.3.2 CYP24A1 .....	39
8.3.3 Péptidos antimicrobianos .....	39
8.4 Asociación entre metabolitos de Vitamina D y el perfil de expresión de citocinas inflamatorias y péptidos antimicrobianos. ....	40
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50

## RESUMEN

**Introducción:** El calcitriol, metabolito activo de la vitamina D (VD), es una hormona inmunomoduladora cuya síntesis placentaria es sexualmente dimórfica. El calcitriol regula importantes factores moduladores de la presión arterial, además de que inhibe la expresión de citocinas inflamatorias que se han reportado elevadas tanto en la preeclampsia (PE) como en la obesidad (OB). Estas patologías aumentan el riesgo de morbimortalidad perinatal, y se han asociado con deficiencia de VD. Sin embargo, casi nada se sabe referente los niveles de calcitriol y su precursor calcidiol en el suero materno y de cordón umbilical de neonatos femeninos y masculinos en estas enfermedades en la población mexicana, y se desconoce su relación con la expresión de marcadores de inflamación en la placenta. **Objetivo:** Estudiar las posibles asociaciones entre la concentración de calcitriol en suero de cordón y calcidiol en suero materno, el sexo del recién nacido y la expresión de factores relacionados con inflamación, presión arterial materna e inmunidad en la unidad fetoplacentaria de mujeres mexicanas con OB o PE. **Material y métodos:** Este proyecto forma parte de una cohorte prospectiva del Instituto Nacional de Perinatología. Se registraron las mediciones clínicas y antropométricas del binomio madre-hijo, y se cuantificó el calcidiol en el suero materno durante el primer, segundo y tercer trimestre de la gestación. Se recolectó la placenta y sangre de cordón umbilical de los 3 grupos de interés [normoevolutivo (NE), OB y PE] y se les agrupó por sexo del recién nacido. Se evaluaron los cambios dependientes del sexo en la expresión placentaria de citocinas pro- y anti-inflamatorias, así como de péptidos antimicrobianos mediante qPCR. El calcitriol se cuantificó en el suero del cordón umbilical mediante ensayo quimioluminiscente. El análisis comparativo entre los grupos de estudio considerando el sexo del recién nacido se realizó mediante ANOVA de dos vías. Se analizó la correlación entre los parámetros de estudio calculando el coeficiente de correlación de Spearman. **Resultados:** Se incluyeron 142 pacientes. En comparación con el grupo control, los niveles de calcitriol en el suero de cordón umbilical de neonatos masculinos fueron significativamente más bajos en los grupos PE y OB. Los niveles de calcidiol en el suero de las madres correspondientes a los trimestres I, II y III no fueron diferentes entre los grupos de

estudio; sin embargo, se correlacionaron negativamente con la presión arterial sistólica materna en el grupo NE, relación que se mantuvo al realizar el análisis de subgrupos solamente en el subgrupo NE masculino. Además, el calcidiol se asoció significativamente de manera inversa con el índice de masa pregestacional en el grupo PE, y en los subgrupos PE-femenino y NE-masculino. En lo referente a los marcadores de inflamación y defensa, se observó que la expresión génica placentaria de *CYP24A1*, *IL-6*, *TNF-A*, *TGF-B1*, *IL-10* e *IL-8* fue significativamente elevada en el tejido placentario masculino del grupo PE en comparación al sexo femenino. Por otro lado, la expresión génica de catelicidina fue significativamente mayor en las placentas de los subgrupos femeninos NE y OB, en comparación con los masculinos; mientras que en PE hubo mayor expresión en las placentas masculinas. En el análisis de Spearman, en algunos grupos y subgrupos se observó correlación negativa ( $P < 0.05$ ) entre los niveles de calcidiol materno en distintos trimestres y la expresión génica placentaria de citocinas, incluyendo *IL-8*, *IL-10* e *IL-6*. Contrario a esto, hubo correlación positiva con la expresión del péptido antimicrobiano *DEFB1* en NE-femenino ( $P = 0.05$ ). En cuanto a las correlaciones entre el calcitriol en el suero del cordón umbilical y la expresión de marcadores inmunológicos en placenta, se observó asociación significativa negativa con *TLR-9* y *TGF-B1* en OB-total y femenino, y positiva con *DEFB1*, *IL-8* e *IL-6* en algunos subgrupos. **Conclusión:** Entre los hallazgos más relevantes se encontró que mayores concentraciones de calcidiol en el suero materno se asociaron con menor presión arterial de la madre, pero solo en el grupo NE. Además, las correlaciones entre los metabolitos de la VD y la expresión de diversos marcadores de inflamación y defensa sugieren que la VD está relacionada con efectos anti-inflamatorios y de fortalecimiento de la respuesta inmunológica de manera sexualmente dimórfica durante la gestación. Los resultados también corroboran estudios previos que indican que la PE y la OB se asocian con metabolismo alterado de la VD, aunque en nuestro estudio esta relación fue evidente solo en el grupo con neonatos masculinos. Es posible que algunas de las observaciones de este trabajo estén ligadas al índice de masa corporal pregestacional, ya que tanto el grupo OB como el PE fueron significativamente diferentes al NE en dicho parámetro, y se conoce

que la adiposidad correlaciona negativamente con los niveles de VD3, lo que merece la realización de estudios posteriores.

**Palabras clave:** vitamina D, calcitriol, calcidiol, embarazo, preeclampsia, obesidad, presión arterial, citocinas pro-inflamatorias.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Vitamina D**

La vitamina D (VD) es un nutriente ampliamente estudiado y discutido actualmente, cuya deficiencia representa un problema de salud pública. Tal situación es agravada por la preocupación sobre la nocividad de la luz solar, el uso de protectores solares y el estilo de vida sedentario con tendencia a pasar menos tiempo en el exterior. El papel de la VD como hormona ha sido confirmado en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, relacionados con varios órganos y sistemas [1]. Además de la evidencia sólida sobre los efectos óseos y calciotrópicos de la VD, también se han estudiado sus efectos extra-esqueléticos en proliferación celular, envejecimiento e inmunidad. La importancia de la deficiencia de VD radica en su alta frecuencia, la facilidad para identificarla y los medios simples, efectivos y económicos disponibles para corregirla, como la suplementación [2].

Múltiples científicos contribuyeron a la larga historia del descubrimiento de la vitamina D, destacándose entre ellos H. Steenbock, A. F. Hess, O. Rosenheim, y el premio Nobel Adolf Otto Reinhold Windaus. Desde la identificación de la estructura química de la VD en 1931 por parte del Dr. Windaus, se han producido avances extraordinarios en la investigación de la VD.

Inicialmente, la investigación se centró en sus efectos óseos, reconociendo el papel fundamental de la VD y sus metabolitos en la homeostasis del calcio, fosfato y el metabolismo óseo. Posteriormente se estudió, y se sigue estudiando, la participación de la VD en los mecanismos de regulación del sistema inmunológico. Por lo tanto, el papel de la VD en la salud ósea es bien conocido, pero representa sólo un aspecto del perfil funcional pleiotrópico de la molécula [3].

El término de VD se ha utilizado un tanto de forma genérica para designar a un conjunto de metabolitos derivados del 7-dehidrocolesterol (animales) o del ergosterol (plantas, hongos, levaduras). Dichos metabolitos son de naturaleza lipídica y se les denomina secoesteroides por presentar roto el anillo B de la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno. Entre los más conocidos

encontramos: el colecalciferol, ergocalciferol, 25-hidroxitamina D3 (calcidiol) y 1,25-dihidroxitamina D3 (calcitriol). Si bien el nombre genérico se refiere a una vitamina, en realidad calcidiol y calcitriol son de hecho una prohormona y una hormona, respectivamente. El calcidiol es el metabolito más abundante de la VD, y se le usa como marcador del estado nutricional de esta vitamina, pero no es el metabolito más activo [4].

### **Biogénesis de la vitamina D**

La síntesis de la VD inicia en la piel, donde la provitamina D3 (7-dehidrocolesterol) se convierte en previtamina D3 en respuesta a la exposición a la luz solar (radiación ultravioleta B, rango de 280 a 315 nm). Posteriormente por una reacción térmica espontánea, la vitamina D3 (colecalciferol), se obtiene de la isomerización de la previtamina D3 en las capas basales epidérmicas. O bien, se puede obtener este precursor por la absorción intestinal de alimentos y suplementos naturales y fortificados con VD2 (ergocalciferol) o VD3. En el torrente sanguíneo, VD2 y VD3 se unen a la proteína de unión a la VD (DBP), y son transportadas hacia el hígado. VD2 y VD3 son hidroxilados por la enzima hepática 25-hidroxilasa para formar el calcidiol, o 25-hidroxitamina D. El metabolito hormonalmente activo de la VD es el calcitriol, o 1,25-dihidroxitamina-D3, que se sintetiza de manera clásica en el riñón por la enzima 25-hidroxitamina-D3-1-alfa-hidroxilasa (CYP27B1). La síntesis de calcitriol a partir de calcidiol es estimulada por la hormona paratiroidea (PTH) y suprimida por el calcio, el fosfato y el propio calcitriol [5]. Dada la alta bioactividad de esta hormona, sus concentraciones deben estar finamente reguladas, por lo que el calcitriol es rápidamente degradado por la 1,25-dihidroxitamina-D3-24-hidroxilasa (CYP24A1) [4]. Las enzimas CYP27B1 y CYP24A1 pertenecen a la familia de enzimas citocromo P450. De interés para este proyecto, la placenta también es sitio de síntesis y metabolismo de la VD, ya que expresa tanto a CYP27B1 como a CYP24A1, aunque sus mecanismos reguladores difieren de los observados en el riñón [6].

CYP24A1 cataliza la hidroxilación del carbono 24 del calcitriol, lo que resulta en la formación de 1,24,25-trihidroxitamina D (1,24,25-(OH)<sub>3</sub>D). Esta reacción convierte

al calcitriol en un metabolito menos activo y soluble en agua. La hidroxilación en la posición 24 también se lleva a cabo en otros metabolitos de la VD, como el calcidiol, convirtiéndolos en sus formas 24,25-dihidroxiadas. La actividad del CYP24A1 es regulada por múltiples factores. La principal regulación ocurre a nivel de la transcripción del gen CYP24A1, la cual puede ser regulada por diferentes estímulos, incluyendo los niveles de calcitriol y de calcidiol. El calcitriol induce la expresión del CYP24A1, lo que a su vez incrementa la degradación de calcitriol y otros metabolitos de la VD. Esto crea un sistema de retroalimentación negativa para regular los niveles de calcitriol en el organismo. Además, otros factores como la PTH y los niveles de calcio y fósforo también pueden regular la expresión y actividad del CYP24A1. La PTH estimula la producción de calcitriol y, al mismo tiempo, induce la expresión del CYP24A1 para aumentar su degradación. Por otro lado, altos niveles de calcio y fósforo en el organismo también pueden estimular la expresión del CYP24A1 y la degradación del calcitriol [7] (Figura 1).

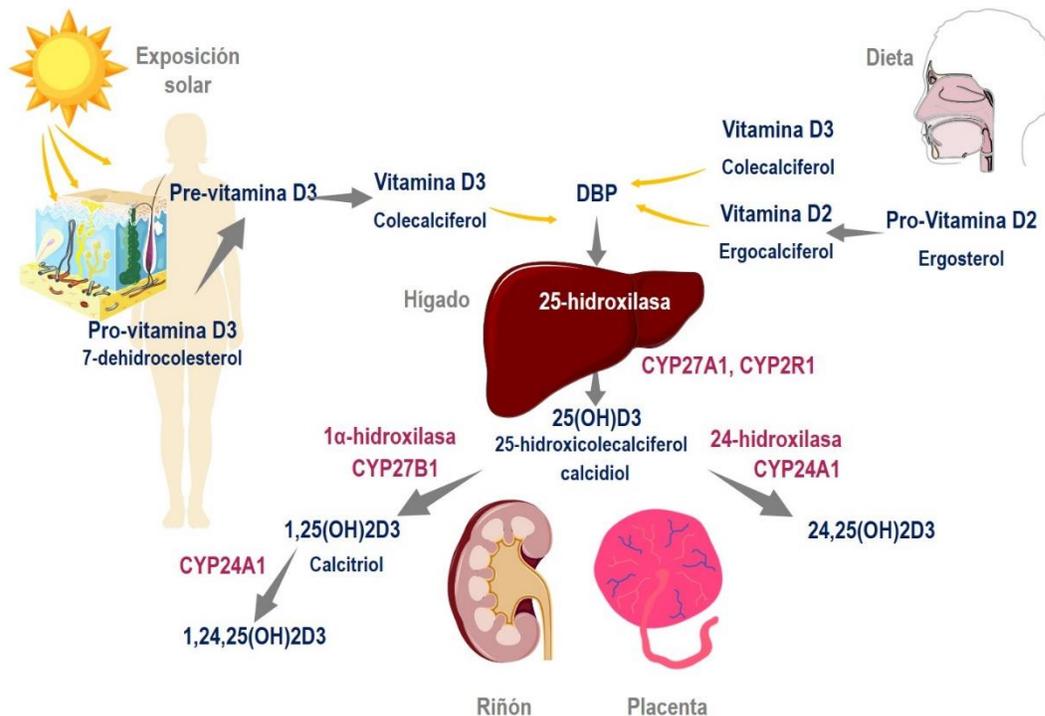


Figura 1. Biogénesis de la vitamina D. La síntesis de vitamina D (VD) ocurre en la piel, donde la pro-vitamina D3 se convierte en pre-vitamina D3 en respuesta a la radiación ultravioleta B. La VD, obtenida a través de la isomerización de la pre-vitamina D3 en las capas basales de la epidermis, o mediante la absorción intestinal de D2 y D3 proveniente de alimentos fortificados y suplementos. Ambas isoformas, se unen a la proteína de unión a la vitamina D (DBP) en el torrente sanguíneo y se transportan hacia el hígado, donde son hidroxilados por la 25-hidroxilasa (CYP27A1 ó, CYP2R1) obteniendo así,

*calcidiol. Luego, en los riñones, se somete a una segunda hidroxilación mediante la CYP27B1, lo que da como resultado, calcitriol y es íntimamente regulado por la degradación a través de CYP24A1. La placenta también es sitio de síntesis y degradación de la VD, ya que expresa tanto a CYP27B1 como a CYP24A1.*

## **1.2 Estado nutricional de la vitamina D en el embarazo**

El estado nutricional de la VD se determina con base en las concentraciones séricas de calcidiol. De acuerdo con la Sociedad de Endocrinología, la clasificación es la siguiente: Suficiencia (> 30 ng/mL), insuficiencia (20 – 29 ng/mL), deficiencia (11 – 19 ng/mL) y deficiencia severa (< 10 ng/mL) [8].

Desafortunadamente, varios estudios han mostrado alta prevalencia de deficiencia de VD en la población en general y en las mujeres embarazadas, incluyendo a las mexicanas, en donde se ha reportado 51.4 % de insuficiencia y 37.3% deficiencia [9–12].

La hipovitaminosis D durante la gestación se ha asociado con mayor riesgo de defectos cardíacos en la prole, aborto, diabetes gestacional e infecciones perinatales, especialmente la vaginosis bacteriana [13–15]. En este sentido, la suplementación con colecalciferol puede disminuir la incidencia de dichas complicaciones [4]. La actividad de CYP27B1 para sintetizar calcitriol depende del estado de suficiencia de VD, lo que evidencia la importancia de mantener niveles adecuados de esta vitamina.

## **1.3 Asociación de la VD con la inflamación e inmunidad en el embarazo**

Tal como se describió previamente, la placenta humana expresa a CYP27B1 y CYP24A1, por lo que es sitio de metabolismo de VD, pero además, es sitio de actividad biológica de esta hormona ya que expresa al receptor de la VD (VDR) [16–18]. En consecuencia, la placenta es tanto órgano fuente como diana del calcitriol. El calcitriol placentario ejerce efectos autocrinos y paracrinos tales como la diferenciación celular, regulación de la hormonogénesis y de la respuesta inmunológica en la unidad fetoplacentaria [19–24]. Los efectos inmunomoduladores del calcitriol se pueden clasificar en dos categorías: los que fortalecen la respuesta

inmunológica innata (a través de la producción de péptidos antimicrobianos) y los que inhiben la respuesta inmunológica adquirida (inhibición de citocinas Th1 proinflamatorias). Al respecto, se ha descrito que el calcitriol reduce significativamente la expresión placentaria de interferón gamma (*IFN-G*), factor de necrosis tumoral alfa (*TNF-A*) e interleucina (IL)-6 (*IL-6*), mientras que estimula la de *IL-1B* y de los péptidos antimicrobianos beta defensinas (HBD-2, HBD-3) y catelicidina [19,20,25]. Estos últimos son potentes antibióticos naturales que participan en la defensa en contra de enfermedades producidas por bacterias, hongos y virus. El mecanismo de inducción de péptidos antimicrobianos es mediante estímulo transcripcional, ya que el VDR unido al calcitriol induce directamente la transcripción de genes que codifican a los péptidos antimicrobianos (AMPs). Por ejemplo, la secuencia promotora proximal de los genes que codifican el péptido antimicrobiano catelicidina humana (*CAMP*) y la HBD-2 humana (*DEFB4*) contiene elementos de respuesta a la VD [26,27].

Además, la señalización del calcitriol regula múltiples aspectos de la inmunidad innata. Esto incluye la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés). Los PRRs son "primeros respondedores" que reconocen motivos moleculares asociados con patógenos, como componentes de la pared celular, membrana celular y pared bacteriana, así como varias formas de ácidos nucleicos asociados con genomas virales [28].

Recientemente se describió la habilidad de la catelicidina de inhibir la diferenciación de los linfocitos T al fenotipo Th1 y favorecer el fenotipo Th17 en procesos inflamatorios, lo cual fue mediado por la presencia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-B1) e IL-1B, resultando en un efecto antiinflamatorio caracterizado por la inhibición de IL-2 e IFN-G [28]. Dado que la expresión de catelicidina en la placenta es transcripcionalmente inducida por calcitriol, lo arriba descrito apoya la actividad protectora de la VD para el mantenimiento de un embarazo saludable, al evitar la inflamación exacerbada a la vez que defiende de infecciones microbianas. Cabe hacer notar que el VDR se expresa en prácticamente

todas las células inmunológicas, donde también se expresa *CYP27B1*, por lo que el sistema inmune también es blanco y fuente de calcitriol [29].

En un evento inflamatorio, el organismo responde incrementando la producción de calcitriol mediante el aumento en la expresión de *CYP27B1*, lo que fortalece la inmunidad innata [30]. Esto se explica porque citocinas inflamatorias como el TNF-A, IFN-G y algunas interleucinas, así como el factor nuclear de transcripción kappa B (NFkB), asociado a inflamación, estimulan la expresión de dicho citocromo [31].

Por otro lado, se han reportado evidencias del dimorfismo sexual en el metabolismo placentario de la VD. Por ejemplo, se sabe que los estrógenos inhiben el catabolismo del calcitriol mientras que la testosterona y su metabolito no aromatizable 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona disminuyen su síntesis placentaria [32–34]. También se conoce que, en condiciones infecciosas, como las infecciones del tracto urinario, los embarazos que portan un bebé femenino presentan una mejor defensa inmunológica placentaria en comparación con la respuesta de embarazos con bebé masculino. [35] Particularmente, la respuesta de defensa placentaria femenina se caracterizó por mayor producción del segundo mensajero AMPc, TNF-A, IL-1B, IL-10 y el péptidos antimicrobiano S100A9 [35].

Sin embargo, no se ha explorado la relación del sexo fetal sobre la respuesta inmune placentaria y las concentraciones séricas de calcitriol y calcidiol bajo un ambiente inflamatorio no infeccioso, como la preeclampsia (PE) y la obesidad (OB) en la población mexicana. A continuación, se describirá la relación de la OB y la PE con la VD.

#### **1.4 Obesidad y vitamina D**

La OB es la condición médica más frecuente en mujeres en edad reproductiva. Durante el embarazo, la OB representa un peligro para la salud materno-infantil por las complicaciones obstétricas y perinatales a corto y largo plazo que pueden presentarse.

La OB es hoy reconocida como un estado crónico de inflamación, ya que tanto las personas con sobrepeso como las obesas presentan niveles incrementados de

citocinas inflamatorias como IL-6, TNF-A, proteína C-reactiva, IL-8, entre otras [36]; así como de la expresión de leptina (codificada por el gen *LEP*). Esta hormona promueve la reducción de la ingesta energética por medio de la señal de saciedad en el cerebro, además de jugar un importante papel en el crecimiento fetal, la respuesta proinflamatoria, angiogénesis y lipólisis [37]. La leptina incrementa la secreción de citocinas inflamatorias, quienes a su vez aumentan la expresión de *LEP* en el tejido adiposo, en un circuito autoregulatorio. La hiperleptinemia y su resistencia son características de las personas con OB, constituyendo un factor de riesgo para la hipertensión asociada a OB [37,38].

La herramienta útil para delimitar la proporción del peso respecto a la altura de un individuo es el índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Altura (m)}^2}$$

En mujeres adultas, el IMC pregestacional (IMCp) se categoriza como bajo de peso (< 18.5 kg/m<sup>2</sup>), peso normal (18.5-24.99 kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso (25-29.99 kg/m<sup>2</sup>) u OB (≥ 30 kg/m<sup>2</sup>) [39]. En Estados Unidos de Norteamérica, 31.9 % de las mujeres en edad reproductiva son obesas y 55.8 % presenta sobrepeso u OB [40], mientras que en México, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 informaron que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres adultas es de 75% [41]. Por otro lado, del 38 al 45 % de las mujeres mexicanas presentan una ganancia excesiva de peso durante el embarazo [42]. Esto es preocupante, ya que la OB y la inflamación crónica que conlleva esta condición se asocian significativamente con desenlaces adversos del embarazo [43]. En particular, la OB materna aumenta el riesgo de complicaciones fetales de manera dependiente del sexo, incluyendo programación diferencial de la progenie para patologías en la vida adulta, lo cual destaca la participación de la placenta en estos procesos [43,44]; mientras que en la madre se asocia con desordenes metabólicos incluyendo diabetes gestacional, resistencia a la insulina, inflamación e hipertensión [38,45]. Por otra parte, un estudio del transcriptoma global diseñado para entender cómo

afecta la OB materna a la placenta humana, determinó que las placentas de las mujeres obesas mostraban una firma molecular asociada a lipotoxicidad y a marcadores de inflamación [46]. El tejido adiposo es endocrinológicamente activo y secreta no solo citocinas y adipocinas, sino también moduladores del sistema renina-angiotensina (RAS) como la angiotensina II (ANG-II), representando un vínculo entre la OB y sus consecuencias metabólicas [47]. ANG-II es un marcador importante relacionado con la inflamación e hipertensión, actuando como vasoconstrictor e incrementando la actividad de enzimas lipogénicas y factores adipogénicos. ANG-II es inactivado por la enzima convertidora de angiotensina 2, al catalizar su conversión a ANG-(1-7), quien antagoniza a ANG-II funcionando como un factor anti-inflamatorio y anti-hipertensivo [48,49].

Pereira y colaboradores, a través de sus resultados de una revisión sistemática con metaanálisis, reportaron que la deficiencia de VD era un 35 % más alta en las personas con OB en comparación con las que tenían un peso normal, y un 24 % más alta en comparación con las personas con sobrepeso. [50]. Varios estudios han demostrado deficiencia de VD y alteraciones en el sistema endócrino de esta vitamina en personas obesas [51]. Diversas explicaciones se han sugerido para explicar este fenómeno, de las que podríamos mencionar: 1) los metabolitos de la VD, debido a su naturaleza lipídica, son secuestrados en el tejido adiposo, lo que reduce su biodisponibilidad en el torrente sanguíneo y en tejidos periféricos; 2) debido al sedentarismo, los sujetos con OB se exponen menos a la luz solar; 3) existe una regulación negativa de la síntesis de calcidiol y acelerado catabolismo, por factores propios de la OB [52]; y finalmente, la explicación más aceptada es: 4) las concentraciones de calcidiol pueden diluirse volumétricamente, ya que cuando se normalizan los valores del estado nutricional de la VD por peso, ya no existe diferencia con los sujetos no obesos [53].

### **1.5 Preeclampsia y VD3**

La PE, la forma grave de los trastornos hipertensivos del embarazo, es una condición inflamatoria que guarda su etiopatogenia con el desarrollo vascular anormal de la placenta y con factores de riesgo maternos preexistentes de

enfermedad cardiovascular, como hipertensión, enfermedad renal, sobrepeso o diabetes [54]. Esta patología es el principal problema de salud pública que incide en las tasas de morbilidad y mortalidad perinatal a nivel mundial. La mejora de la salud materna es uno de los 8 Objetivos de Desarrollo del Milenio de la Organización de las Naciones Unidas, en la lucha para erradicar la pobreza y la desigualdad [55]. Por lo que, incidir en el seguimiento y comprensión de la PE podría ayudar a mejorar la salud materna y perinatal.

En la actualidad, la incidencia de los trastornos hipertensivos en el embarazo es considerablemente alta, entre otros factores, debido al incremento global de la edad materna, la OB, las técnicas de reproducción asistida y las comorbilidades médicas que predisponen a la PE, como la diabetes, la hipertensión y la enfermedad renal. La PE es más común en las mujeres de raza negra, gestación múltiple, y primigestas [56].

La PE se clasifica según la edad gestacional en el momento de la presentación clínica. La Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP) clasifica la PE en PE prematura (parto <37 semanas de gestación), término (parto  $\geq$ 37 semanas de gestación) y PE posparto. También se utilizan las clasificaciones de PE de inicio temprano (<34 semanas de gestación) y PE de inicio tardío ( $\geq$ 34 semanas de gestación) [57].

Las causas de la PE no son del todo conocidas, pero parecen relacionarse con una placentación inadecuada, insuficiente invasión del trofoblasto extraveloso, deficiente remodelación de las arteriolas espirales, reducido flujo sanguíneo, hipoxia e isquemia placentaria, así como exacerbación de la respuesta inflamatoria sistémica [56,58]. Todo lo anterior está relacionado de una u otra forma con el desbalance inmunológico e inflamación crónica que ocurren en la PE, caracterizada por el exceso en la producción de citocinas inflamatorias por parte de la placenta [59]. El conocimiento sobre la fisiopatología de la PE no se ha entendido completamente; muchas de estas conclusiones se basaron en estudios *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo* en modelos animales [60].

La proliferación, migración e invasión del trofoblasto son procesos críticos para la implantación placentaria y el desarrollo embrionario temprano. Diferentes vías de señalización activadas por citocinas y factores de crecimiento regulan este proceso [61]. Las células madre trofoblásticas se diferencian en dos tipos celulares: el trofoblasto vellosos y las células trofoblásticas extravelosas. Dentro de este último grupo, los trofoblastos extravelosos endovasculares son responsables de la colonización de las arterias espirales y la invasión endotelial materna, de modo que estas células reemplazan al endotelio materno. Este proceso crea vasos de mayor capacitancia y menor resistencia, lo que proporciona el flujo sanguíneo suficiente al espacio intervilloso [62].

Por lo tanto, un fenómeno clave en la fisiopatología de la PE, en particular la de inicio temprano, es la deficiente migración trofoblástica que genera malperfusión placentaria, reducción del suministro de nutrientes al feto, hipoxia y alta presión vascular [55,61,63].

En la literatura clínica y biomédica experimental hay muchas evidencias acerca de la relación entre la VD y la PE [64]. En particular, se ha descrito menor concentración de calcitriol tanto en el compartimento materno como en el cordón umbilical en embarazos con PE [65,66]; mientras que, a nivel de la placenta PE, se ha observado menor expresión y actividad de CYP27B1 en comparación con placentas normales [67]. Recientemente, en un estudio de la firma molecular de las placentas PE, se demostró que *CAMP* (que codifica para la catelicidina) es uno de los 10 genes con expresión más reprimida en placentas PE en comparación con placentas normales, mientras que *LEP* (codificante de la leptina) es uno de los 10 más altamente expresados [68]. Ambos son precisamente regulados a la alta y a la baja, respectivamente, por el calcitriol. También hay un cuerpo robusto de artículos que señalan una asociación significativa entre la deficiencia de VD y el riesgo de desarrollar PE [69–73]. En contraparte, la suplementación con colecalciferol es un efectivo coadyuvante para prevenir el desarrollo de PE y mejorar la respuesta a la nifedipino [15,73,74].

Lo anterior se puede entender considerando los efectos biológicos del calcitriol que inciden sobre la fisiopatología de la PE, de los que se pueden mencionar: 1) Potente actividad antiinflamatoria. Estudios *in vitro* llevados a cabo en sinciotroblastos provenientes de placentas de mujeres normotensas o con PE, han mostrado que el calcitriol es capaz de inhibir significativamente la expresión de *TNF-A*, *IL-6* e *IFN-G* en ambientes inflamatorios naturales o inducidos [20,75]. Adicionalmente, se ha demostrado que el calcitriol promueve la expresión del microRNA miR-26b-5p, lo que a su vez inhibe la expresión de la ciclooxigenasa-2 (*COX2*), y por ende, la formación de prostaglandina E2 (*PGE2*), un potente factor inflamatorio [76]. Estudios *in vivo* también han apoyado la capacidad antiinflamatoria de la VD en el embarazo [77]. 2) Capacidad de disminuir la presión arterial. Es bien conocida la habilidad del calcitriol de reprimir la expresión de la renina, interactuando con el sistema renina-angiotensina y disminuyendo así la presión arterial [78–80]. Interesantemente, el calcitriol de origen placentario alcanza la circulación materna, en donde puede modular la fisiología materna [81,82]. Al respecto, se ha descrito una correlación inversa significativa entre las concentraciones de calcidiol en el suero de cordón umbilical y la presión arterial de madres con infecciones genitourinarias, así como en madres sin complicaciones y con neonato femenino [83]. De igual forma, también se ha descrito menor presión arterial en niños y adolescentes que presentaron concentraciones más elevadas de calcidiol en su cordón umbilical al nacimiento, mientras que la deficiencia de VD se ha asociado con hipertensión en la progenie, sugiriendo la programación intrauterina de la presión arterial por la VD [80,84]. Lo anterior destaca la importancia de la VD en la salud cardiovascular materna y de la descendencia. 3) Disminución de la actividad proinflamatoria vía inhibición de la señalización del receptor tipo Toll-9 (*TLR-9*). Se sabe que en la PE hay una exacerbación de la respuesta inmunológica inducida por DNA libre de origen placentario a través de su interacción con el *TLR-9*. Además, la expresión de *TLR-9* y otros *TLRs* se ha reportado incrementada en las placentas PE [85]. En este aspecto, se ha descrito la capacidad de la VD para regular negativamente la expresión de *TLR-9* y la consecuente elevación de *IL-6* en células inmunológicas [58,86].

## 1.6 Respuesta inmunológica y diferencias ligadas al sexo

Las enfermedades afectan de diferente manera a hombres y mujeres. Por ejemplo, los hombres sufren más frecuentemente de infecciones bacterianas, micóticas, parasitarias y virales [87]. La causa de esta diferencia asociada al género no ha sido del todo clarificada; sin embargo, algunas de las explicaciones que se manejan es el fortalecimiento de la respuesta inmunológica por parte de los estrógenos y la inmunosupresión promovida por la testosterona [88,89]. Durante la vida intrauterina, las diferencias sexuales en la expresión de factores inmunológicos contribuyen a delinear la respuesta del feto a las infecciones y la inflamación. Al respecto, se han descrito adaptaciones placentarias género-específicas en la gestación humana, y de manera muy interesante, el sexo masculino se asocia con mayor riesgo de complicaciones durante el periodo perinatal tales como parto pretérmino (PPT), ruptura prematura de membranas pretérmino (RPMP) y PE [90,91]. Además, las placentas de fetos hombres se ven afectadas más frecuentemente con infecciones y presentan una respuesta inmunológica más débil en comparación con la de mujeres [35,92]. Se ha demostrado que las placentas de neonatos masculinos tienen menor expresión de catelicidina y *CYP27B1* [32], mientras que en cultivos de trofoblastos humanos la testosterona disminuyó la biosíntesis de calcitriol, lo que a su vez se reflejó en menor producción de catelicidina [32]. Lo anterior se explica por la capacidad de la testosterona de inhibir en la placenta la expresión de *CYP27B1* y de estimular la de *CYP24A1*, enzima que inicia la vía catabólica del calcitriol [32]. Congruentemente con lo anterior, se ha descrito que las mujeres presentan significativamente mayores concentraciones de calcitriol que los hombres [93]; sin embargo, no se sabe si esta diferencia se observa también en la producción placentaria de calcitriol en embarazos con fetos de diferente sexo. Al respecto, se ha encontrado mayor expresión placentaria de catelicidina y una tendencia a mayor concentración de calcitriol en el suero de cordón umbilical de neonatos femeninos vs. los masculinos en una cohorte de mujeres con infección en vías genitourinarias [32,83]. Sin embargo, no se conoce si existen diferencias de calcidiol y calcitriol en el suero de cordón de neonatos femeninos y masculinos en condiciones inflamatorias del embarazo como la PE y la OB materna en la población mexicana.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el sexo masculino del feto se asocia con mayor riesgo de un desenlace adverso del embarazo, tal como infección placentaria, PPT, RPMP, PE y expresión placentaria incrementada de citocinas proinflamatorias [91,92,94,95]. En todos estos casos, la inflamación juega un papel determinante. El mantenimiento del embarazo depende en gran parte de la capacidad de la placenta para resolver la exacerbación de la respuesta inflamatoria.

Dado que el calcitriol es una hormona con potentes funciones antiinflamatorias y antibióticas [19–21,96] y que estudios previos llevados a cabo en trofoblastos cultivados sugieren menor síntesis de dicha hormona por las placentas de fetos masculinos [25], en este trabajo decidimos estudiar posibles diferencias en las concentraciones de calcitriol en el suero de cordón de neonatos de diferente sexo, así como su asociación con la expresión de marcadores de inflamación en la placenta de mujeres con OB y PE. Adicionalmente, y dada la capacidad del calcitriol de incidir en la fisiología materna, también estudiamos la posible asociación de dicho metabolito con la presión arterial de las madres incluidas en este estudio. Considerando la alta prevalencia de deficiencia de VD en las mujeres embarazadas, y en particular las mexicanas [9–12], es necesario conocer la relación de los metabolitos de esta vitamina en el compartimento materno fetal y su asociación con marcadores inflamatorios placentarios para poder proponer con bases sólidas programas de suplementación sobre todo para mujeres gestantes que sufren de OB o PE, con una perspectiva que considere el sexo fetal.

## **3. JUSTIFICACIÓN**

La VD es un importante factor inmunomodulador en la unidad fetoplacentaria, en donde la producción de su forma hormonal, el calcitriol, es regulada de forma sexualmente dimórfica. Los efectos del calcitriol en la respuesta inflamatoria en la placenta han sido ampliamente caracterizados, situando a esta hormona como un potente antiinflamatorio capaz de inhibir la expresión de citocinas que se han

reportado elevadas tanto en la PE como en la OB. Estas patologías conllevan riesgo de morbimortalidad perinatal y se han asociado con deficiencia de VD. Sin embargo, casi nada se ha estudiado referente los niveles de los metabolitos calcidiol en el suero materno y calcitriol en el suero de cordón de neonatos femeninos y masculinos en dichas condiciones inflamatorias en la población mexicana, y se desconoce su relación con la expresión de marcadores de inflamación en la placenta y células inmunológicas de sangre de cordón umbilical. Dada la prevalencia de deficiencia de VD en mujeres embarazadas mexicanas, y considerando que la hipovitaminosis D se asocia más frecuentemente con desenlaces adversos en la gestación, consideramos importante llevar a cabo este estudio para plantear estrategias de prevención y así mejorar la salud perinatal. Cabe mencionar que el estado nutricional de la VD es un factor fácilmente modificable con gran potencial benéfico durante la etapa perinatal, que además es económicamente sustentable. Por otro lado, nuestros resultados arrojarán luz para valorar adecuadamente la importancia del calcitriol placentario sobre el entorno inmunológico de la unidad fetoplacentaria, considerando las diferencias dependientes del sexo fetal, en embarazos de mujeres con OB o PE.

#### **4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

**4.1** ¿El calcitriol en el suero del cordón umbilical y el calcidiol en suero materno se asociará negativamente con la presión arterial materna al momento de la resolución del embarazo de mujeres PE y con OB?

**4.2** En un ambiente inflamatorio no infeccioso durante el embarazo, ¿el calcitriol en el suero del cordón umbilical y el calcidiol en suero materno se asociarán negativamente con el perfil de expresión de citocinas inflamatorias y positivamente con la de péptidos antimicrobianos en la placenta?

**4.3** ¿Habrán asociaciones diferentes entre los parámetros estudiados dependiendo del sexo del recién nacido?

## **5. HIPÓTESIS**

**5.1** En la PE y OB materna, se encontrará una correlación negativa entre las concentraciones de calcitriol en el suero de cordón umbilical y el calcidiol en suero materno con la presión arterial materna.

**5.2** El calcitriol en suero de cordón umbilical y el calcidiol en suero materno se asociarán negativamente con la expresión de marcadores de inflamación y positivamente con la de péptidos antimicrobianos en placentas de mujeres con OB o PE, en comparación con mujeres control.

**5.3** En las condiciones PE y OB, la expresión de marcadores de inflamación en la placenta será sexualmente dimórfica.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar las posibles asociaciones entre la concentración de calcitriol en suero de cordón y calcidiol en suero materno, el sexo del recién nacido y la expresión de factores relacionados con inflamación, presión arterial materna e inmunidad en la unidad fetoplacentaria de mujeres mexicanas con OB o PE.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

6.2.1 Cuantificar la concentración de calcitriol en el suero del cordón umbilical y calcidiol en suero materno de mujeres mexicanas con OB o PE y analizarlo acorde al sexo del recién nacido.

6.2.2 Analizar las posibles asociaciones entre las concentraciones de los metabolitos de la VD3 y la presión arterial materna.

6.2.3 Estudiar la expresión génica de diversos marcadores de inflamación e inmunidad en la placenta al momento de la resolución del embarazo de mujeres mexicanas con OB o PE y compararla con el grupo control.

6.2.4 Analizar las posibles asociaciones entre las concentraciones de los metabolitos de la VD y la expresión de los marcadores de inflamación/inmunidad.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Definición del universo o población

Se recolectaron muestras de cotiledones placentarios y suero del cordón umbilical, de una cohorte prospectiva del Instituto Nacional de Perinatología. Para el desarrollo de este proyecto se analizó una submuestra del banco colectado en el proyecto OBESO (Origen Bioquímico y Epigenético del Sobrepeso y la Obesidad) (No. Registro: 3300-11402-01-575-17, INPer 2017-1-575). Todas las mujeres que aceptaron participar firmaron de manera voluntaria la carta de consentimiento informado. Se registraron las características clínicas de las pacientes y de los recién nacidos (Anexo 1).

#### 7.1.1 Criterios de Inclusión

El presente estudio comprendió 3 grupos con dos subgrupos cada uno, mismos que consideran el sexo del recién nacido. Todos los grupos incluyeron mujeres con edad biológica entre 18 a 38 años, con gestación única, resuelta por parto o cesárea.

**Grupo 1) Control, embarazo normoevolutivo (NE).** Mujeres con embarazo normal a término (37 - 42 semanas de gestación –SDG-), con buena salud previo al embarazo y durante el mismo, sin enfermedad inflamatoria o infecciosa, corroborado por urocultivo y/o cultivo cervicovaginal negativos y/o examen general de orina y urolabstix sin datos de infección, así como presión arterial en rangos normales, con IMCp normal (18.5-24.99 kg/m<sup>2</sup>), sin evidencia de proteinuria. Los subgrupos NE con neonato femenino y masculino se denominarán NE-F y NE-M, respectivamente.

**Grupo 2) Obesidad materna (OB).** Mujeres con embarazo único a término (37 - 42 SDG), que presenten un IMCp categorizado como obesidad ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>). Los subgrupos OB con neonato femenino y masculino se denominarán OB-F y OB-M, respectivamente.

**Grupo 3) Preeclampsia (PE).** Mujeres con embarazo único  $\geq$  a 28 SDG. Para diagnosticar la PE se considerarán los criterios establecidos previamente, como se define brevemente a continuación: PE: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg y/o

presión arterial diastólica  $\geq 90$  mm Hg (con 4 horas de diferencia entre mediciones) y proteinuria  $> 300$  mg/24 h, o 2+ en las tiras reactivas, o una relación proteína/creatinina  $\geq 0.3$ . o con algún criterio de severidad (cefalea que no cede a analgésico habitual, alteraciones visuales o auditivas, edema agudo pulmonar, epigastralgia o dolor en cuadrante superior derecho, elevación de enzimas hepáticas dos veces el límite superior normal, creatinina  $> 1.1$  mg/dL, trombocitopenia  $< 100,000$  por microlitro, presión arterial sistólica  $\geq 160$  mm Hg y/o presión arterial diastólica  $\geq 110$  mm Hg (con 15 minutos de diferencia entre mediciones), con o sin IMCp normal (18.5-24.99). Los subgrupos PE con neonato femenino y masculino se denominarán PE-F y PE-M, respectivamente.

### **7.1.2 Criterios de exclusión**

Se excluyeron a mujeres con antecedentes o diagnóstico de enfermedades hepáticas, cardíacas, diabéticas, con tratamiento hormonal previo y/o cáncer. También se excluirán mujeres con datos clínicos de infección.

### **7.1.3 Criterios de eliminación**

Se consideró como criterio de eliminación aquellas placentas que presenten alteraciones estructurales.

## **7.2 Recolección de muestras**

Para la recolección de las muestras se observaron los siguientes criterios:

### **7.2.1 Recolección de sangre del cordón umbilical**

Posterior al nacimiento del neonato, y mientras el cordón del lado placentario estaba pinzado, se tomó la muestra de sangre de vena umbilical. Esta vena se sitúa en la porción central del cordón, inmersa en la gelatina de Wharton, es la de mayor calibre y tiene un color menos violáceo en comparación con las arterias umbilicales que son dos, y que se enrollan alrededor de la vena única. El Gineco-Obstetra que atendió el parto o cesárea tomó la muestra de sangre venosa del cordón umbilical (aproximadamente 10 mL) en tubo estéril con ayuda de una jeringa. Las muestras sanguíneas se protegieron en todo momento de la exposición a la luz y calor, y se

centrifugó a 3,200 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó en alícuotas a -70° C protegido de la luz hasta su uso. Posteriormente se trasladó el material biológico hacia el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. El día del transporte, se colocó a las alícuotas de suero umbilical en una caja, dentro de una hielera sellada y con hielo seco para mantener condiciones de congelación en su interior, ~ -20°C.

### **7.2.2 Recolección de una muestra de cotiledones placentarios**

Para los estudios de expresión génica, una vez realizado el alumbramiento de la placenta se identificó el cotiledón central, se tomó una muestra de aproximadamente 1 x 1 cm de cotiledón el cual se lavó exhaustivamente con solución salina al 0.9% a fin de eliminar la sangre que baña al cotiledón durante la vida prenatal. Este material se almacenó a -70°C en solución preservadora de RNA (RNAlater®, Sigma) que impide la degradación de los ácidos nucleicos.

### **7.3 Tamaño de la muestra**

Este es un estudio comparativo. El tamaño de la muestra se calculó mediante la fórmula estadística establecida para estudios en seres humanos y recomendada por la Organización Mundial de la Salud:

$$N \geq 2S^2 (Z\alpha + Z\beta)^2/\Delta^2$$

Con base a los hallazgos reportados en estudios previos [32], para el cálculo de la N se consideró un marcador de inmunidad que fue diferencialmente expresado en la placenta de acuerdo con el sexo del neonato como variable predictora. En este caso fue la expresión de catelicidina (codificada por el gen *CAMP*). La expresión relativa de *CAMP* en neonatos masculinos fue de  $143.5 \pm 117.7$ , y en femeninos de  $342.2 \pm 205.7$ . La S corresponde a la desviación estándar del grupo femenino,  $Z\alpha = 1.96$  para un nivel de confianza del 95%;  $Z\beta = 0.84$  para un poder de muestra del 80% y  $\Delta$  = diferencia mínima esperada. Tomando en cuenta lo anterior, se determinó que la “N” correspondía a  $\geq 17$ . Se consensó procesar 20 placentas de cada sexo para cada grupo de estudio, dada la variabilidad que puede existir entre los individuos estudiados, así como la variabilidad biológica del resto de las variables a

estudiar. Por lo tanto, la muestra total estaría integrada por 40 placentas NE, 40 OB y 40 PE, para un total de 120 muestras considerando todos los grupos y subgrupos.

$$N = \frac{2(206)^2(1.96 + 0.84)^2}{(199)^2} = 17$$

#### 7.4 Definición de las unidades de observación (variables)

En la *Tabla 1* se describen los marcadores que se estudiaron, la justificación para su consideración en este estudio y la técnica por la que se evaluó cada uno.

*Tabla 1. Definición de las unidades de observación.*

<b>Marcador</b>	<b>Justificación</b>	<b>Compartimento en donde se estudiará</b>	<b>Técnica</b>
<i>TNF-A</i>	Citocina proinflamatoria. Importante mediador de la respuesta inflamatoria. Su expresión exacerbada puede poner en riesgo el embarazo. Su expresión está incrementada en PE y OB. Es reprimida por calcitriol en trofoblasto, y células inmunológicas.	Cotiledón placentario	qPCR
<i>IL-6</i>	Citocina inflamatoria. Su expresión exacerbada puede poner en riesgo el embarazo. Su expresión está incrementada en PE y OB. Es reprimida por calcitriol en trofoblasto y en células inmunológicas	✓	✓
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	Citocina inflamatoria. Su expresión exacerbada puede poner en riesgo el embarazo. Su expresión está incrementada en PE y OB.	✓	✓
<i>TGF-B1</i>	Citocina implicada en el control de la proliferación y la diferenciación celular, así como en la secreción y la actividad de otras citocinas.	✓	✓
<i>IL-10</i>	Citocina antiinflamatoria. El calcitriol disminuye la secreción endógena de IL-10.	✓	✓
<i>DEFB1</i>	Péptido antimicrobiano endógeno. Su expresión es regulada por IL-10 y calcitriol.	✓	✓
<i>CAMP</i>	Catelicidina humana participa es parte de la inmunidad innata contra los virus, con actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, funciona en la quimiotaxis celular, la inducción de	✓	✓

	mediadores inmunitarios y la regulación de la respuesta inflamatoria.		
<i>TLR-9</i>	Miembro de la familia de receptores tipo Toll, involucrado en el reconocimiento viral, capaz de reconocer patrones moleculares asociados al daño.	✓	✓
<i>IL-1B</i>	Citocina inflamatoria. Es estimulada por calcitriol en la placenta.	✓	✓
<i>CYP24A1</i>	Citocromo que degrada al calcitriol.	✓	✓
Calcitriol	Hormona que se produce por hidroxilación del carbono 1 del calcidiol. Ejerce potentes efectos anti-inflamatorios, estimula la expresión de diversos péptidos antimicrobianos e inhibe la de citocinas inflamatorias en la placenta y otros tejidos. Tiene efectos anti-hipertensivos.	Suero de cordón umbilical	CLIA
Calcidiol	Sustrato metabólico que, tras acción de la CYP27B1, da origen al calcitriol. Es el metabolito más abundante de la vitamina D y se emplea como marcador del estado nutricional de esta vitamina.	Sangre periférica materna	CLIA

*Marcadores utilizados para evaluar en las muestras de placenta, células inmunológicas o suero de cordón umbilical. CLIA: inmunoensayo quimioluminiscente; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.*

## 7.5 Técnicas y Procedimientos

### 7.5.1 Expresión génica

En este trabajo se estudió la expresión génica del citocromo que degrada al calcitriol (*CYP24A1*), de marcadores de inmunidad (*CAMP*, *DEFB1*) marcadores de inflamación (*IL-6*, *IL-8*, *TNFA*, *IL1B*) y otras citocinas (*TGF-B1*, *IL-10*). Se extrajo el Ácido Ribonucleico (RNA) de los cotiledones placentarios utilizando Trizol® (Invitrogen) y un homogenizador que procesa el tejido de muestras individuales mediante su colisión con esferas de cerámica estériles (Magna Lyser®, Roche). La calidad y cantidad de RNA se estimó espectrofotométricamente a 260/280 nm. Una cantidad constante de RNA (2 µg) se empleó para la síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (cDNA), usando transcriptasa reversa y oligo-dT (Transcriptor®, Roche). Posteriormente se llevó a cabo la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando iniciadores específicos para cada gen, incluido el de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*) que fue usado como gen constitutivo con fines de

normalización de resultados (*Tabla 2*). Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler 480 (Roche) con la mezcla Master-mix® (Roche) en combinación con las sondas de hidrólisis correspondientes (Universal Probe Library, Roche, *Tabla 2*), siguiendo el siguiente protocolo: Activación de la Taq DNA polimerasa y desnaturalización del DNA a 95 °C 10 min, seguido de 45 ciclos de amplificación (10 s 95 °C, 30 s 60 °C, y 1 s 72 °C).

*Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis.*

<b>Gen</b>	<b>Iniciador sentido</b>	<b>Iniciador antisentido</b>	<b>sonda</b>
<i>CYP24A1</i>	catcatggccatcaaaacaa	gcagctcgactggagtgac	88
<i>GAPDH</i>	agccacatcgctcagacac	gcccaatacgaccaaattcc	60
<i>TNF-A</i>	cagcctcttctccttctga	gccagagggctgattagaga	29
<i>IL-6</i>	gatgagtacaaaagtcctgatcca	ctgcagccactggttctgt	40
<i>IL-8</i>	agacagcagagcacacaagc	atggttccttccgggtgt	72
<i>TGF-B1</i>	gcagcacgtggagctgta	cagccgggtgctgaggta	72
<i>CAMP</i>	tcggatgtaaccttaccg	gtctgggtcccatccat	85
<i>IL-1B</i>	tacctgtcctgcgtgttgaa	tcttgggtaattttgggatct	78
<i>IL-10</i>	tgggggagaacctgaagac	acaggggaagaaatcgatgaca	30
<i>DEFB1</i>	tgtctgagatggcctcaggt	gggcaggcagaatagagaca	86

### **7.5.2 Cuantificación de calcitriol y calcidiol**

Tanto el calcitriol en suero de cordón umbilical como el calcidiol en el suero materno se cuantificaron mediante inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) utilizando estuches comerciales. En el caso del calcitriol, se usó la marca DiaSorin y el instrumento para cuantificarlo fue LIAISON® XL Analyzer, localizado en el laboratorio central del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El CLIA es un ensayo de tres pasos tipo sándwich que se basa en la captura selectiva del calcitriol mediante el uso de una proteína recombinante de fusión que es el dominio de unión al ligando (LBD) del VDR. El calcitriol induce un cambio conformacional en el LBD recombinante que permite su reconocimiento por

el anticuerpo monoclonal que recubre la fase sólida. Después de lavar el exceso de anticuerpo se utiliza un segundo anticuerpo marcado con isoluminol dirigido contra el LBD recombinante que ya forma parte del complejo inmune. Después de otro lavado se cuantifica la luminiscencia, que será directamente proporcional a la cantidad de calcitriol en la muestra. En el caso del calcidiol, la cuantificación se llevó a cabo en el INPer en el Instrumento Abbott Architect.

### **7.6 Aspectos Éticos**

El estudio se encuentra adherido a los principios de la declaración de Helsinki y del Consejo de Biomedicina y Derechos Humanos. De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, se considera el siguiente protocolo como "Investigación con riesgo mínimo" ya que es un estudio que emplea técnicas y métodos de investigación donde no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio.

### **7.7 Análisis estadístico**

Para el análisis descriptivo se utilizaron medidas de tendencia central [media y desviación estándar (DE)] para variables cuantitativas con distribución normal. Se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías para comparar los resultados entre grupos y condiciones, así como para determinar posible interacción entre sexo del neonato y condición, expresándose los resultados como medias de mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar. Las correlaciones entre variables se estudiaron por la prueba de Spearman. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo estadísticamente. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software SigmaPlot (SigmaPlot, RRID:SCR\_003210).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Características maternas y del recién nacido.

Se incluyeron un total de 142 pacientes, de las cuales, 58 pertenecen al grupo NE, 42 al grupo OB, y 42 en el grupo PE. Considerando el sexo del neonato, los subgrupos quedaron conformados de la siguiente manera: NE-M (n = 29), NE-F (n = 29), OB-M (n = 21), OB-F (n = 21), PE-M (n = 21) y PE-F (n = 21). Las principales características clínicas de las madres y los recién nacidos se enlistan en la *Tabla 3*.

En la cohorte de PE, los parámetros antropométricos del recién nacido, incluidas peso y edad gestacional al momento del nacimiento, así como el IMCp y presión arterial sistólica y diastólica (PAS, PAD) de la madre fueron significativamente diferentes en comparación con los grupos NE y PE ( $P < 0.001$ ). Por otro lado, el Apgar y el perímetro cefálico del bebé no fueron diferentes entre los grupos, ni tampoco la edad materna. Cabe hacer notar que, en esta cohorte, el grupo OB tuvo significativamente mayor presión arterial sistólica en comparación con el grupo NE ( $P = 0.05$ ), lo que sugiere que en este estudio las madres OB estaban expuestas a riesgo elevado de cardiopatías por la coexistencia de hipertensión arterial y OB.

**Tabla 3. Características de madres y recién nacidos de embarazo normoevolutivo, y afectados con obesidad y preeclampsia.**

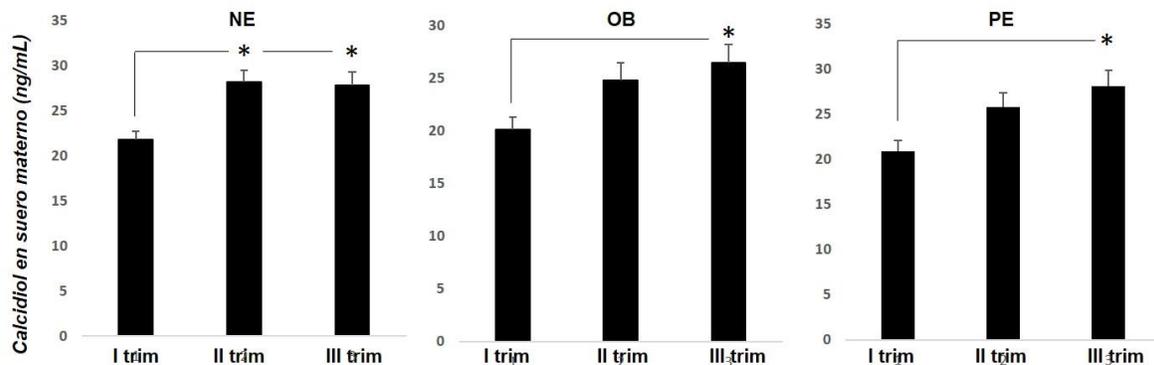
Características	NE (n=58)	OB (n=42)	NE vs OB (p)	PE (n=42)	NE vs PE (p)
<b>Parámetros Maternos</b>					
Edad	28.3 ± 0.7	29.4 ± 0.8	SD	30.4 ± 0.8	SD
IMC pregestacional (kg/m <sup>2</sup> )	22.9 ± 0.5	33.8 ± 0.6	<b>&lt;0.001</b>	30 ± 0.6	<b>&lt;0.001</b>
Calcidiol I trimestre (ng/mL)	21.7 ± 0.9	20.1 ± 1.2	SD	20.8 ± 1.1	SD
Calcidiol II trimestre (ng/mL)	28.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	24.7 ± 1.6	SD	25.7 ± 1.5	SD
Calcidiol III trimestre (ng/mL)	27.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	26.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	SD	28.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	SD
PAS (mmHg)	97 ± 2.2	104 ± 2.6	<b>0.05</b>	154 ± 1.8	<b>&lt;0.001</b>
PAD (mmHg)	61.8 ± 1.7	62.2 ± 2.0	SD	92.9 ± 1.3	<b>&lt;0.001</b>
Edad gestacional (semanas)	38.6 ± 0.2	38.6 ± 0.2	SD	37.6 ± 0.2	<b>0.01</b>
<b>Parámetros Neonatales</b>					
Peso (kg)	2900.7 ± 54.2	2932.5 ± 68.0	SD	2654.3 ± 65	<b>0.009</b>
Talla (cm)	47.2 ± 0.2	46.9 ± 0.3	SD	45.9 ± 0.3	SD
Apgar 1 min	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1	SD	7.8 ± 0.1	SD
Apgar 5 min	8.9 ± 0.0	9 ± 0.0	SD	8.9 ± 0.0	SD
Perímetro cefálico (cm)	34.0 ± 0.2	34.4 ± 0.2	SD	33.9 ± 0.2	SD
Calcitriol en suero de cordón umbilical (pg/mL)	46.8 ± 2.6	40.0 ± 3.4	SD	37.5 ± 3.3	SD

Medias de mínimos cuadrados ± error estándar de la media (SEM). La fuente en negrita representa diferencias significativas. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; SD: sin diferencia significativa; NE: embarazo normoevolutivo; OB: obesidad; PE: preeclampsia. a=  $P < 0.05$  frente a calcidiol de I trimestre del mismo subgrupo.

## 8.2 Metabolitos de VD en suero materno y de cordón umbilical.

### 8.2.1 Calcidiol en suero materno

Es conocido que los niveles de calcidiol en el suero materno aumentan de forma progresiva a través de la evolución del embarazo [97]. Este patrón fue también observado en nuestra cohorte, tanto en el grupo NE, como en OB y PE, observando diferencias ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones de calcidiol de primer trimestre en comparación al tercer trimestre en el grupo NE ( $21.7 \pm 0.9$  y  $27.8 \pm 1.4$ ), OB ( $20.1 \pm 1.2$  y  $26.4 \pm 1.7$ ) y PE ( $20.8 \pm 1.1$  y  $28.0 \pm 1.7$ ) (Tabla 3 y Figura 2). Considerando todos los trimestres, si bien hubo menores concentraciones de calcidiol en el grupo OB y PE vs NE ( $23.7 \pm 0.9$ ,  $24.8 \pm 0.8$  y  $25.9 \pm 0.7$ , respectivamente), la prueba de ANOVA de tres vías no arrojó diferencia estadística. Sin embargo, se detectó interacción entre el sexo y la condición ( $P = 0.045$ ), y el análisis *post-hoc* por Holm-Sidak mostró en el grupo PE significativamente mayor concentración de calcidiol en el subgrupo femenino vs el masculino ( $27.12 \pm 1.24$  vs  $22.66 \pm 1.19$ , ng/mL, respectivamente,  $P = 0.01$ ) (ANOVA de tres vías)

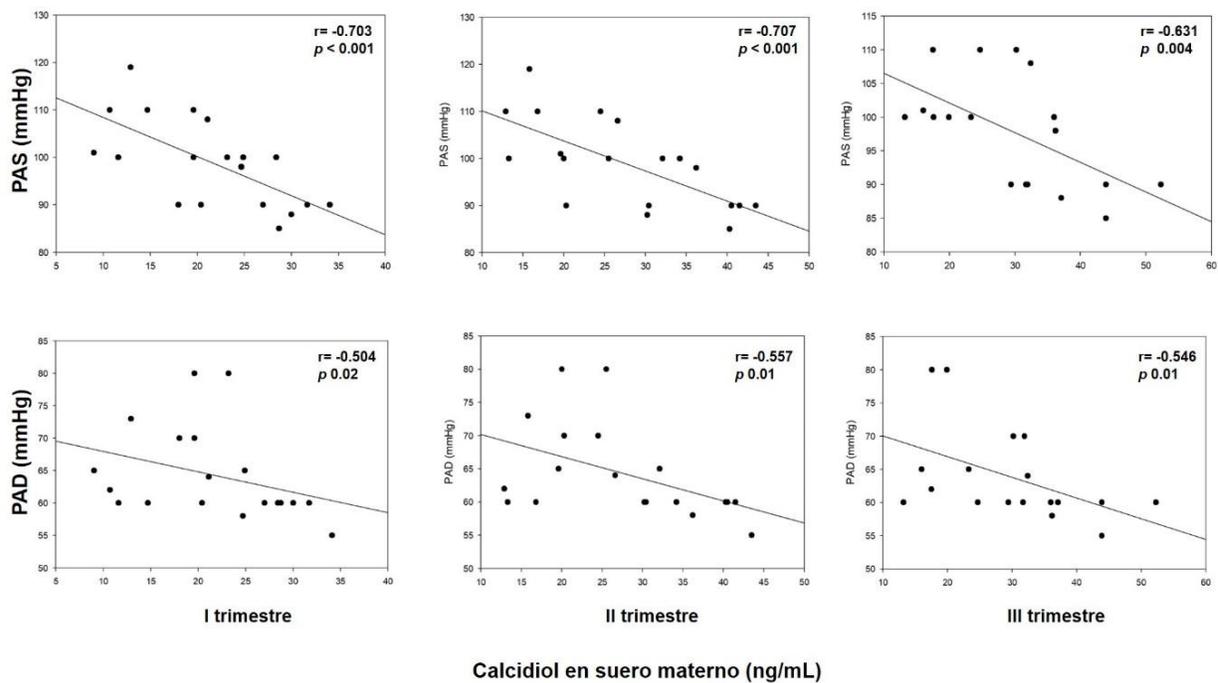


**Figura 2** Aumento longitudinal de la concentración de calcidiol en suero materno de los grupos. calcidiol en suero materno (ng/ml); Trim, trimestre, NE: Normoevolutivo, OB: Obesidad, PE: Preeclampsia. Medias de mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $P < 0.05$

## 8.2.2 Correlación entre las concentraciones de calcidiol en suero materno y la presión arterial materna.

De manera muy interesante, en el grupo NE, los niveles de calcidiol en suero materno tanto de I, II y III trimestre se correlacionaron negativamente con la presión arterial sistólica y diastólica (Tablas 5 y 6, Figura 3). Esta correlación inversa fue significativa ( $P < 0.05$ ) en todos los casos menos en PAD con calcidiol de primer trimestre, donde fue en el mismo sentido, pero de significancia marginal ( $P = 0.07$ ).

Al analizar por sexo del recién nacido, las correlaciones negativas se mantuvieron únicamente en el subgrupo NE-M, observándose correlación inversa entre el calcidiol de I, II y III trimestre en todos los casos con la PAS y PAD materna (Figura 3, Tabla 5, Tabla 6).

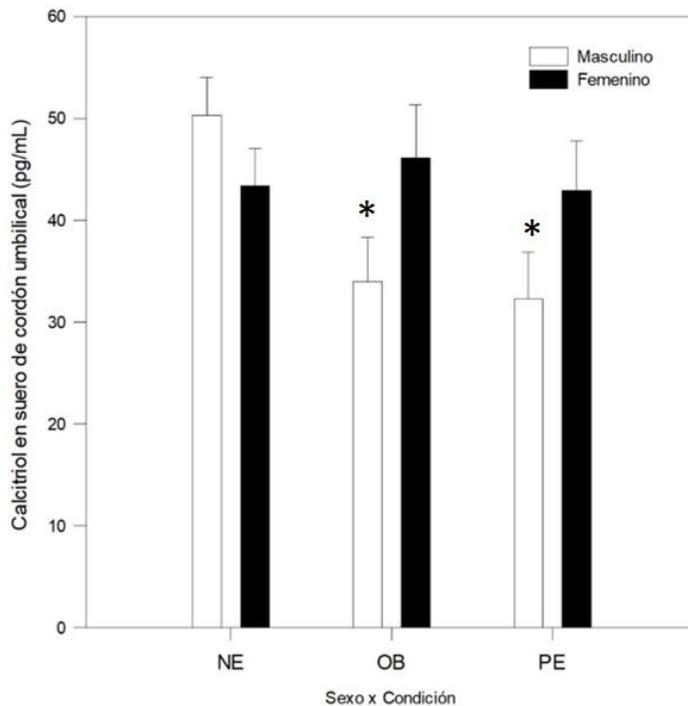


**Figura 3** Los niveles de calcidiol en el suero materno de I, II y III trimestre se correlacionaron inversamente con la presión arterial materna en el subgrupo NE-M en todos los casos. Los gráficos de regresión lineal simple muestran las asociaciones entre el calcidiol en el suero materno de I, II y III trimestre y la presión arterial sistólica y diastólica materna (PAS, PAD) en muestras de la cohorte de embarazo normoevolutivo de sexo masculino.

### 8.2.3 Calcitriol en suero de cordón umbilical.

Por otro lado, en cuanto a las concentraciones de calcitriol en el suero de cordón umbilical, se observaron también diferencias dependientes del sexo del bebé (interacción entre condición y sexo  $P = 0.042$ ), encontrándose diferencia significativa entre subgrupos solo en el masculino. Como se observa en la *Figura 4*, las concentraciones de calcitriol en suero de cordón umbilical de recién nacidos de sexo masculino pertenecientes a los grupos PE y OB fueron significativamente menores en comparación a recién nacidos del grupo NE del mismo sexo (*Figura 4*). Adicionalmente, el análisis por ANOVA de una vía entre grupos independientemente del sexo del neonato mostró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo NE y el PE, siendo la mediana e intercuartiles (25-75%) para NE, OB y PE: 44 (37.15, 55.5), 34.6 (28.3, 50.5) y 32.6 (30.7, 39.2), respectivamente. No se encontraron asociaciones significativas entre la presión arterial y los niveles de calcitriol en suero de cordón umbilical del neonato (*Tabla 5*, *Tabla 6*).

#### Calcitriol en suero de cordón umbilical



*Figura 4* Concentración de calcitriol en suero de cordón umbilical obtenido de embarazos normales y afectados por obesidad o preeclampsia. NE: embarazo normoevolutivo; OB: obesidad; PE: preeclampsia. Las barras representan, medias de mínimos cuadrados  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  frente al subgrupos NE mismo sexo.

**Tabla 4. Características de subgrupos madres y recién nacidos de sexo masculino o femenino en embarazo normoevolutivo, y afectados con obesidad y preeclampsia.**

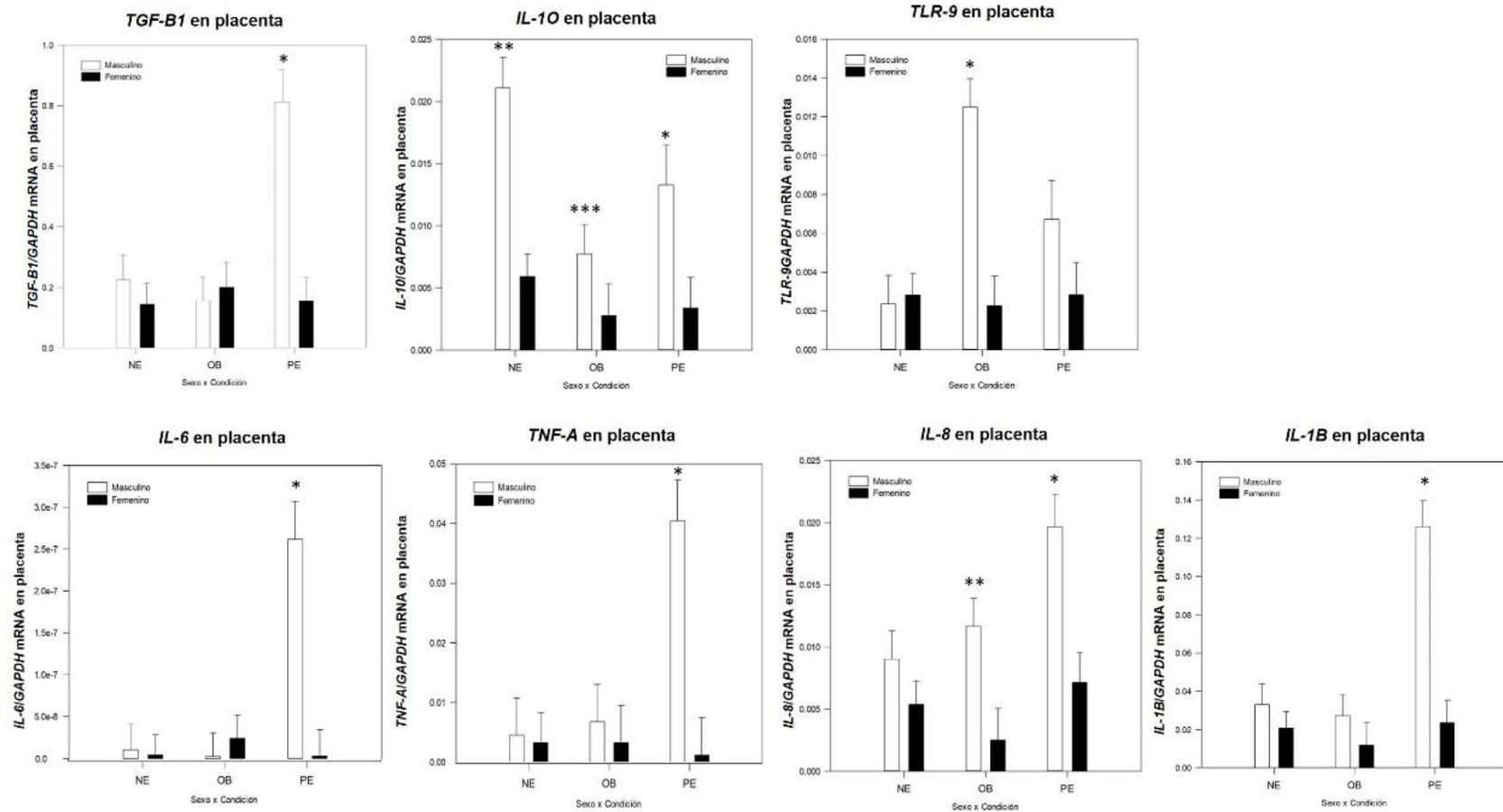
Características	NE-M (n=29)	NE-F (n=29)	OB-M (n=21)	OB-F (n=21)	PE-M (n=21)	PE-F (n=21)
<b>Parámetros Maternos</b>						
Edad (años)	27.7 ± 1.0	29.0 ± 1.0	30.0 ± 1.1	28.6 ± 1.1	30.0 ± 1.1	30.8 ± 1.2
IMC pregestacional (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 ± 1.5	23.1 ± 2.1	<b>32.6 ± 3.0<sup>a</sup></b>	<b>35.0 ± 5.6<sup>a</sup></b>	<b>30.9 ± 7.3<sup>a</sup></b>	<b>29.2 ± 3.6<sup>a,b</sup></b>
Calcidiol I trimestre (ng/mL)	21.7 ± 7.6	21.7 ± 7.9	20.1 ± 5.3	20.0 ± 6.6	19.8 ± 5.6	21.91 ± 7.0
Calcidiol II trimestre (ng/mL)	<b>27.8 ± 10.9<sup>c</sup></b>	<b>28.6 ± 9.8<sup>c</sup></b>	25.4 ± 6.8	24.1 ± 9.1	23.7 ± 8.9	27.7 ± 9.2
Calcidiol III trimestre (ng/mL)	<b>29.4 ± 10.0<sup>c</sup></b>	26.2 ± 10.0	26.5 ± 10.1	26.3 ± 8.0	24.4 ± 10.5	<b>31.7 ± 9.0<sup>c</sup></b>
PAS (mmHg)	98.8 ± 9.3	95.1 ± 8.4	106 ± 7.4	102 ± 9.9	<b>156.3 ± 17.8<sup>a,b</sup></b>	<b>151.6 ± 10.3<sup>a,b</sup></b>
PAD (mmHg)	64.3 ± 7.1	59.4 ± 4.0	62.8 ± 6.4	61.5 ± 5.8	<b>94.2 ± 14.3<sup>a,b</sup></b>	<b>91.6 ± 7.5<sup>a,b</sup></b>
Edad gestacional (semanas)	38.4 ± 1.4	38.7 ± 1.1	38.6 ± 1.5	38.7 ± 1.2	<b>37.3 ± 2.1<sup>a,b</sup></b>	<b>37.9 ± 2.0<sup>a,b</sup></b>
<b>Parámetros Neonatales</b>						
Peso (kg)	2971.1 ± 75.3	2830.4 ± 78.0	3028.5 ± 90.7	2836.6 ± 101.4	2761.8 ± 90.7	2546.8 ± 93.0
Talla (cm)	47.5 ± 1.5	46.9 ± 1.8	47.1 ± 2.1	46.7 ± 1.7	46.5 ± 2.5	45.5 ± 1.9
Apgar 1 min	7.7 ± 1.3	7.9 ± 1.1	7.7 ± 1.0	7.9 ± 0.3	7.7 ± 1.0	7.9 ± 1.0
Apgar 5 min	9.0 ± 0.3	8.9 ± 0.2	9 ± 0	9 ± 0.3	8.9 ± 0.3	9 ± 0
Perímetro cefálico (cm)	34.2 ± 1.5	33.7 ± 1.2	34.9 ± 1.5	34.0 ± 1.6	34.2 ± 1.6	33.5 ± 0.9
Calcitriol en suero de cordón umbilical (pg/mL)	50.3 ± 13.5	43.3 ± 14.5	<b>33.9 ± 9.1<sup>a</sup></b>	46.0 ± 17.0	<b>32.2 ± 9.0<sup>a</sup></b>	42.9 ± 18.3

Medias de mínimos cuadrados ± error estándar de la media (SEM). La fuente en negrita representa diferencias significativas. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; NE: embarazo normoevolutivo; OB: obesidad; PE: preeclampsia; M: sexo masculino; F: sexo femenino. a =  $P < 0.05$  vs mismo sexo en NE, b =  $P < 0.05$  frente al mismo sexo en OB, c =  $P < 0.05$  frente a calcidiol de I trimestre del mismo subgrupo.

### **8.3 Implicaciones inmunitarias dependientes del sexo del recién nacido.**

#### **8.3.1 Citocinas inflamatorias**

La expresión relativa del RNA mensajero (RNAm) de *diversas citocinas* fue significativamente mayor en el tejido placentario masculino en comparación con el de los neonatos femeninos. En particular, la expresión de *IL-6*, *TNF-A*, *TGF-B1*, *IL-1 $\beta$* , *IL-10*, e *IL-8* fue significativamente mayor en PE en comparación a NE y OB ( $P < 0.05$ ). Al realizar el análisis de subgrupos, se observó una elevada expresión placentaria de *IL-6*, *TNF-A* y *TGF-B1* en las muestras de PE-M en comparación al subgrupo PE-F ( $P < 0.001$ ) (*Figura 5*). Por otro lado, la expresión de *TLR-9* fue mayor en el grupo OB vs NE y PE siendo más elevada en el sexo masculino ( $P < 0.001$ ). Se encontró una interacción estadísticamente significativa entre el sexo del neonato y la condición OB para *TLR-9* ( $P < 0.001$ ), así como en la expresión de *IL-8*, *IL-10*, *IL-6*, *TNF-A*, *TGF-B1* y la condición de PE, lo que sugiere que el dimorfismo sexual observado en estas condiciones depende de la presencia de la patología. No se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa del RNAm de otras variables estudiadas (datos no mostrados).

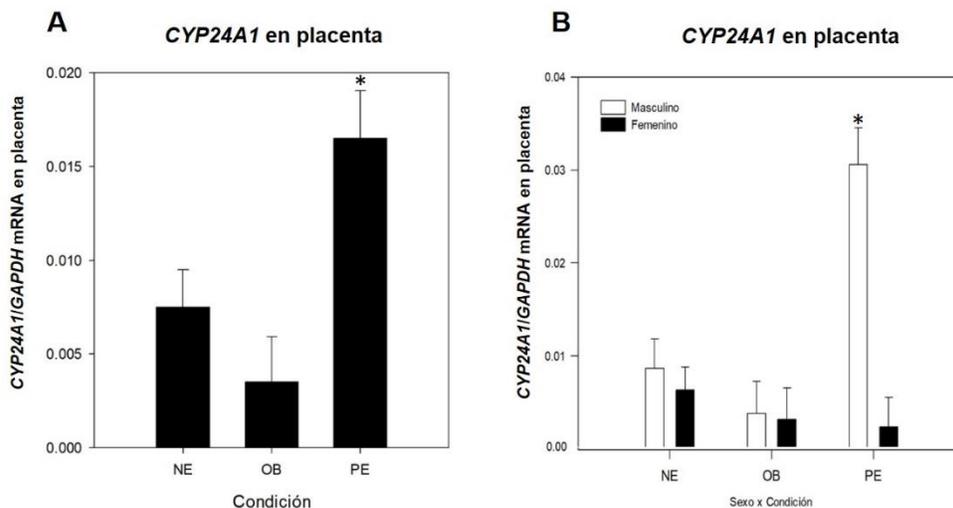


**Figura 5** Expresión génica de TGF-B1, IL-10, TLR-9, IL-6, y TNF-A, IL-8, IL-1B en placentas de embarazos normovolutivos y afectados por obesidad o preeclampsia. La Figura muestra la expresión génica relativa de TGF-B1, IL-10, TLR-9, IL-6, y TNF-A, IL-8, IL-1B se analizó mediante qPCR en placentas obtenidas de embarazos normoevolutivos (NE), con obesidad (OB) y preeclampsia (PE) y se normalizó frente a la expresión del gen GAPDH. Las barras representan medias de mínimos cuadrados  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.001$  frente a los subgrupos NE y OB del mismo sexo y frente al subgrupo PE-femenino. \*\*  $P < 0.001$  frente al subgrupo NE-femenino \*\*\*  $P < 0.001$  frente al subgrupo NE-masculino.

### 8.3.2 CYP24A1

De manera similar a las citocinas estudiadas, la expresión del gen *CYP24A1* se encontró significativamente más elevada en placenta de recién nacidos de sexo masculino en comparación con aquellos de sexo femenino:  $0.014 \pm 0.002$ , vs.  $0.003 \pm 0.001$  respectivamente. Además, la expresión de *CYP24A1* fue significativamente mayor en el grupo PE ( $0.01 \pm 0.002$ ) en comparación a NE y OB ( $0.007 \pm 0.002$ ,  $0.003 \pm 0.002$ , respectivamente,  $P < 0.05$ ).

Las placentas asociadas con recién nacidos masculino de embarazos afectados por PE tenían una mayor expresión del gen de *CYP24A1* en comparación con mujeres del mismo grupo ( $P < 0.001$ ). Se encontró una interacción estadísticamente significativa entre el sexo del neonato y la condición clínica, lo que sugiere que la diferencia de dimorfismo sexual en este rasgo dependía de la presencia de PE. (Figura 6)

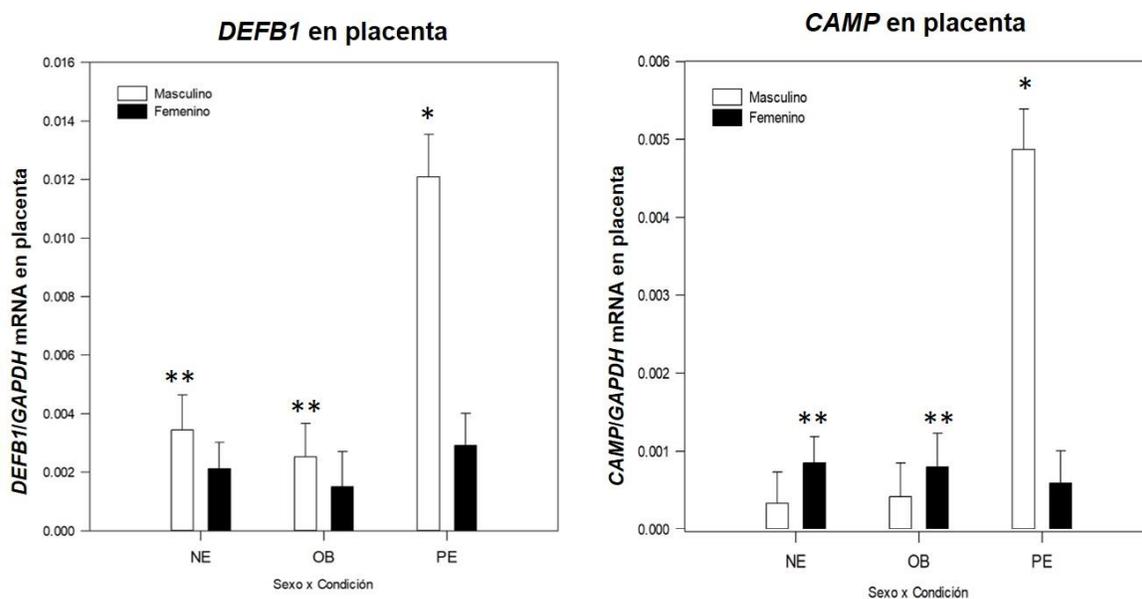


**Figura 6.** Expresión génica de *CYP24A1* en placentas de embarazos normoevolutivos y afectados por obesidad o preeclampsia. La expresión génica relativa de *CYP24A1* se analizó mediante qPCR en placentas obtenidas de embarazos normales (NE), con obesidad (OB) y preeclampsia (PE) (A) y los subgrupos por sexo de recién nacido (B). Los resultados fueron normalizados vs. a la expresión del gen GAPDH. Las barras representan, medias de mínimos cuadrados  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.001$  vs. los subgrupos NE y OB del mismo sexo y frente al subgrupo PE-femenino.

### 8.3.3 Péptidos antimicrobianos

Con respecto a la expresión de péptidos antimicrobianos, los hombres mostraron niveles más elevados de expresión de *DEFB1* en tejido placentario NE, OB y PE en

comparación con las muestras de mujeres ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la expresión de *CAMP* fue significativamente más alta en el tejido placentario de mujeres en los grupos NE y OB ( $P < 0.05$  por T-test). Interesantemente, en el caso del grupo PE en comparación a NE y OB, la expresión de *CAMP* fue mayor en los hombres ( $P < 0.001$  Figura 7).



**Figura 7. Expresión génica de DEF-1 y CAMP en placentas de embarazos normoevolutivos y afectados por obesidad o preeclampsia.** Se muestra la expresión génica relativa de DEF-1 y CAMP analizada mediante qPCR en placentas obtenidas de embarazos normales (NE), con obesidad (OB) y preeclampsia (PE) y se normalizó vs. la expresión del gen GAPDH. Las barras representan, medias de mínimos cuadrados  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs a los subgrupos NE y OB del mismo sexo y frente al subgrupo PE-femenino por Two way ANOVA. \*  $P < 0.05$  vs el subgrupo de sexo opuesto de la misma condición.

#### 8.4 Asociación entre metabolitos de Vitamina D y el perfil de expresión de citocinas inflamatorias y péptidos antimicrobianos.

Se realizaron estudios de asociación entre cada variable, considerando también la expresión de mRNA. Las *Tablas 5 y 6* muestran los grupos y subgrupos donde se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en al menos un caso.

Como se observa en la *Tabla 5*, de las asociaciones estadísticamente diferentes se observó asociación negativa entre la concentración sérica de calcidiol en suero materno de II y III trimestres y la expresión de génica placentaria de *IL-8* en el grupo PE. Esta asociación negativa también fue significativa en las muestras de II trimestre

del grupo NE. Por su parte, la expresión de *TLR-9* se correlacionó negativamente con el calcitriol de suero de cordón umbilical en el grupo OB. Los niveles séricos de calcidiol en suero materno de I trimestre (VD3 I trim) se asociaron negativamente con la expresión de *IL-6* en placenta ( $p = 0.01$ ) solo en el subgrupo OB-F. Al analizar los datos con significado estadístico considerando los subgrupos de sexo del neonato (*Tabla 6*), encontramos correlaciones negativas entre la expresión de *IL-6* placentaria y el calcidiol en suero materno de primer trimestre en el grupo OB-F, así como entre la expresión placentaria de *IL-10* e *IL-8* y el calcidiol de segundo trimestre en el grupo NE-M. Por el contrario, la expresión de *DEFB1* se asoció positivamente con el calcidiol de segundo y tercer trimestre solamente en el subgrupo NE-F.

De manera similar, se observó una correlación positiva significativa entre la concentración sérica de calcidiol en suero materno de III trimestre y la expresión génica de *CAMP* solo en muestras de placenta del subgrupo NE-M.

Finalmente, en lo que respecta al calcitriol en suero de cordón umbilical, se encontró correlación negativa con *TLR-9* solamente en el grupo OB (*Tabla 5*).

Al analizar por sexo del recién nacido, se evidenció correlación positiva entre los niveles de calcitriol en el suero de cordón umbilical y la expresión placentaria de *IL-8* en OB-M ( $P = 0.001$ ) y *DEFB1* en PE-M ( $P = 0.016$ ), Mientras que hubo correlación negativa con *TGF-B1* en el subgrupo OB-F ( $P = 0.03$ ) (*Tabla 6*).

Tabla 5. Correlaciones entre parámetros con al menos un resultado significativo.

Factores correlacionados		Grupos					
		NE-total		OB-total		PE-total	
		r	p	r	p	r	p
VD3 I trim	PAS	<b>-0.417</b>	<b>0.022</b>	0.44	0.051	0.093	0.579
VD3 II trim	<i>IL-8 PL</i>	-0.441	0.019	0.080	0.717	<b>-0.49</b>	<b>0.028</b>
VD3 II trim	PAS	<b>-0.536</b>	<b>0.002</b>	0.122	0.61	0.234	0.174
VD3 II trim	PAD	<b>-0.393</b>	<b>0.035</b>	0.18	0.453	0.014	0.934
VD3 III trim	<i>IL-8 PL</i>	-0.18	0.383	-0.050	0.817	<b>-0.505</b>	<b>0.032</b>
VD3 III trim	PAS	<b>-0.564</b>	<b>0.002</b>	0.117	0.626	0.346	0.052
VD3 III trim	PAD	<b>-0.431</b>	<b>0.025</b>	0.182	0.448	-0.069	0.704
Cal cordón	<i>TLR-9 PL</i>	-0.123	0.582	<b>-0.648</b>	<b>0.020</b>	-0.018	0.946
IMCp	VD3 I trim	-0.263	0.056	-0.187	0.295	<b>-0.446</b>	<b>0.005</b>
IMCp	VD3 II trim	-0.207	0.145	-0.165	0.363	<b>-0.405</b>	<b>0.016</b>

VD3, Calcidiol en suero materno; Trim, trimestre; PL, placenta.; Cal, calcitriol en suero de cordón umbilical. Los genes representados en cursiva indican la expresión de RNAm. Los valores significativos se muestran en negrita.

Tabla 6. Correlaciones entre parámetros con al menos un resultado significativo en los diferentes subgrupos.

Factores correlacionados		Subgrupos											
		NE-M		NE-F		OB-M		OB-F		PE-M		PE-F	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
VD3 I trim	<i>IL-6 PL</i>	-0.2	0.538	0.177	0.514	0.076	0.8	<b>-0.655</b>	<b>0.018</b>	0.4	0.75	0.417	0.243
VD3 I trim	PAS	<b>-0.703</b>	<b>0.000</b>	0.25	0.433	0.438	0.223	0.311	0.339	-0.074	0.754	0.358	0.141
VD3 I trim	PAD	<b>-0.504</b>	<b>0.027</b>	0.153	0.633	0.292	0.407	0.0771	0.818	0.328	0.166	-0.316	0.195
VD3 II trim	<i>IL-10 PL</i>	<b>-0.671</b>	<b>0.015</b>	0.218	0.409	-0.038	0.886	-0.19	0.619	0.4	0.517	0.1	0.755
VD3 II trim	<i>IL-8 PL</i>	<b>-0.753</b>	<b>0.002</b>	0.229	0.403	-0.151	0.603	-0.167	0.643	-0.071	0.839	-0.531	0.070
VD3 II trim	<i>DEF-B1 PL</i>	0.035	0.904	<b>0.554</b>	<b>0.031</b>	-0.154	0.619	0.383	0.285	0.2	0.714	-0.121	0.682
VD3 II trim	PAS	<b>-0.707</b>	<b>0.000</b>	-0.295	0.384	0.238	0.52	0.080	0.811	0.068	0.78	0.421	0.089
VD3 II trim	PAD	<b>-0.557</b>	<b>0.013</b>	0.425	0.199	0.348	0.331	0.088	0.785	0.38	0.116	-0.32	0.203
VD3 III trim	<i>DEF-B1 PL</i>	-0.227	0.484	<b>0.534</b>	<b>0.057</b>	-0.292	0.384	0.442	0.185	0.2	0.714	-0.133	0.667
VD3 III trim	<i>CAMP PL</i>	<b>0.552</b>	<b>0.0391</b>	0.108	0.704	-0.103	0.759	0.00909	0.968	-0.643	0.0956	0.0182	0.946
VD3 III trim	PAS	<b>-0.631</b>	<b>0.004</b>	-0.533	0.124	-0.081	0.839	0.162	0.614	0.458	0.062	0.272	0.319
VD3 III trim	PAD	<b>-0.546</b>	<b>0.018</b>	-0.009	0.948	0.464	0.233	0.048	0.881	0.238	0.351	-0.427	0.107
Cal cordón	<i>TGF-B1 PL</i>	-0.583	0.087	-0.0424	0.892	0.25	0.545	<b>-0.886</b>	<b>0.033</b>	0.829	0.058	0.214	0.602
Cal cordón	<i>IL-8 PL</i>	-0.297	0.384	0.132	0.656	<b>0.85</b>	<b>0.001</b>	0	1	0.464	0.255	-0.714	0.136
Cal cordón	<i>DEF-B1 PL</i>	0.283	0.434	0.168	0.588	0	0.968	-0.371	0.497	<b>0.943</b>	<b>0.016</b>	-0.071	0.843
IMCp	VD3 I trim	<b>-0.56</b>	<b>0.002</b>	0.036	0.861	-0.176	0.476	-0.129	0.639	-0.214	0.373	<b>-0.65</b>	<b>0.003</b>
IMCp	VD3 II trim	-0.38	0.046	0.032	0.88	-0.0744	0.761	-0.185	0.511	-0.384	0.112	<b>-0.586</b>	<b>0.013</b>
IMCp	VD3 III trim	<b>-0.596</b>	<b>0.001</b>	0.082	0.724	0.122	0.64	-0.213	0.453	0.15	0.559	<b>-0.55</b>	<b>0.032</b>

VD3: Calcidiol en suero materno; Trim: trimestre; PL: placenta. Cal: calcitriol en suero de cordón umbilical. Los genes representados en cursiva indican la expresión de RNAm. Los valores significativos se muestran en negrita.

## 9. DISCUSIÓN

Los trastornos hipertensivos del embarazo afectan de manera crítica la morbimortalidad, causando aproximadamente 46,000 muertes maternas y 1.5 a 2 millones de muertes neonatales al año a nivel mundial. La incidencia de estos trastornos ha aumentado considerablemente debido a varios factores, como el aumento de la edad materna, la prevalencia de la obesidad, el uso de técnicas de reproducción asistida y la presencia de comorbilidades médicas como la diabetes, la hipertensión y la enfermedad renal. A pesar de los avances en la comprensión de estos trastornos, su causa aún no se comprende completamente, por ejemplo, la fisiopatología de la PE sigue siendo parcialmente desconocida, destacando el papel de las alteraciones en la invasión del trofoblasto, isquemia placentaria, disfunción endotelial y aumento de la producción de factores vasoconstrictores placentarios [56,98,99]. Sin embargo, mecanismos adicionales pueden participar en la hipertensión relacionada con la PE, incluida la inflamación sistémica mediada por la producción exacerbada de citocinas inflamatorias. En efecto, la PE se asocia con activación inmunitaria crónica, que deriva en la producción aumentada de citocinas inflamatorias por células T y una disminución de citocinas reguladoras y antiinflamatorias, lo que conduce a un estado hiperinflamatorio y al desarrollo de hipertensión [100].

Si bien en un escenario infeccioso estos mediadores inmunitarios se producen para defenderse de agentes invasores, una respuesta exacerbada bajo cualquier circunstancia, incluida las no infecciosas, podría condicionar para un resultado perinatal adverso. Por lo tanto, la placenta ha desarrollado estrategias de retroalimentación reguladoras, como la producción de factores antiinflamatorios, entre los cuales está el calcitriol [101]. Las citocinas inflamatorias y/o LPS aumentan la expresión de *CYP27B1* en la placenta, induciendo la producción de calcitriol [102,103], que a su vez disminuye la inflamación e induce péptidos antimicrobianos [19,21,104]. Además, son bien conocidos los efectos del calcitriol sobre algunos componentes del sistema renina-angiotensina, relacionándolo con la disminución de la presión arterial [105,106].

Se ha descrito que existen niveles disminuidos de calcitriol tanto en OB como PE [65,66]. Acorde, nuestros resultados mostraron una tendencia similar, siendo significativa solo cuando comparamos el total del grupo NE vs. PE, independientemente del sexo, por ANOVA de una vía. Adicionalmente, se observó un patrón de dimorfismo sexual al analizar los niveles de calcitriol en suero de cordón umbilical, encontrando niveles significativamente más bajos en aquellos de sexo masculino pertenecientes a los grupos PE y OB, en comparación a recién nacidos del grupo NE del mismo sexo. Este dato es interesante ya que destaca el dimorfismo sexual que prevalece en el metabolismo de la VD en la placenta, y corrobora que los bebés masculinos son más susceptibles de sufrir deficiencia de VD, con el consecuente impacto en los efectos benéficos derivados de la bioactividad del calcitriol durante el embarazo, como ya se ha descrito anteriormente [32].

Con relación a lo anterior, se ha demostrado previamente que el calcitriol en el suero de cordón umbilical se asoció significativamente con menor presión arterial materna en presencia de infección del tracto urinario. Bajo esta condición infecciosa, tanto la PAS como la PAD se correlacionaron negativamente con los niveles de calcitriol en el suero del cordón umbilical [83]. Los resultados del presente trabajo no encontraron dicha asociación con el calcitriol en la cohorte en estudio, probablemente porque en la población reportada previamente había una condición inflamatoria relacionada con una infección, que como es conocido, aumenta los niveles de calcitriol. En contraste, en este estudio, la condición inflamatoria no se asoció en ningún caso a infección y, de hecho, las concentraciones de calcitriol fueron menores en PE y OB vs. NE, al menos en las muestras de neonatos masculinos. Lo anterior aun considerando que no hubo diferencias significativas entre los niveles de calcidiol materno entre los grupos de estudio, lo que sugiere que las diferencias en las concentraciones de calcitriol en el suero de cordón umbilical dependen de la producción placentaria exclusivamente. Acorde a lo anterior, ya se ha demostrado que las placentas de bebés masculinos tienen menor capacidad de bioconvertir calcidiol en calcitriol, probablemente por el efecto inhibitor de la testosterona asociada al bebé masculino sobre la expresión de

*CYP27B1* y la estimulación de *CYP24A1* [32]. Interesantemente, nuestros resultados sugieren que el calcidiol en la madre gestante puede estar involucrado con la reducción de la presión arterial materna en un embarazo NE sano. De hecho, en embarazos NE, la presión arterial sistólica y diastólica se correlacionó negativamente con los niveles de calcidiol en el suero del cordón umbilical a lo largo de los tres trimestres del embarazo, con altos coeficientes de correlación y significancia estadística. Aunque correlación no implica causalidad, estos resultados respaldan firmemente el papel protector de la suficiencia de VD en el control de la presión arterial materna. Además, analizando los subgrupos por sexo del bebé, se mantuvo la correlación inversa y significativa entre el calcidiol del suero de la madre y la PAS y PAD materna pero solamente en el subgrupo NE masculino, a lo largo de los tres trimestres, lo que sugiere una tendencia dependiente del sexo no relacionada con las condiciones PE y OB. Esta relación sexualmente dimórfica se ha descrito para otros parámetros que pueden estar relacionados con el objeto de estudio de este trabajo, por ejemplo, en la asociación de deficiencia sérica de VD y un mayor riesgo de trastornos cardiometabólicos [107]. Aunado a lo anterior, otros efectos de la VD asociados a su acción cardioprotectora incluyen el efecto vasodilatador debido a la presencia del receptor de vitamina D en los vasos sanguíneos, lo que desempeña un papel esencial en la función de las células endoteliales y el control de la presión arterial [108,109].

La PE es un estado de inflamación crónica caracterizado por la activación de células inmunológicas que contribuyen a la presentación de los síntomas de PE durante el embarazo, a través de la activación tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Este estado inflamatorio prolongado contribuye a la hipertensión, disfunción endotelial y complicaciones fetales. Las células Th1 desempeñan un papel importante en esta respuesta inflamatoria. Son un subtipo de células T, componente del sistema inmunológico adaptativo, y se caracterizan por su capacidad de producir citocinas inflamatorias como IFN-G y TNF-A. La isquemia placentaria y la hipoxia, además, inducen la liberación de factores bioactivos, incluidos los factores proinflamatorios (TNF-A, IL-1B, IL-6, IL-12, IFN-G), que median daños extensos en el endotelio vascular materno y provocan los síntomas

típicos de la PE. Se sabe que los niveles de TNF-A son más altos en el suero materno de embarazos complicados con PE en comparación con embarazos NE, al igual que los niveles de IL-6 e IL-8 [110,111].

Nuestros datos mostraron una mayor expresión placentaria de citocinas pro y anti-inflamatorias, entre ellas, *IL-6*, *TNF-A*, *IL-8*, *TGF-B1* e *IL-10*, en placentas del grupo PE, esto coincide con la información ya publicada [112]. En lo referente a las citocinas anti-inflamatorias, es conocido que la TNF-A aumenta la expresión de *IL-10* como parte de un loop autoregulatorio [113], lo que podría explicar su elevación también en el grupo PE. Congruentemente, niveles incrementados de IL-10 en la PE ya han sido descritos [114]. Además, nuestros resultados muestran diferencias asociadas al sexo del recién nacido, encontrando que tanto citocinas proinflamatorias (*TNF-A*, *IL-6* e *IL-8*) como anti-inflamatorias (*TGF-B1*, *IL-10*) fueron significativamente más altas en hombres del grupo PE.

Estas observaciones podrían explicarse, al menos en parte, debido a la disminución en la biosíntesis placentaria de calcitriol en dicho grupo, como se mencionó anteriormente, ya que uno de los efectos más contundentes del calcitriol en la placenta es su función anti-inflamatoria. En efecto, nuestros resultados mostraron que precisamente en el grupo PE-M hubo menores concentraciones de calcitriol en el suero de cordón umbilical.

Uno de los marcadores de inflamación que llamó nuestra atención fue el *TLR-9*. El TLR-9 puede ser activado por diversos patrones moleculares asociados con daño, incluido el DNA libre, el cual puede ser liberado a la circulación tras la apoptosis o necrosis de los trofoblastos [112]. TLR-9 incrementado también puede ser indicativo de daño endotelial y desenlace adverso del embarazo [115,116]. Previamente ya se ha reportado que *TLR-9* está aumentado en la PE [112,117]; sin embargo, nuestros resultados mostraron que la expresión génica de *TLR-9* también está significativamente incrementado en el grupo OB, sobre todo en las muestras de placentas masculinas. Lo anterior sugiere que las madres obesas que portan fetos masculinos también sufren de daño significativo en sus placentas como

consecuencia de hiperinflamación, lo cual es relevante para su tratamiento oportuno.

Nuestros resultados demuestran que este estado inmunológico diferenciado entre los sexos ocurre de forma similar en embarazos afectados por PE, y que el estado inflamatorio propio de la misma condiciona un aumento de *TNF-A* y otras citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en los varones. Esto indica que puede haber diferencias sexuales en la respuesta inmunológica basal y que estas diferencias podrían influir en el desarrollo y el riesgo de enfermedades en el embarazo. Sin embargo, se requiere más investigación para comprender completamente estos mecanismos y sus implicaciones clínicas.

El catabolismo del calcitriol a través de la enzima *CYP24A1* desempeña un papel fundamental en la regulación de los niveles de calcitriol y otros metabolitos de la vitamina D en el organismo. La actividad de esta enzima permite la degradación y eliminación de calcitriol, lo que mantiene un equilibrio adecuado de vitamina D. Se ha reportado previamente que la expresión de *CYP24A1* se encuentra incrementada en las placentas de embarazos con PE en comparación con NE [118] lo cual coincide con nuestros resultados, al identificar mayor expresión placentaria en PE en comparación a los grupos OB y NE. Además, se observa que esta expresión incrementada en la presencia de PE se mantuvo en placentas obtenidas de neonatos masculinos, en comparación con NE y OB del mismo sexo, lo que sustenta el dimorfismo sexual en el catabolismo del calcitriol en esta condición.

La alta prevalencia de deficiencia de VD3 materna se ha asociado con desenlaces perinatales adversos, como pueden ser las infecciones [4]. Al respecto, los recién nacidos varones tienen niveles séricos de catelicidina en el cordón umbilical más bajos que los neonatos femeninos, lo que se atribuye a la disminución de la expresión placentaria de catelicidina, secundaria a la disminución de la biodisponibilidad del calcitriol, como resultado de una inhibición dependiente de la testosterona de la expresión del gen *CYP27B1* [32]. En nuestro estudio, el grupo PE mostró significativamente aumentada la expresión placentaria de *CAMP* y *DEFB1*, observando además dimorfismo sexual, caracterizado por niveles

significativamente mayores en las muestras de PE de sexo masculino en comparación con aquellas de sexo femenino del mismo grupo. Lo anterior podría estar relacionado con la mayor expresión de *TNF-A*, la cual ha demostrado aumentar la expresión de péptidos antimicrobianos [25] y coincide con nuestros resultados que muestran una correlación positiva y significativa entre *TNF-A* y *CAMP* en placentas del grupo PE. Esto justifica el estudio de la regulación de péptidos antimicrobianos por calcitriol en células de placenta, ya que se ha descrito por ejemplo que *DEFB1* se expresa de manera constitutiva en las células epiteliales del tracto urinario y respiratorio [119], y que la *CAMP* juega un papel fundamental en la modulación de las respuestas inmunológicas innata y adquirida, además de eliminar microorganismos invasivos y promover la reparación de las heridas [120]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos asociados a la regulación de la expresión placentaria de *DEFB1* y *CAMP* en la PE, independientes de los relacionados con la VD. Por otro lado, y acorde a lo ya reportado [32], en el grupo NE femenino hubo mayor expresión placentaria de *CAMP* que en el NE masculino. Esta diferencia asociada al sexo femenino del bebé se observó también el grupo OB. Por lo tanto, es posible que la regulación de *CAMP* dependiente del calcitriol sea la que prevalece en embarazos NE y OB, mientras que, en la PE, donde está reducida la producción placentaria de calcitriol, se activen mecanismos alternativos.

Finalmente, los resultados encontrados en las asociaciones entre factores demostraron que de manera general el calcitriol en suero materno se asoció negativamente con citocinas inflamatorias como la *IL-8* e *IL-6*, mientras que el calcitriol placentario se correlacionó negativamente con el marcador de inflamación *TLR-9* en OB. Estos resultados se encontraron ya sea en un grupo o subgrupo específico, lo cual puede ser consecuente a particularidades del sexo fetal o a la condición, y merece estudios posteriores. Sin embargo, resultan relevantes ya que sugieren que el estado saludable de los niveles de la VD durante el embarazo puede ayudar a disminuir la inflamación y sus consecuencias negativas.

Es posible que algunas de las observaciones de este trabajo estén ligadas al índice de masa corporal pregestacional, ya que tanto el grupo OB como el PE fueron

significativamente diferentes al NE en dicho parámetro, y se conoce que la adiposidad correlaciona negativamente con los niveles de VD, lo que merece la realización de estudios posteriores. Por otro lado, el dimorfismo sexual encontrado en algunos parámetros de este estudio podría explicarse, al menos en parte, por la regulación diferencial de los esteroides sexuales sobre el metabolismo de la vitamina D.

Resulta crucial garantizar niveles maternos adecuados de vitamina D durante el embarazo, con el objetivo de prevenir complicaciones y propiciar una respuesta inmunitaria adecuada en la placenta.

## **10. CONCLUSIONES**

Se encontró que mayores concentraciones de calcidiol en el suero materno se asociaron con menor presión arterial de la madre solo en embarazos normoevolutivos. Esto puede estar relacionado con que en PE y OB existen factores adicionales que aumentan la presión arterial, diferentes de los modulados por el calcitriol en condiciones normales. Por otro lado, el calcidiol y/o el calcitriol se correlacionaron negativamente con marcadores de inflamación y positivamente con péptidos antimicrobianos placentarios en al menos un grupo estudiado, sugiriendo que la VD está relacionada con efectos anti-inflamatorios y de fortalecimiento de la respuesta inmunológica de manera sexualmente dimórfica durante la gestación. De manera general, las correlaciones negativas con marcadores inflamatorios se observaron en los grupos caracterizados por presentar inflamación (OB, PE), mientras que las correlaciones positivas con los péptidos antimicrobianos se encontraron en el grupo control, lo que destaca la importancia de los efectos antiinflamatorios del calcitriol en embarazos con inflamación no infecciosa. Los resultados de este trabajo apoyan la necesidad de monitorear el estado nutricional de la VD durante la gestación, y en caso de ser necesario, suplementar adecuadamente en tiempo y forma para prevenir alteraciones y desenlaces adversos por deficiencia de dicha vitamina.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Norlin, K. Wikvall, Enzymatic activation in vitamin D signaling – Past, present and future, *Arch. Biochem. Biophys.* 742 (2023) 109639. doi:10.1016/J.ABB.2023.109639.
- [2] L. Máčová, M. Bičíková, Vitamin D: Current Challenges between the Laboratory and Clinical Practice, (2021). doi:10.3390/nu13061758.
- [3] G. Wolf, History of Nutrition The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus, (2004). <http://www>. (accessed August 25, 2021).
- [4] A. Olmos-Ortiz, E. Avila, M. Durand-Carbajal, L. Díaz, Regulation of Calcitriol Biosynthesis and Activity: Focus on Gestational Vitamin D Deficiency and Adverse Pregnancy Outcomes, *Nutrients*. 7 (2015) 443. doi:10.3390/NU7010443.
- [5] L.J. Dominguez, M. Farruggia, N. Veronese, M. Barbagallo, D. Santoro, metabolites H OH OH Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment, (2021). doi:10.3390/metabo11040255.
- [6] E. Avila, L. Díaz, D. Barrera, A. Halhali, I. Méndez, L. González, U. Zuegel, A. Steinmeyer, F. Larrea, Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103 (2007) 90–96. doi:10.1016/J.JSBMB.2006.07.010.
- [7] D. LJ, F. M, V. N, B. M, Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment, *Metabolites*. 11 (2021). doi:10.3390/METABO11040255.
- [8] M.F. Holick, N.C. Binkley, H.A. Bischoff-Ferrari, C.M. Gordon, D.A. Hanley, R.P. Heaney, M.H. Murad, C.M. Weaver, Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) 1911–1930. doi:10.1210/JC.2011-0385.
- [9] M. Chávez-Courtois, E. Godínez-Martínez, C. Muñoz-Manrique, V. Negrete-Martínez, C.P. González-Leyva, M. Tolentino-Dolores, B. Suárez-Rico, G. Estrada-Gutierrez, O. Perichart-Perera, Vitamin D Status and Its Determinants in Mexican Pregnant Women from a Rural and an Urban Area: A Comparative Study, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18 (2021) 4571. doi:10.3390/IJERPH18094571.

- [10] O.P. Perera, C.P. González-Leyva, I. González-Ludlow, M. Tolentino-Dolores, M. Solis-Paredes, E. Reyes-Muñoz, H. Borboa-Olivares, M. Sánchez-Martínez, S. Parra-Hernández, E. Monterrubio-Flores, L.S.Y. Arrieta, M. Guzmán-Huerta, G. Estrada-Gutierrez, Vitamin D Deficiency in Mexican Pregnant Women: Is Supplementation with  $\leq 400$  IU/day Enough?, *Nutrients*. 12 (2020) 1–11. doi:10.3390/NU12092517.
- [11] T. Mcaree, B. Jacobs, T. Manickavasagar, S. Sivalokanathan, L. Brennan, P. Bassett, S. Rainbow, M. Blair, Vitamin D deficiency in pregnancy – still a public health issue, *Matern. Child Nutr.* 9 (2013) 23. doi:10.1111/MCN.12014.
- [12] M.F. Holick, Vitamin D Deficiency, <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>. 357 (2007) 266–281. doi:10.1056/NEJMRA070553.
- [13] B.W. Hollis, C.L. Wagner, Vitamin D and pregnancy: Skeletal effects, nonskeletal effects, and birth outcomes, *Calcif. Tissue Int.* 92 (2013) 128–139. doi:10.1007/S00223-012-9607-4/METRICS.
- [14] M. Taheri, A. Baheiraei, A.R. Foroushani, B. Nikmanesh, M. Modarres, Treatment of vitamin D deficiency is an effective method in the elimination of asymptomatic bacterial vaginosis: A placebo-controlled randomized clinical trial, *Indian J. Med. Res.* 141 (2015) 799–806. doi:10.4103/0971-5916.160707.
- [15] S. Fogacci, F. Fogacci, M. Banach, E.D. Michos, A. V. Hernandez, G.Y.H. Lip, M.J. Blaha, P.P. Toth, C. Borghi, A.F.G. Cicero, Vitamin D supplementation and incident preeclampsia: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials, *Clin. Nutr.* 39 (2020) 1742–1752. doi:10.1016/j.clnu.2019.08.015.
- [16] L. Díaz, D. Díaz, I. Sánchez, S. Sánchez, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Identification of a 25-Hydroxyvitamin D3  $1\alpha$ -Hydroxylase Gene Transcription Product in Cultures of Human Syncytiotrophoblast Cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 2543–2549. doi:10.1210/JCEM.85.7.6693.
- [17] A. Tanamura, S. Nomura, O. Kurauchi, T. Furui, S. Mizutani, Y. Tomoda, Purification and Characterization of 1,25(OH) $_2$ D $_3$  Receptor from Human Placenta, *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. 21 (1995) 631–639. doi:10.1111/J.1447-0756.1995.TB00923.X.
- [18] E. Avila, L. Díaz, A. Halhali, F. Larrea, Regulation of 25-hydroxyvitamin D3  $1\alpha$ -hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D3  $24$ -hydroxylase and vitamin D receptor gene

expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90 (2004) 115–119. doi:10.1016/J.JSBMB.2004.03.090.

- [19] A. Olmos-Ortiz, N. Noyola-Martínez, D. Barrera, V. Zaga-Clavellina, E. Avila, A. Halhali, B. Biruete, F. Larrea, L. Díaz, IL-10 inhibits while calcitriol reestablishes placental antimicrobial peptides gene expression, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 148 (2015) 187–193. doi:10.1016/J.JSBMB.2014.07.012.
- [20] L. Díaz, N. Noyola-Martínez, D. Barrera, G. Hernández, E. Avila, A. Halhali, F. Larrea, Calcitriol inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammatory cytokines in human trophoblasts, *J. Reprod. Immunol.* 81 (2009) 17–24. doi:10.1016/J.JRI.2009.02.005.
- [21] N. Liu, A.T. Kaplan, J. Low, L. Nguyen, G.Y. Liu, O. Equils, M. Hewison, Vitamin D Induces Innate Antibacterial Responses in Human Trophoblasts via an Intracrine Pathway, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 398. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.073577.
- [22] A. Halhali, A.G. Figueras, L. Díaz, E. Avila, D. Barrera, G. Hernández, F. Larrea, Effects of calcitriol on calbindins gene expression and lipid peroxidation in human placenta, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121 (2010) 448–451. doi:10.1016/J.JSBMB.2010.03.008.
- [23] D. Barrera, E. Avila, G. Hernández, I. Méndez, L. González, A. Halhali, F. Larrea, A. Morales, L. Díaz, Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts, *Reprod. Biol. Endocrinol.* (2008). doi:10.1186/1477-7827-6-3.
- [24] D. Barrera, E. Avila, G. Hernández, A. Halhali, B. Biruete, F. Larrea, L. Díaz, Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103 (2007) 529–532. doi:10.1016/J.JSBMB.2006.12.097.
- [25] A. Olmos-Ortiz, J. García-Quiroz, A. Halhali, E. Avila, V. Zaga-Clavellina, R. Chavira-Ramírez, R. García-Becerra, F. Caldiño-Soto, F. Larrea, L. Díaz, Negative correlation between testosterone and TNF- $\alpha$  in umbilical cord serum favors a weakened immune milieu in the human male fetoplacental unit, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 186 (2019) 154–160. doi:10.1016/J.JSBMB.2018.10.009.
- [26] J.H. White, Emerging Roles of Vitamin D-Induced Antimicrobial Peptides in Antiviral Innate Immunity, *Nutrients.* 14 (2022). doi:10.3390/NU14020284.

- [27] A. Ismailova, J.H. White, Vitamin D, infections and immunity, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 23 (2022) 265. doi:10.1007/S11154-021-09679-5.
- [28] D. Minns, K.J. Smith, V. Alessandrini, G. Hardisty, L. Melrose, L. Jackson-Jones, A.S. MacDonald, D.J. Davidson, E. Gwyer Findlay, The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation, *Nat. Commun.* 12 (2021). doi:10.1038/S41467-021-21533-5.
- [29] E. L Bishop, A. Ismailova, S. Dimeloe, M. Hewison, J.H. White, Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti- Inflammatory, *JBMR Plus.* 5 (2021). doi:10.1002/JBM4.10405.
- [30] P.T. Liu, S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B.H. Tan, S.R. Krutzik, M.T. Ochoa, J. Schaubert, K. Wu, C. Meinken, D.L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zügel, R.L. Gallo, D. Eisanberg, M. Hewison, B.W. Hollis, J.S. Adams, B.R. Bloom, R.L. Modlin, Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response, *Science* (80-. ). 311 (2006) 1770–1773. doi:10.1126/SCIENCE.1123933/SUPPL\_FILE/LIUP.SOM.PDF.
- [31] R.P. Martinelli, J.M. Rodriguez, L.D. Daurelio, L. Esteban, In silico identification of novel transcription factors associated with CYP27B1 transcriptional regulation in LPS-challenged mononuclear phagocytes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 199 (2020) 105590. doi:10.1016/J.JSBMB.2020.105590.
- [32] A. Olmos-Ortiz, J. García-Quiroz, R. López-Marure, I. González-Curiel, B. Rivas-Santiago, A. Olivares, E. Avila, D. Barrera, A. Halhali, F. Caldiño, F. Larrea, L. Díaz, Evidence of sexual dimorphism in placental vitamin D metabolism: Testosterone inhibits calcitriol-dependent cathelicidin expression, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 163 (2016) 173–182. doi:10.1016/J.JSBMB.2016.05.017.
- [33] J.W. Pike, E. Spanos, K.W. Colston, I. MacIntyre, M.R. Haussler, Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1alpha,25-(OH)2D3 in chicks., <https://doi.org/10.1152/Ajpendo.1978.235.3.E338>. 235 (1978). doi:10.1152/AJPENDO.1978.235.3.E338.
- [34] L.C. Pop, S.A. Shapses, B. Chang, W. Sun, X. Wang, VITAMIN D–BINDING PROTEIN IN HEALTHY PRE- AND POSTMENOPAUSAL WOMEN: RELATIONSHIP WITH ESTRADIOL CONCENTRATIONS, *Endocr. Pract.* 21 (2015) 936.

doi:10.4158/EP15623.OR.

- [35] A. Olmos-Ortiz, A. Olivares-Huerta, J. García-Quiroz, T. Zariñán, R. Chavira, V. Zaga-Clavellina, E. Avila, A. Halhali, M. Durand, F. Larrea, L. Díaz, Placentas associated with female neonates from pregnancies complicated by urinary tract infections have higher cAMP content and cytokines expression than males, *Am. J. Reprod. Immunol.* 86 (2021) e13434. doi:10.1111/AJI.13434.
- [36] T. V. Rohm, D.T. Meier, J.M. Olefsky, M.Y. Donath, Inflammation in Obesity, Diabetes and related Disorders, *Immunity.* 55 (2022) 31. doi:10.1016/J.IMMUNI.2021.12.013.
- [37] M. Obradovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Soskic, M. Essack, S. Arya, A.J. Stewart, T. Gojobori, E.R. Isenovic, Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication, *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 12 (2021). doi:10.3389/FENDO.2021.585887.
- [38] T. Gruber, C. Pan, R.E. Contreras, T. Wiedemann, D.A. Morgan, A.A. Skowronski, S. Lefort, C. De Bernardis Murat, O. Le Thuc, B. Legutko, F.J. Ruiz-Ojeda, M. de la Fuente-Fernández, A.L. García-Villalón, D. González-Hedström, M. Huber, K. Szigeti-Buck, T.D. Müller, S. Ussar, P. Pfluger, S.C. Woods, A. Ertürk, C.A. LeDuc, K. Rahmouni, M. Granado, T.L. Horvath, M.H. Tschöp, C. García-Cáceres, Obesity-associated hyperleptinemia alters the gliovascular interface of the hypothalamus to promote hypertension, *Cell Metab.* 33 (2021) 1155. doi:10.1016/J.CMET.2021.04.007.
- [39] I. of M. and N.R. Council, Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines, (2009). doi:10.17226/12584.
- [40] P.M. Catalano, K. Shankar, Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child, *BMJ.* 356 (2017). doi:10.1136/BMJ.J1.
- [41] F. Reveles, R. Reyes, A. Tlapale Vázquez Diseño formación, J. Pablo Luna, A. Montiel, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales, (n.d.).
- [42] M. Ancira-Moreno, F. Vadillo-Ortega, J.Á. Rivera-Dommarco, B.N. Sánchez, J. Pasteris, C. Batis, M. Castillo-Castrejón, M.S. O'Neill, Gestational weight gain trajectories over pregnancy and their association with maternal diet quality: Results from the PRINCESA cohort., *Nutrition.* 65 (2019) 158.

doi:10.1016/J.NUT.2019.02.002.

- [43] H. Dutton, S.J. Borengasser, L.M. Gaudet, L.A. Barbour, E.J. Keely, Obesity in Pregnancy – Optimizing outcomes for mom and baby, *Med. Clin. North Am.* 102 (2018) 87. doi:10.1016/J.MCNA.2017.08.008.
- [44] N. Shrestha, H.C. Ezechukwu, O.J. Holland, D.H. Hryciw, Developmental programming of peripheral diseases in offspring exposed to maternal obesity during pregnancy, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 319 (2020) R507–R516. doi:10.1152/AJPREGU.00214.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJ-AREG200004F001.JPEG.
- [45] L.E. St-Germain, B. Castellana, J. Baltayeva, A.G. Beristain, Maternal Obesity and the Uterine Immune Cell Landscape: The Shaping Role of Inflammation, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). doi:10.3390/IJMS21113776.
- [46] J. Saben, F. Lindsey, Y. Zhong, K. Thakali, T.M. Badger, A. Andres, H. Gomez-Acevedo, K. Shankar, Maternal Obesity is Associated with a Lipotoxic Placental Environment, *Placenta.* 35 (2014) 171. doi:10.1016/J.PLACENTA.2014.01.003.
- [47] N.S. Kalupahana, N. Moustaid-Moussa, The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance, *Obes. Rev.* 13 (2012) 136–149. doi:10.1111/J.1467-789X.2011.00942.X.
- [48] G.C. Cerri, D. Motta-Santos, J.M.O. Andrade, L.F. de Rezende, R.A.S. dos Santos, S.H.S. Santos, Maternal obesity modulates both the renin–angiotensin system in mice dams and fetal adiposity, *J. Nutr. Biochem.* 84 (2020) 108413. doi:10.1016/J.JNUTBIO.2020.108413.
- [49] S. Tamanna, E.R. Lumbers, S.K. Morosin, S.J. Delforce, K.G. Pringle, ACE2: a key modulator of the renin-angiotensin system and pregnancy, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 321 (2021) R833. doi:10.1152/AJPREGU.00211.2021.
- [50] M. Pereira-Santos, P.R.F. Costa, A.M.O. Assis, C.A.S.T. Santos, D.B. Santos, Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis, *Obes. Rev.* 16 (2015) 341–349. doi:10.1111/OBR.12239.
- [51] L.K. Pourshahidi, Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions, *Proc. Nutr. Soc.* 74 (2015) 115–124. doi:10.1017/S0029665114001578.

- [52] S. Vanlint, Vitamin D and Obesity, *Nutrients*. 5 (2013) 949. doi:10.3390/NU5030949.
- [53] A.T. Drincic, L.A.G. Armas, E.E. Van Diest, R.P. Heaney, Volumetric Dilution, Rather Than Sequestration Best Explains the Low Vitamin D Status of Obesity, *Obesity*. 20 (2012) 1444–1448. doi:10.1038/OBY.2011.404.
- [54] M.L.W. Kinshella, S. Omar, K. Scherbinsky, M. Vidler, L.A. Magee, P. Von Dadelszen, S.E. Moore, R. Elango, Maternal Dietary Patterns and Pregnancy Hypertension in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis, *Adv. Nutr.* 12 (2021) 2387. doi:10.1093/ADVANCES/NMAB057.
- [55] L. Duley, The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia, *Semin. Perinatol.* 33 (2009) 130–137. doi:10.1053/J.SEMPERI.2009.02.010.
- [56] D. Vaiman, Genes, epigenetics and miRNA regulation in the placenta, *Placenta*. 52 (2017) 127–133. doi:10.1016/j.placenta.2016.12.026.
- [57] L.A. Magee, M.A. Brown, D.R. Hall, S. Gupte, A. Hennessy, S.A. Karumanchi, L.C. Kenny, F. McCarthy, J. Myers, L.C. Poon, S. Rana, S. Saito, A.C. Staff, E. Tsigas, P. von Dadelszen, The 2021 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification, diagnosis & management recommendations for international practice, *Pregnancy Hypertens.* 27 (2022) 148–169. doi:10.1016/J.PREGHY.2021.09.008.
- [58] A. Ozeki, K. Tani, H. Takahashi, H. Suzuki, S. Nagayama, C. Hirashima, H. Iwata, T. Kuwayama, A. Ohkuchi, K. Shirasuna, Preeclamptic patient-derived circulating cell-free DNA activates the production of inflammatory cytokines via toll-like receptor 9 signalling in the human placenta, *J. Hypertens.* 37 (2019) 2452–2460. doi:10.1097/HJH.0000000000002208.
- [59] P. Murthi, A.A. Pinar, E. Dimitriadis, C.S. Samuel, Inflammasomes—A Molecular Link for Altered Immunoregulation and Inflammation Mediated Vascular Dysfunction in Preeclampsia, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). doi:10.3390/IJMS21041406.
- [60] T. Garrido-Gó Mez, N. Castillo-Marco, T. Cordero, C. Simó, Decidualization resistance in the origin of preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 226 (2022) S886–S894. doi:10.1016/j.ajog.2020.09.039.
- [61] S.K. Gupta, S.S. Malhotra, A. Malik, S. Verma, P. Chaudhary, Cell Signaling

Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells, *Am. J. Reprod. Immunol.* 75 (2016) 361–371. doi:10.1111/aji.12436.

- [62] H.R. Kohan-Ghadr, L. Kadam, C. Jain, D.R. Armant, S. Drewlo, Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta, *Cell Adhes. Migr.* 10 (2016) 126–135. doi:10.1080/19336918.2015.1098800.
- [63] P. Gathiram, J. Moodley, Pre-eclampsia: Its pathogenesis and pathophysiology, *Cardiovasc. J. Afr.* 27 (2016) 71–78. doi:10.5830/CVJA-2016-009.
- [64] J.L. Mansur, B. Oliveri, E. Giacoia, D. Fusaro, P.R. Costanzo, Vitamin D: Before, during and after Pregnancy: Effect on Neonates and Children, *Nutrients.* 14 (2022). doi:10.3390/NU14091900.
- [65] A. Halhali, A.R. Tovar, N. Torres, H. Bourges, M. Garabedian, F. Larrea, Preeclampsia Is Associated with Low Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factor I and 1,25-Dihydroxyvitamin D in Maternal and Umbilical Cord Compartments, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 1828–1833. doi:10.1210/JCEM.85.5.6528.
- [66] A. Halhali, L. Díaz, D. Barrera, E. Avila, F. Larrea, Placental calcitriol synthesis and IGF-I levels in normal and preeclamptic pregnancies, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 (2014) 44–49. doi:10.1016/J.JSBMB.2013.12.014.
- [67] L. Di´az, D. Di´az, C. Arranz, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Expression and Activity of 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase Are Restricted in Cultures of Human Syncytiotrophoblast Cells from Preeclamptic Pregnancies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 3876–3882. doi:10.1210/JCEM.87.8.8730.
- [68] H. Saei, A. Govahi, A. Abiri, M. Eghbali, M. Abiri, Comprehensive transcriptome mining identified the gene expression signature and differentially regulated pathways of the late-onset preeclampsia, *Pregnancy Hypertens.* 25 (2021) 91–102. doi:10.1016/J.PREGHY.2021.05.007.
- [69] L.M. Bodnar, J.M. Catov, H.N. Simhan, M.F. Holick, R.W. Powers, J.M. Roberts, Maternal Vitamin D Deficiency Increases the Risk of Preeclampsia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (2007) 3517. doi:10.1210/JC.2007-0718.
- [70] L.M. Bodnar, H.N. Simhan, J.M. Catov, J.M. Roberts, R.W. Platt, J.C. Diesel, M.A.

Klebanoff, Maternal vitamin D status and the risk of mild and severe preeclampsia, *Epidemiology*. 25 (2014) 207. doi:10.1097/EDE.000000000000039.

- [71] S. Akbari, B. Khodadadi, S. Amir, Y. Ahmadi, S. Abbaszadeh, F. Shahsavari, Association of vitamin D level and vitamin D deficiency with risk of preeclampsia: A systematic review and updated meta-analysis, (2018). doi:10.1016/j.tjog.2018.02.013.
- [72] M. Tabesh, A. Salehi-Abargouei, M. Tabesh, A. Esmailzadeh, Maternal Vitamin D Status and Risk of Pre-Eclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) 3165–3173. doi:10.1210/JC.2013-1257.
- [73] J. Nema, N. Wadhvani, K. Randhir, K. Dangat, H. Pisal, V. Kadam, S. Mehendale, G. Wagh, B. Kulkarni, H.S. Sachdev, C. Fall, S. Gupte, S. Joshi, Association of maternal vitamin D status with the risk of preeclampsia, *Food Funct.* 14 (2023). doi:10.1039/D3FO00007A.
- [74] D.D. Shi, Y. Wang, J.J. Guo, L. Zhou, N. Wang, Vitamin D Enhances Efficacy of Oral Nifedipine in Treating Preeclampsia with Severe Features: A Double Blinded, Placebo-Controlled and Randomized Clinical Trial, *Front. Pharmacol.* 8 (2017). doi:10.3389/FPHAR.2017.00865.
- [75] N. Noyola-Martínez, L. Díaz, E. Avila, A. Halhali, F. Larrea, D. Barrera, Calcitriol downregulates TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women, *Cytokine*. 61 (2013) 245–250. doi:10.1016/J.CYTO.2012.10.001.
- [76] Y. Cao, X. Jia, Y. Huang, J. Wang, C. Lu, X. Yuan, J. Xu, H. Zhu, Vitamin D stimulates miR-26b-5p to inhibit placental COX-2 expression in preeclampsia, *Sci. Reports* |. 11 (123AD) 11168. doi:10.1038/s41598-021-90605-9.
- [77] M.C. Myrta, T. de L.T. Cavalcante, M.L. Assunção, N.B. Bueno, Association between maternal or cord blood concentrations of 25-hydroxycholecalciferol or vitamin D supplementation during pregnancy and the cytokines profile in the umbilical cord blood: Systematic literature review, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 203 (2020) 105739. doi:10.1016/J.JSBMB.2020.105739.
- [78] Y.C. Li, J. Kong, M. Wei, Z.-F. Chen, S.Q. Liu, L.-P. Cao, 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system, *J. Clin. Invest.* 110

(2002) 229. doi:10.1172/JCI15219.

- [79] M.L. Xu, X.J. Yu, J.Q. Zhao, Y. Du, W.J. Xia, Q. Su, M.M. Du, Q. Yang, J. Qi, Y. Li, S.W. Zhou, G.Q. Zhu, H.B. Li, Y.M. Kang, Calcitriol ameliorated autonomic dysfunction and hypertension by down-regulating inflammation and oxidative stress in the paraventricular nucleus of SHR, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 394 (2020) 114950. doi:10.1016/J.TAAP.2020.114950.
- [80] K.A. Sauder, A. V. Stamatoiu, E. Leshchinskaya, B.M. Ringham, D.H. Glueck, D. Dabelea, Cord Blood Vitamin D Levels and Early Childhood Blood Pressure: The Healthy Start Study, *J. Am. Hear. Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* 8 (2019). doi:10.1161/JAHA.118.011485.
- [81] T.K. Gray, G.E. Lester, R.S. Lorenc, Evidence for Extra-Renal 1  $\alpha$ -Hydroxylation of 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Pregnancy, *Science* (80- ). 204 (1979) 1311–1313. doi:10.1126/SCIENCE.451538.
- [82] H. Park, M.R. Wood, O. V. Malysheva, S. Jones, S. Mehta, P.M. Brannon, M.A. Caudill, Placental vitamin D metabolism and its associations with circulating vitamin D metabolites in pregnant women, *Am. J. Clin. Nutr.* 106 (2017) 1439. doi:10.3945/AJCN.117.153429.
- [83] A. Olmos-Ortiz, A. Olivares-Huerta, J. García-Quiroz, E. Avila, A. Halhali, B. Quesada-Reyna, F. Larrea, V. Zaga-Clavellina, L. Díaz, Cord Serum Calcitriol Inversely Correlates with Maternal Blood Pressure in Urinary Tract Infection-Affected Pregnancies: Sex-Dependent Immune Implications, *Nutrients.* 13 (2021). doi:10.3390/NU13093114.
- [84] L.M.G. Meems, H. Mahmud, H. Buikema, J. Tost, S. Michel, J. Takens, R.N. Verkaik-Schakel, I. Vreeswijk-Baudoin, I. V. Mateo-Leach, P. van Der Harst, T. Plösch, R.A. de Boer, Parental vitamin d deficiency during pregnancy is associated with increased blood pressure in offspring via panx1 hypermethylation, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 311 (2016) H1459–H1469. doi:10.1152/AJPHEART.00141.2016/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40171621130008 .JPEG.
- [85] A. Pineda, S.L. Verdin-Terán, A. Camacho, L. Moreno-Fierros, Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 Is Increased in Placentas from Patients

with Preeclampsia, Arch. Med. Res. 42 (2011) 382–391. doi:10.1016/J.ARCMED.2011.08.003.

- [86] L.J. Dickie, L.D. Church, L.R. Coulthard, R.J. Mathews, P. Emery, M.F. McDermott, Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes, Rheumatology. 49 (2010) 1466–1471. doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEQ124.
- [87] S.L. Klein, The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior, Neurosci. Biobehav. Rev. 24 (2000) 627–638. doi:10.1016/S0149-7634(00)00027-0.
- [88] T. Paavonen, L.C. Andersson, H. Adlercreutz, Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures, J. Exp. Med. 154 (1981) 1935. doi:10.1084/JEM.154.6.1935.
- [89] J.A. Rettew, Y.M. Huet-Hudson, I. Marriott, Testosterone Reduces Macrophage Expression in the Mouse of Toll-Like Receptor 4, a Trigger for Inflammation and Innate Immunity, Biol. Reprod. 78 (2008) 432–437. doi:10.1095/BIOLREPROD.107.063545.
- [90] V.L. Clifton, Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival, Placenta. 31 (2010) S33–S39. doi:10.1016/J.PLACENTA.2009.11.010.
- [91] L.J. Vatten, R. Skjærven, Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation, Early Hum. Dev. 76 (2004) 47–54. doi:10.1016/J.EARLHUMDEV.2003.10.006.
- [92] R.L. Goldenberg, W.W. Andrews, O.M. Faye-Petersen, A.R. Goepfert, S.P. Cliver, J.C. Hauth, The Alabama Preterm Birth Study: Intrauterine infection and placental histologic findings in preterm births of males and females less than 32 weeks, Am. J. Obstet. Gynecol. 195 (2006) 1533–1537. doi:10.1016/j.ajog.2006.05.023.
- [93] J.C. Souberbielle, E. Cavalier, P. Delanaye, C. Massart, S. Brailly-Tabard, C. Cormier, D. Borderie, A. Benachi, P. Chanson, Serum calcitriol concentrations measured with a new direct automated assay in a large population of adult healthy subjects and in various clinical situations, Clin. Chim. Acta. 451 (2015) 149–153.

doi:10.1016/J.CCA.2015.09.021.

- [94] Z.M. Ibrahim, E.A. Kishk, M.S. Elzamlout, A.M. Elshahat, O.T. Taha, Fetal gender, serum human chorionic gonadotropin, and testosterone in women with preeclampsia, <https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1765174>. 39 (2020) 302–307. doi:10.1080/10641955.2020.1765174.
- [95] J. Challis, J. Newnham, F. Petraglia, M. Yeganegi, A. Bocking, Fetal sex and preterm birth, *Placenta*. 34 (2013) 95–99. doi:10.1016/J.PLACENTA.2012.11.007.
- [96] T.-T. Wang, F.P. Nestel, V. Bourdeau, Y. Nagai, Q. Wang, J. Liao, L. Tavera-Mendoza, R. Lin, J.W. Hanrahan, S. Mader, J.H. White, Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression, *J. Immunol.* 173 (2004) 2909–2912. doi:10.4049/JIMMUNOL.173.5.2909.
- [97] Y. Agudelo-Zapata, L.M. Maldonado-Acosta, H.F. Sandoval-Alzate, N.E. Poveda, M.F. Garcés, J.A. Cortés-Vásquez, A.F. Linares-Vaca, C.A. Mancera-Rodríguez, S.A. Perea-Ariza, K.Y. Ramírez-Iriarte, C.A. Castro-Saldarriaga, J.M. Arteaga-Díaz, R. Franco-Vega, E. Ángel-Müller, A.J. Parada-Baños, J.E. Caminos, Serum 25-hydroxyvitamin D levels throughout pregnancy: a longitudinal study in healthy and preeclamptic pregnant women, *Endocr. Connect.* 7 (2018) 698–707. doi:10.1530/EC-18-0055.
- [98] P. von Dadelszen, L.A. Magee, Preventing deaths due to the hypertensive disorders of pregnancy, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 36 (2016) 83–102. doi:10.1016/J.BPOBGYN.2016.05.005.
- [99] L.W. Leaphart, D.B. Byck, X. Zhu, S. Jiang, Implications for the Pathogenesis of Preeclampsia, 73 (2017) 365–376. doi:10.1007/s00018-015-2069-x.Morphological.
- [100] A.C. Harmon, D.C. Cornelius, L.M. Amaral, J.L. Faulkner, M.W. Cunningham, K. Wallace, B. LaMarca, The role of inflammation in the pathology of preeclampsia, *Clin. Sci. (Lond)*. 130 (2016) 409–419. doi:10.1042/CS20150702.
- [101] M.L. Matias, M. Romao-Veiga, V.R. Ribeiro, P.R. Nunes, V.J. Gomes, A.C. Devides, V.T. Borges, G.G. Romagnoli, J.C. Peracoli, M.T. Peracoli, Progesterone and vitamin D downregulate the activation of the NLRP1/NLRP3 inflammasomes and TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B pathway in monocytes from pregnant women with preeclampsia, *J. Reprod. Immunol.* 144 (2021) 103286. doi:10.1016/J.JRI.2021.103286.

- [102] A. Olmos-Ortiz, J. García-Quiroz, E. Avila, F. Caldiño-Soto, A. Halhali, F. Larrea, L. Díaz, Lipopolysaccharide and cAMP modify placental calcitriol biosynthesis reducing antimicrobial peptides gene expression, *Am. J. Reprod. Immunol.* 79 (2018). doi:10.1111/AJI.12841.
- [103] N. Noyola-Martínez, L. Díaz, V. Zaga-Clavellina, E. Avila, A. Halhali, F. Larrea, D. Barrera, Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 gene expression by recombinant pro-inflammatory cytokines in cultured human trophoblasts, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 Pt A (2014) 106–109. doi:10.1016/J.JSBMB.2013.12.007.
- [104] L. Díaz, N. Noyola-Martínez, D. Barrera, G. Hernández, E. Avila, A. Halhali, F. Larrea, Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts, *J. Reprod. Immunol.* 81 (2009) 17–24. doi:10.1016/J.JRI.2009.02.005.
- [105] Z. Suo, Y. Liu, Y. Li, C. Xu, Y. Liu, M. Gao, J. Dong, Calcitriol inhibits COX-1 and COX-2 expressions of renal vasculature in hypertension: Reactive oxygen species involved?, <https://doi.org/10.1080/10641963.2020.1817473>. 43 (2020) 91–100. doi:10.1080/10641963.2020.1817473.
- [106] V. Singh, A.K. Misra, M. Singh, B. Kumar, N.K. Midha, S. Ambwani, A prospective, cross-sectional study on association of serum vitamin D level with musculoskeletal symptoms and blood pressure in adult population, *J. Fam. Med. Prim. Care.* 9 (2020) 1628. doi:10.4103/JFMPC.JFMPC\_872\_19.
- [107] D.K. Sanghera, B.R. Sapkota, C.E. Aston, P.R. Blackett, Vitamin D Status, Gender Differences, and Cardiometabolic Health Disparities, *Ann. Nutr. Metab.* 70 (2017) 79–87. doi:10.1159/000458765.
- [108] X. Jia, Y. Gu, L.J. Groome, M. Al-Kofahi, J.S. Alexander, W. Li, Y. Wang, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Induces Placental Vascular Smooth Muscle Cell Relaxation by Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1Ser507: Potential Beneficial Effects of Vitamin D on Placental Vasculature in Humans, *Biol. Reprod.* 94 (2016). doi:10.1095/BIOLREPROD.116.138362.
- [109] N. Latic, R.G. Erben, Vitamin D and Cardiovascular Disease, with Emphasis on Hypertension, Atherosclerosis, and Heart Failure, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–15. doi:10.3390/IJMS21186483.
- [110] O. Herrock, E. Deer, B. LaMarca, Setting a stage: Inflammation during preeclampsia

and postpartum, *Front. Physiol.* 14 (2023) 1130116. doi:10.3389/FPHYS.2023.1130116/BIBTEX.

- [111] A. Szarka, J. Rigó, L. Lázár, G. Beko, A. Molvarec, Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array, *BMC Immunol.* 11 (2010) 59. doi:10.1186/1471-2172-11-59.
- [112] H.Q. Lu, R. Hu, The role of immunity in the pathogenesis and development of preeclampsia, *Scand. J. Immunol.* 90 (2019) e12756. doi:10.1111/SJI.12756.
- [113] M. Siwetz, A. Blaschitz, A. El-Heliebi, U. Hiden, G. Desoye, B. Huppertz, M. Gauster, TNF- $\alpha$  alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta, *Lab. Invest.* 96 (2016) 428–438. doi:10.1038/LABINVEST.2015.159.
- [114] B.K. Rinehart, D.A. Terrone, S. Lagoo-Deenadayalan, W.H. Barber, E.A. Hale, J.N. Martin, W.A. Bennett, Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$ , and interleukin 10 is increased in preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181 (1999) 915–920. doi:10.1016/S0002-9378(99)70325-X.
- [115] S. Goulopoulou, T. Matsumoto, G.F. Bomfim, R.C. Webb, Toll-like receptor 9 activation: a novel mechanism linking placenta-derived mitochondrial DNA and vascular dysfunction in pre-eclampsia, *Clin. Sci. (Lond).* 123 (2012) 429–435. doi:10.1042/CS20120130.
- [116] A. Scharfe-Nugent, S.C. Corr, S.B. Carpenter, L. Keogh, B. Doyle, C. Martin, K.A. Fitzgerald, S. Daly, J.J. O’Leary, L.A.J. O’Neill, TLR9 Provokes Inflammation in Response to Fetal DNA: Mechanism for Fetal Loss in Preterm Birth and Preeclampsia, *J. Immunol.* 188 (2012) 5706–5712. doi:10.4049/JIMMUNOL.1103454.
- [117] B. Vlková, J. Turňa, P. Celec, Fetal DNA in maternal plasma in preeclamptic pregnancies, <https://doi.org/10.3109/10641955.2014.954722>. 34 (2015) 36–49. doi:10.3109/10641955.2014.954722.
- [118] R. Ma, Y. Gu, S. Zhao, J. Sun, L.J. Groome, Y. Wang, Expressions of vitamin D metabolic components VDBP, CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1, and VDR in placentas from normal and preeclamptic pregnancies, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 303 (2012) E928. doi:10.1152/AJPENDO.00279.2012.

- [119] R. Bals, Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection, *Respir. Res.* 1 (2000) 141. doi:10.1186/RR25.
- [120] S. Lee, I. Yoo, J. Han, H. Ka, Antimicrobial peptides cathelicidin, PMAP23, and PMAP37: Expression in the endometrium throughout the estrous cycle and at the maternal-conceptus interface during pregnancy and regulation by steroid hormones and calcitriol in pigs, *Theriogenology*. 160 (2021) 1–9. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.10.034.

**Anexo I. Hoja de registro de datos clínicos de los participantes al momento de la resolución del embarazo.**

Parámetros maternos	NE		PE		OB	
	NE-F	NE-M	PE-F	PE-M	PE-F	PE-M
IMCp (Kg/m <sup>2</sup> )						
SDG						
PAS (mm Hg)						
PAD (mm Hg)						
Parámetros del neonato	NE		PE		OB	
	NE-F	NE-M	PE-F	PE-M	PE-F	PE-M
Sexo (F o M)						
Peso (g)						
Talla (cm)						
PC (cm)						
Apgar (1 min)						
Apgar (5 min)						

IMCp = Índice de masa corporal pregestacional; F= femenino; M= masculino; Kg= Kilogramo; g= gramos; mm Hg = milímetro de mercurio; NE = Embarazo Normal, PE = Preeclampsia, OB = Obesidad, PAS= presión arterial sistólica, PAD = presión arterial diastólica; PC = Perímetro cefálico; SDG = Semanas de gestación.

Vo. Bo.



**Dra. Andrea Guadalupe Olmos Ortiz**  
**ICM C. SNI-1**  
**Departamento de Inmunobioquímica**  
**Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de**  
**los Reyes**

Vo. Bo.



**Dra. Lorenza Díaz Nieto**  
**ICM E. SNI-3**  
**Departamento de Biología de la Reproducción**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición**  
**Salvador Zubirán**