



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

**Influencia de la edad materna avanzada sobre
los hábitos alimentarios en la gestación, la
programación metabólica placentaria y la
microbiota materno-neonatal.**

María Puche Juárez

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Fisiología

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”

Directores:

Javier Díaz Castro

Jorge Moreno Fernández

Tesis Doctoral Internacional, 2025



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Doctoral Program in Nutrition and Food Technology

**Influence of advanced maternal age on
gestational dietary habits, placental metabolic
programming and maternal-neonatal
microbiota.**

María Puche Juárez

FACULTY OF PHARMACY

Department of Physiology

Nutrition and Food Technology Institute “José Mataix Verdú”

Supervisors:

Javier Díaz Castro

Jorge Moreno Fernández

International Ph.D. Thesis, 2025

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Puche Juárez
ISBN: 978-84-1195-889-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/108117>



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del
Proyecto de Investigación financiado por la Junta de
Andalucía Ref. P21_00040.

Proyectos de Investigación de Excelencia.

D. Javier Díaz Castro

*Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de
Fisiología de la Universidad de Granada*

Informa:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral titulada: `` **Influencia de la edad materna avanzada sobre los hábitos alimentarios en la gestación, la programación metabólica placentaria y la microbiota materno-neonatal**´´, que presenta la Graduada D^a. María Puche Juárez al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, han sido realizados bajo mi dirección durante los años 2021-2025, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que la hacen merecedora al Título de Doctor, siempre y cuando, así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Prof. Dr. D. Javier Díaz Castro

En Granada, 25 de abril de 2025

D. Jorge Moreno Fernández

*Profesor Permanente Laboral de Universidad adscrito al
Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada*

Informa:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral titulada: `` **Influencia de la edad materna avanzada sobre los hábitos alimentarios en la gestación, la programación metabólica placentaria y la microbiota materno-neonatal**´´, que presenta la Graduada D^a. María Puche Juárez al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, han sido realizados bajo mi dirección durante los años 2021-2025, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que la hacen merecedora al Título de Doctor, siempre y cuando, así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Prof. Dr. D. Jorge Moreno Fernández

En Granada, 25 de abril de 2025

La doctoranda D^a. María Puche Juárez y los directores de la Tesis D. Javier Díaz Castro y D. Jorge Moreno Fernández, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada a 25 de abril de 2025

Directores de la Tesis Doctoral

Prof. Dr.

D. Javier Díaz Castro

Prof. Dr.

D. Jorge Moreno Fernández

Doctoranda

D^a. María Puche Juárez

Tesis Doctoral Internacional

La presente memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo bajo la concesión de un Contrato de Investigación con cargo a Proyecto Proyecto de Investigación de Excelencia financiado por la Junta de Andalucía (Ref. P21_00040). El trabajo experimental de ha realizado en el Departamento de Fisiología y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos ``José Mataix Verdú`` de la Universidad de Granada (Granada, España), así como en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Oxford (Oxford, Reino Unido), gracias a la obtención de una beca predoctoral para la movilidad internacional durante tres meses.

International Ph.D. Thesis

The present PhD Thesis report has been carried out under a Research Contract granted by an Excellence Research Project funded by the Junta de Andalucía (Ref. P21_00040). The experimental work has been carried out at the Department of Physiology and at the Institute of Nutrition and Food Technology ``José Mataix Verdú`` of the University of Granada (Granada, Spain), as well as at the Department of Pharmacology of the University of Oxford (Oxford, United Kingdom), thanks to the award of a pre-doctoral grant for international mobility for three months.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	9
1. RESUMEN.....	12
SUMMARY	17
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	22
2.1. El embarazo.....	22
2.1.1. Concepto.....	22
2.1.2. Cambios fisiológicos durante el embarazo.....	22
2.1.2.1. Cambios en el sistema endocrino	23
2.1.2.2. Cambios en el metabolismo	24
2.1.2.3. Cambios en el tejido adiposo.....	24
2.1.2.4. Cambios en el sistema cardiovascular.....	24
2.1.2.5. Cambios en el sistema respiratorio.....	25
2.2. Edad materna avanzada.....	25
2.2.1. Concepto, causas y prevalencia.....	25
2.3. La placenta	27
2.3.1. Desarrollo placentario	27
2.3.2. La placenta como órgano endocrino	29
2.3.2.1. Adipoquinas	29
2.3.3. Principales transportadores placentarios de nutrientes.....	34
2.4. Nutrición en el embarazo	36
2.4.1. Necesidades nutricionales durante el embarazo	36
2.4.1.1. Macronutrientes.....	37
2.4.1.1.1. Hidratos de carbono y fibra.....	37
2.4.1.1.2. Proteínas.....	37
2.4.1.1.3. Lípidos.....	38
2.4.1.2. Micronutrientes	39
2.4.1.2.1. Vitaminas	39
2.4.1.2.2. Minerales.....	40
2.4.1.3. Polifenoles.....	41
2.5. Microbiota intestinal y embarazo.....	44
2.5.1. Concepto de microbiota y generalidades.....	44
2.5.2. Funciones de la microbiota intestinal.....	45
2.5.2.1. Barrera y protección	45
2.5.2.2. Metabólica.....	46

2.5.2.3.	Modulación del sistema inmunitario	46
2.5.2.4.	Influencia neuropsicológica	47
2.5.3.	Cambio de la microbiota durante el embarazo.....	47
2.6.	Programación metabólica temprana	48
2.6.1.	Programación placentaria.....	50
2.6.2.	Programación nutricional	50
2.6.3.	Programación mediada por la microbiota	51
2.6.4.	La edad materna como condicionante en la programación fetal	51
3.	HIPÓTESIS	53
4.	OBJETIVOS	54
5.	Material y Métodos	55
5.1.	Captación.....	55
5.2.	Recogida de muestras.....	57
5.2.1.	Primera fase.....	57
5.2.1.1.	Datos maternos.....	57
5.2.1.2.	Extracción de sangre	57
5.2.1.3.	Muestras fecales	57
5.2.2.	Segunda fase.....	58
5.2.2.1.	Datos del parto y del neonato	58
5.2.2.2.	Muestras de placenta	58
5.2.2.3.	Extracción de sangre	58
5.2.2.4.	Muestras fecales	59
5.3.	Evaluación nutricional.....	59
5.4.	Procesado de las muestras biológicas.....	60
5.4.1.	Aislamiento de ARN	60
5.4.2.	Extracción de proteínas	62
5.5.	Determinación del perfil de adipocinas en placenta	62
5.5.1.	Determinación de adipocinas mediante Bio-Plex	62
5.5.2.	Determinación de Irisina mediante enzimoinmunoensayo	63
5.6.	Retrotranscripción y Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	63
5.6.1.	Retrotranscripción	63
5.6.2.	Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	64
5.7.	Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot	66
5.8.	Análisis de la composición microbiológica fecal.....	68
5.9.	Procesado y elaboración de figuras.....	69
5.10.	Análisis estadístico	69
5.10.1.	Caracterización de la población	69

5.10.2.	Análisis nutricional	69
5.10.3.	Análisis de datos del perfil de adipoquinas, expresión génica y expresión proteica placentaria	70
5.10.4.	Análisis estadístico de resultados de microbiota	70
5.10.4.1.	Preprocesamiento de las secuencias con DADA2	71
5.10.4.2.	Identificación taxonómica y análisis de diversidad	71
5.10.4.3.	Detección de valores atípicos y visualización	72
5.10.4.4.	Filtrado de especies raras y normalización de datos	72
6.	RESULTADOS	73
6.1.	Características de la población de estudio	73
6.2.	Análisis nutricional	74
6.2.1.	Comparativa nutricional por grupos de alimentos	74
6.2.2.	Ingesta media de nutrientes	75
6.2.3.	Ingesta media de polifenoles	77
6.2.4.	Comparación de las ingestas medias de nutrientes con los valores dietéticos de referencia para población de embarazadas en España	79
6.2.5.	Correlación entre la ingesta dietética de nutrientes y las medidas antropométricas del recién nacido	79
6.2.5.1.	Macronutrientes e ingesta total de energía	79
6.2.5.2.	Minerales	80
6.2.5.3.	Vitaminas	80
6.2.6.	Modelo de regresión para las asociaciones entre la ingesta de nutrientes y las medidas antropométricas de los recién nacidos	81
6.3.	Perfil de adipoquinas placentarias	83
6.3.1.	Perfil de adipoquinas placentarias divididas por el sexo del recién nacido	84
6.3.2.	Correlación entre las adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas del recién nacido	85
6.3.3.	Correlación entre las adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas del recién nacido divididas por sexo.	85
6.4.	Expresión génica de transportadores de nutrientes a nivel placentario	87
6.4.1.	Expresión génica de transportadores de nutrientes a nivel placentario: comparativas según el sexo del neonato	88
6.5.	Expresión proteica de transportadores de nutrientes placentarios	89
6.6.	Análisis de la microbiota intestinal materna y neonatal	90
6.6.1.	Análisis de abundancia diferencial	92
6.6.1.1.	Abundancia diferencial entre ambos grupos de estudio de los taxones procedentes de heces recogidas durante el embarazo	93
6.6.1.2.	Abundancia diferencial entre ambos grupos de estudio de los taxones procedentes de heces recogidas tras el parto	95

6.6.1.3.	Abundancia diferencial entre los taxones procedentes de los meconios de recién nacidos de ambos grupos.....	97
7.	DISCUSIÓN	99
7.1.	Hábitos dietéticos	99
7.2.	Adipoquinas placentarias	105
7.3.	Expresión génica de transportadores de nutrientes placentarios	109
7.4.	Expresión proteica de transportadores placentarios	112
7.5.	Microbiota de heces de madres y neonatos	114
8.	CONCLUSIONES	118
	Primera conclusion.....	118
	Segunda conclusión.....	118
	Tercera conclusión	118
	Cuarta conclusión.....	118
	Quinta conclusión.....	119
	Conclusión general	120
	CONCLUSIONS	121
	First conclusión.....	121
	Second conclusion.....	121
	Third conclusion.....	121
	Fourth conclusion.....	121
	Fifth conclusion	122
	General conclusion	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Resumen de los cambios fisiológicos sufridos durante el embarazo	22
Figura 2. Mapa de edad media de primer embarazo en mujeres europeas.....	27
Figura 3. Esquema del proceso del desarrollo placentario.....	28
Figura 4. Resumen de las adipocinas más relevantes implicadas en la función placentaria y su función.....	34
Figura 5. Esquema del orden filogenético de taxones, y ejemplos de ellos, del reino Bacteria. 45	
Figura 6. Esquema resumen de las funciones de la microbiota intestinal.....	48
Figura 7. Resumen de factores que afectan potencialmente a la programación metabólica temprana.....	49

Material y Métodos

Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de captación de gestantes voluntarias.....	57
---	----

Resultados

Figura 9. Consumo medio de grupos de alimentos de gestantes control y EMA estimado mediante FFQ	75
Figura 10. Consumo medio de macronutrientes en ambos grupos de estudio estimados mediante FFQ	76
Figura 11. Comparativa entre la ingesta de nutrientes estimada por el FFQ y las IDR indicados por la AESAN	79
Figura 12. Heatmap de las correlaciones entre energía y macronutrientes, incluyendo fibra, y medidas antropométricas del recién nacido.....	80
Figura 13. Heatmap de las correlaciones entre vitaminas y medidas antropométricas del recién nacido	81
Figura 14. Línea de regresión entre el consumo de fibra medio y el perímetro cefálico del recién nacido.	82
Figura 15. Expresión de adipocinas placentarias en ambos grupos de estudio.....	83
Figura 16. Expresión de adipocinas placentarias diferenciadas por el sexo del feto	84

Figura 17. Heatmaps de las correlaciones entre la expresión de adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas del recién nacido.....	85
Figura 18. Heatmaps de las correlaciones entre la concentración de adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas de los recién nacidos diferenciadas por sexo.	86
Figura 19. Expresión relativa de genes transportadores de nutrientes placentarios.....	87
Figura 20. Expresión relativa de genes transportadores de nutrientes en la placenta dividida por sexos.....	88
Figura 21. Expresión proteica de transportadores de nutrientes placentarios..	89
Figura 22. Imágenes de las bandas detectadas por quimioluminiscencia para los anticuerpos analizados, junto con sus respectivos geles stain-free utilizados para la normalización de la cuantificación proteica por Western blot.....	90
Figura 23. Gráfico de barras de la abundancia relativa de filos bacterianos encontrados en las heces de las madres de ambos grupos de estudio y en los meconios de su descendencia.....	91
Figura 24. Diversidad beta de la microbiota intestinal entre ambos grupos experimentales y los meconios de su descendencia, representada mediante distancia de Jaccard.	92
Figura 25. Volcano plot de las 20 familias de bacterias más expresadas y aquellas que presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes durante el embarazo..	93
Figura 26. Volcano plot de los 20 géneros de bacterias más expresados y aquellos que presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes durante el embarazo.	94
Figura 27. Volcano plot de las 20 familias de bacterias más expresadas y aquellas que, presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes tras el parto.	95
Figura 28. Volcano plot de los 20 géneros de bacterias más expresados y aquellos que, presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes tras el parto.	96
Figura 29. Volcano plot de las 20 familias de bacterias más expresadas y aquellas que, presentaron diferencias significativas en muestras de meconios	97
Figure 30. Volcano plot de los 20 géneros de bacterias más expresados y aquellos que, presentaron diferencias significativas en muestras de meconios	98

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Edad media del primer embarazo en España desde el año 2013 hasta 2023.....	26
Tabla 2. Ingestas nutricionales de referencia de macronutrientes para población embarazada española según la AESAN.	39
Tabla 3. Vitaminas de ambos grupos, principales funciones en el embarazo y recomendaciones diarias para población de embarazadas españolas según AESAN.	40
Tabla 4. Minerales, principales funciones en el embarazo y recomendaciones diarias para población de embarazadas españolas según la AESAN.....	41

Material y Métodos

Tabla 5. Adipoquinas placentarias medidas a través del kit Bio-Plex Pro Human Diabetes Assay y sus rangos de fluorescencia.	63
Tabla 6. Volúmenes necesarios de reactivo para llevar a cabo la retrotranscripción de ARNm con el kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription KIT.	64
Tabla 7. Sondas TaqMan de genes estudiados y su referencia. Todos de la casa comercial ThermoFisher.	65
Tabla 8. Volúmenes de reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-qPCR.....	66
Tabla 9. Anticuerpos, diluciones e información utilizados para la determinación proteica mediante Western Blot.	67

Resultados

Tabla 10. Características antropométricas, así como método de concepción y finalización del parto de las mujeres embarazadas del grupo control y grupo EMA.....	73
Tabla 11. Medidas antropométricas de los recién nacidos, así como la edad gestacional y el sexo de ambos grupos de estudio, control y EMA.	73
Tabla 12. Medidas antropométricas de la madre y el recién nacido, método de concepción y método de parto del recién nacido del grupo control y EMA separadas por sexo del recién nacido.	74
Tabla 13. Consumo medio de minerales y vitaminas por ambos grupos de estudio, control y EMA, estimados mediante FFQ.	77
Tabla 14. Ingesta media de grupos y subgrupos de polifenoles estimados mediante FFQ en ambos grupos de estudio, control y EMA.	78

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidónico

AESAN – Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

AGCC – Ácidos Grasos de Cadena Corta

AGPI – Ácidos Grasos Poliinsaturados

ANOVA – Análisis de la Varianza

ARN_m – ARN mensajero

ASVs – Amplicon Sequence Variants

AST – Aspartato Aminotransferasa

CSS – Cumulative Sum Scaling

cDNA – ADN Complementario

DADA2 – Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2

DAG – Desacilgrelina

DHA – Ácido Docosahexaenoico

DMT1 – Transportador de metales divalentes

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DOHaD – Developmental Origins of Health and Disease

DRI – Dietary Reference Intakes

EEM – Error Estándar de la Media

EFSA – European Food Safety Authority

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMA – Edad Materna Avanzada

EMEA – Edad Materna Extremadamente Avanzada

EMMA – Edad Materna Muy Avanzada

EMPeror – Exploratory Microbiome Project Visualizer

EPA – Ácido Eicosapentaenoico

FABP – Proteínas de unión a ácidos grasos

FAO – Food and Agriculture Organization

FFQ – Food Frequency Questionnaire

FIV-ICSI – Fecundación In Vitro - Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides

FSH – Hormona folículoestimulante

GHS-R1 – Growth Hormone Secretagogue Receptor type 1

GIP – Gastric Inhibitory Polypeptide
GLP-1 – Glucagon-Like Peptide 1
GLUT1 – Transportador de glucosa tipo 1
GnRH – Hormona liberadora de gonadotropinas
IG – Índice Glucémico
hCG – Gonadotropina Coriónica Humana
HDL – High-Density Lipoprotein
hPL – Lactógeno Placentario Humano
IDR – Ingestas Diarias Recomendadas
IGF – Insulin-like Growth Factor
IGFBP-3 – Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3
IL-6 – Interleukina 6
IMC – Índice de Masa Corporal
INR – Ingestas Nutricionales de Referencia
LAT1 – Transportador 1 de aminoácidos de tipo L
LDL – Low-Density Lipoprotein
LGA – Large for Gestational Age
LH – Hormona luteinizante
logFC – Log Fold Change
mTOR – Mammalian Target of Rapamycin
OD – Ovodonación
PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor Type 1
PAPP-A – Pregnancy-Associated Plasma Protein A
PGC-1 α – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha
PKA – Protein Kinase A
PRI – Population Reference Intakes
qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction
RIN – RNA Integrity Number
RNA – Ácido Ribonucleico
RT-qPCR – Reverse Transcription Quantitative PCR
SILVA – Base de Datos de Secuencias Ribosomales
SLC27A1 – Solute Carrier Family 27 Member 1
SNAT1/2/4 – Sodium-Coupled Neutral Amino Acid Transporters
TBS – Tris Buffered Saline

TBST – Tris Buffered Saline with Tween 20

TNF- α – Tumor Necrosis Factor Alpha

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

1. RESUMEN

Introducción

El embarazo es un proceso fisiológico complejo que implica cambios anatómicos, endocrinos, metabólicos cardiovasculares y respiratorios en la madre, todos dirigidos a sostener y permitir el adecuado desarrollo del feto. El sistema endocrino juega un papel esencial, con aumentos progresivos en estrógenos y progesterona, y el desarrollo de la placenta como órgano endocrino transitorio clave. A nivel metabólico, se observan adaptaciones como el aumento de resistencia a la insulina y redistribución del tejido adiposo, influenciado por hormonas como leptina, cortisol y relaxina.

El concepto de Edad Materna Avanzada (EMA), se define como ser madre primeriza a partir de los 35 años. El aumento de la EMA ha sido significativo en Europa, especialmente en España, donde la media de edad se sitúa en los 32 años. Este retraso en la maternidad está asociado a riesgos aumentados tanto para la madre como el feto, y a cambios en la función placentaria.

La placenta, un órgano transitorio que aparece en torno a la segunda semana de embarazo, actúa como barrera entre madre y feto, como vía de intercambio entre ellos, y también como órgano endocrino. Producirá adipoquinas que impactan en el desarrollo placentario y fetal. Estas moléculas modulan procesos como angiogénesis, respuesta inmune, señalización de insulina y transporte de nutrientes, teniendo implicaciones potenciales en complicaciones del embarazo y en el desarrollo fetal. Asimismo, este órgano será el encargado de transportar nutrientes al feto en crecimiento, por lo que una correcta función placentaria a este nivel, es clave para la formación de nuevos tejidos que afectará de forma directa en el proceso de desarrollo y maduración de los órganos y sistemas del feto.

Desde el punto de vista nutricional, cabe destacar la importancia de una alimentación adecuada en cantidad y calidad durante el embarazo, particularmente en una etapa de alta demanda fisiológica. En este sentido, han de tenerse en cuenta macronutrientes, micronutrientes y el papel de los polifenoles, a fin de conseguir unos requerimientos diarios adecuados en este proceso. Se considera una etapa de gran plasticidad en la vida temprana y su influencia en la salud a largo plazo hace que las deficiencias nutricionales pueden impactar directamente en el desarrollo fetal y en la predisposición a enfermedades metabólicas futuras.

La microbiota intestinal, entendiéndose esta como todos los microorganismos que cohabitan en el intestino tiene funciones clave en la digestión, el sistema inmunológico y hasta en el estado de ánimo. En el intestino habitan billones de bacterias, principalmente de los grupos Firmicutes y Bacteroidetes, aunque también hay virus, hongos y arqueas. La microbiota intestinal

ayuda a digerir alimentos, produce energía y sustancias útiles, protege contra bacterias dañinas y regula el sistema inmune. También se comunica con el cerebro a través del llamado eje intestino-cerebro, influyendo en emociones y salud mental. Un desequilibrio en esta microbiota, conocido como disbiosis, puede estar relacionado con enfermedades como obesidad, diabetes, depresión y autismo. Durante el embarazo, la microbiota cambia progresivamente. En los primeros meses es parecida a la de una mujer no embarazada, pero luego aumenta la cantidad de ciertos microbios como lactobacilos y proteobacterias, mientras que otros beneficiosos disminuyen. Al nacer, el bebé entra en contacto con la microbiota de la madre, lo que influirá en el desarrollo de su propio sistema inmune y digestivo.

La programación metabólica temprana se refiere a cómo el entorno durante el embarazo, especialmente la nutrición y las hormonas que recibe el feto, puede modificar la manera en que se expresan sus genes, sin cambiar su ADN (epigenética). Estos cambios pueden afectar el desarrollo de órganos y sistemas, y aumentar el riesgo de enfermedades como obesidad, diabetes o hipertensión en la vida adulta. Esta idea, conocida como la hipótesis de Barker, surgió de estudios que mostraron que la desnutrición durante el embarazo se relaciona con más enfermedades en la edad adulta. También se ha visto que estos efectos varían según en qué momento del embarazo ocurren. Uno de los órganos clave en esta programación es la placenta, ya que regula qué nutrientes y hormonas llegan al feto. Si hay complicaciones o situaciones adversas, como preeclampsia o situaciones estresantes, se puede alterar su función. Además, la respuesta de la placenta a condiciones adversas puede ser diferente dependiendo del sexo del feto. Por ello, situaciones como la EMA puede afectar esta programación. Las gestantes de mayor edad tienen mayor riesgo de complicaciones durante el embarazo, como diabetes gestacional, hipertensión o parto prematuro, que influyan en el desarrollo del feto.

Material y Métodos

Para llevar a cabo este estudio, se reclutaron mujeres gestantes en torno a la semana 12 de gestación durante su visita al ginecólogo de los hospitales Universitarios Virgen de las Nieves (Granada) y Virgen de la Arrixaca (Murcia), dividiéndolas en dos grupos según edad: control (<35 años) y EMA (≥ 35 años), con 100 participantes por grupo. El protocolo fue aprobado por un comité ético y los procedimientos siguieron regulaciones de bioseguridad y protección de datos, asegurando anonimato y consentimiento informado.

Los datos y muestras fueron recogidos en dos fases:

- Primera fase (en el momento del reclutamiento): datos clínicos, muestras de sangre y heces.

- Segunda fase (en el momento del parto): muestras de sangre, heces, placenta y meconio de los recién nacidos.

La evaluación nutricional se llevó a cabo mediante un cuestionario validado de frecuencia de alimentos (FFQ), analizando macronutrientes, micronutrientes y polifenoles.

Las muestras biológicas se procesaron para análisis bioquímicos, perfil de adipocinas y expresión génica y proteica.

En placenta se cuantificaron nueve adipocinas mediante la técnica multiplex Bio-Plex y la irisina mediante ELISA. También se extrajo ARN y posterior retrotranscripción, para evaluar la expresión de genes implicados en el transporte de nutrientes. La actividad de estos genes fue comprobada posteriormente mediante la expresión proteica de los mismos genes analizados mediante Western-Blot.

Por último, se analizó la microbiota fecal de madres y del meconio de sus recién nacidos mediante la secuenciación de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA. La extracción de ADN se realizó con el kit QIAamp PowerFecal Pro DNA y el procesamiento (librerías y secuenciación) fue llevado a cabo por el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Las librerías 16S se prepararon siguiendo el protocolo de Illumina con PCR en dos pasos, utilizando primers específicos para V3/V4. Para evitar amplificación de ADN eucariota, se añadieron bloqueadores PNAs. Tras la amplificación, se combinaron triplicados, se indexaron y purificaron las muestras. Luego se cuantificaron y agruparon para la secuenciación en un sistema MiSeq® con un cartucho V3 (2x275 pb).

Resultados y discusión

Los resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos en cuanto a características antropométricas de las madres y los recién nacidos, ni en el método de concepción o de parto. Sin embargo, sí se observan diferencias notables en la ingesta de nutrientes y su calidad.

En cuanto a la ingesta de fibra, el grupo EMA mostró niveles significativamente más bajos que el grupo control. También se observaron deficiencias significativas en los niveles de zinc, cobre, selenio, vitaminas B1, B3, C y ácido fólico. Aunque en general ambos grupos estuvieron por debajo de las recomendaciones dietéticas (IDR) para gestantes, el grupo EMA presentó mayores carencias.

Respecto a los polifenoles, no hubo diferencias significativas en la ingesta total, pero sí en subgrupos: las embarazadas EMA consumieron más antocianinas, flavonoles, flavonas e hidroxifenilpropenos. Esto podría tener implicaciones antioxidantes y metabólicas relevantes en este grupo.

Las correlaciones llevadas a cabo para encontrar asociaciones entre la alimentación y las características antropométricas del recién nacido, mostraron una relación negativa entre el consumo de fibra y el perímetro cefálico del neonato.

Estos resultados sugieren que la edad materna avanzada podría estar asociada a una menor calidad en la dieta, lo que se refleja en menores niveles de nutrientes esenciales. A pesar de no observarse diferencias fenotípicas significativas en el recién nacido, estas deficiencias nutricionales podrían tener efectos a largo plazo en la salud del neonato y su desarrollo metabólico.

En cuanto al perfil de adipocinas en placentas de madres EMA, la insulina aumentó (particularmente en varones), el glucagón disminuyó y el GLP-1 no varió. La resistina fue menor en el grupo EMA, mientras que el GIP se relacionó con peso y perímetro cefálico en varones EMA. La visfatina aumentó en EMA y se asoció negativamente con el perímetro cefálico en niñas. La leptina disminuyó en EMA y en varones, correlacionándose negativamente con el perímetro cefálico. La irisina se relacionó positivamente con la longitud neonatal en varones control, y el PAI-1 disminuyó en EMA, lo que podría afectar la función placentaria. En conjunto, los resultados sugieren que la EMA altera la función placentaria de forma dependiente del sexo fetal, con posibles consecuencias en la salud neonatal.

Se analizó la expresión génica y proteica de transportadores placentarios en función de la edad materna avanzada (EMA) y el sexo fetal. Aunque no hubo diferencias significativas en varios transportadores, se observó que el gen SNAT1, crucial para el transporte de aminoácidos, tenía una expresión menor en mujeres con EMA, especialmente en fetos masculinos. Además, los fetos femeninos del grupo control mostraron una mayor expresión de genes como CD36, DMT1, FABP4 y LAT1, lo que sugiere una mayor eficiencia en el transporte de nutrientes.

Para complementar estos resultados, se analizó la expresión proteica de los mismos transportadores. Los hallazgos mostraron que DMT1 y SNAT1 tenían niveles proteicos mayores en el grupo EMA, lo que contrastaba con los resultados de la expresión génica, donde SNAT1 fue mayor en el grupo control. Esta discrepancia podría explicarse por mecanismos post-transcripcionales, como la regulación por microARNs, o por una mayor estabilidad proteica y eficiencia traduccional en el grupo EMA. Además, el estrés oxidativo o la alteración en la maquinaria de degradación proteica en el grupo EMA podrían favorecer la acumulación de

proteínas. Estos resultados sugieren que la placenta en embarazos de EMA podría adaptar su expresión proteica para asegurar un adecuado transporte de nutrientes, en un contexto de posibles desafíos como hipoxia o inflamación.

Por último, los resultados de la microbiota intestinal, mostraron que, durante el embarazo, hubo diferencias en la microbiota intestinal entre ambos grupos, con el grupo control mostrando más bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium*. Las gestantes del grupo EMA tenían menos bacterias productoras de butirato, explicable por los resultados anteriormente encontrados sobre una dieta baja en fibra, afectando así negativamente a su microbiota. La microbiota de los neonatos mostró diferencias, con el grupo control presentando una microbiota más beneficiosa, mientras que los neonatos EMA tenían bacterias asociadas con inflamación. Estos hallazgos sugieren que la dieta y la microbiota materna influyen en la salud intestinal y el desarrollo fetal, lo que podría tener efectos a largo plazo en la salud neonatal.

SUMMARY

Introduction

Pregnancy is a complex physiological process involving anatomical, endocrine, metabolic, cardiovascular and respiratory changes in the mother, all aimed at sustaining and enabling the proper development of the foetus. The endocrine system plays an essential role, with progressive increases in oestrogen and progesterone, and the development of the placenta as a key transient endocrine organ. At the metabolic level, adaptations such as increased insulin resistance and redistribution of adipose tissue are observed, influenced by hormones such as leptin, cortisol and relaxin.

The concept of Advanced Maternal Age (AMA) is defined as being a first-time mother from the age of 35. The increase in AMA has been significant in Europe, especially in Spain, where the average age is 32 years. This delay in childbearing is associated with increased risks for both mother and foetus, and changes in placental function.

The placenta, a transient organ that appears around the second week of pregnancy, acts as a barrier between mother and foetus, as a channel of exchange between them, and also as an endocrine organ. It produces adipokines that impact on placental and fetal development. These molecules modulate processes such as angiogenesis, immune response, insulin signalling and nutrient transport, with potential implications for pregnancy complications and fetal development. Likewise, this organ will be responsible for transporting nutrients to the growing foetus, so proper placental function at this level is key to the formation of new tissues that will directly affect the process of development and maturation of the fetal organs and systems.

From a nutritional point of view, it is important to highlight the importance of an adequate diet in terms of quantity and quality during pregnancy, particularly at a time of high physiological demand. In this regard, macronutrients, micronutrients and the role of polyphenols must be taken into account in order to achieve adequate daily requirements in this process. It is considered a stage of great plasticity in early life and its influence on long-term health means that nutritional deficiencies can directly impact on fetal development and predisposition to future metabolic diseases.

The gut microbiota, understood as all the microorganisms that cohabit the gut, play key roles in digestion, the immune system and even mood. The gut is inhabited by trillions of bacteria, mainly from the Firmicutes and Bacteroidetes groups, but also by viruses, fungi and archaea. The gut microbiota helps digest food, produces energy and useful substances, protects against harmful bacteria and regulates the immune system. It

also communicates with the brain through the so-called gut-brain axis, influencing emotions and mental health. An imbalance in this microbiota, known as dysbiosis, may be linked to diseases such as obesity, diabetes, depression and autism. During pregnancy, the microbiota changes progressively. In the first few months it is similar to that of a non-pregnant woman, but then the amount of certain microbes such as lactobacilli and proteobacteria increases, while other beneficial microbes decrease. At birth, the baby comes into contact with the mother's microbiota, which will influence the development of her own immune and digestive system.

Early metabolic programming refers to how the environment during pregnancy, especially the nutrition and hormones the foetus receives, can modify the way its genes are expressed, without changing its DNA (epigenetics). These changes can affect the development of organs and systems, and increase the risk of diseases such as obesity, diabetes or hypertension in adulthood. This idea, known as the Barker hypothesis, arose from studies showing that malnutrition during pregnancy is associated with more disease in adulthood. These effects have also been shown to vary depending on when in pregnancy they occur. One of the key organs in this programming is the placenta, which regulates which nutrients and hormones reach the foetus. If there are complications or adverse situations, such as pre-eclampsia or stressful situations, its function can be altered. In addition, the placenta's response to adverse conditions may be different depending on the sex of the foetus. Therefore, situations such as AMA may affect this programming. Older pregnant women have a higher risk of complications during pregnancy, such as gestational diabetes, hypertension or premature delivery, which will influence the development of the foetus.

Material and methods

To carry out this study, pregnant women were recruited around 12 weeks of gestation during their visit to the gynaecologist at the Virgen de las Nieves (Granada) and Virgen de la Arrixaca (Murcia) University Hospitals, and divided into two groups according to age: control (<35 years) and AMA (≥ 35 years), with 100 participants per group. The protocol was approved by an ethics committee and the procedures followed biosafety and data protection regulations, ensuring anonymity and informed consent.

Data and samples were collected in two phases:

- First phase (at recruitment): clinical data, blood and stool samples.

- Second phase (at delivery): blood, stool, placenta and meconium samples of the newborns.

Nutritional assessment was carried out using a validated food frequency questionnaire (FFQ), analysing macronutrients, micronutrients and polyphenols.

Biological samples were processed for biochemical analysis, adipokine profiling and gene and protein expression.

Nine adipokines were quantified in placenta using the multiplex Bio-Plex technique and irisin by ELISA. RNA was also extracted and subsequently retrotranscribed to evaluate the expression of genes involved in nutrient transport. The activity of these genes was subsequently checked by protein expression of the same genes analysed by Western-Blot.

Finally, the faecal microbiota of mothers and the meconium of their newborns were analysed by sequencing the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. DNA extraction was performed with the QIAamp PowerFecal Pro DNA kit and the processing (libraries and sequencing) was carried out by the Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra'. The 16S libraries were prepared following the Illumina protocol with two-step PCR, using specific primers for V3/V4. To avoid amplification of eukaryotic DNA, PNA blockers were added. After amplification, triplicates were combined, indexed and samples were purified. They were then quantified and pooled for sequencing on a MiSeq® system with a V3 cartridge (2x275 bp).

Results and discussion

The results show no significant differences between the groups in anthropometric characteristics of mothers and newborns, nor in the method of conception or delivery. However, there were notable differences in nutrient intake and nutrient quality.

In terms of fibre intake, the AMA group showed significantly lower levels than the control group. Significant deficiencies were also observed in the levels of zinc, copper, selenium, vitamins B1, B3, C and folic acid. Although in general both groups were below the dietary recommendations values (DRV) for pregnant women, the AMA group showed higher deficiencies.

Regarding polyphenols, there were no significant differences in total intake, but there were significant differences in subgroups: pregnant AMA women consumed more anthocyanins, flavonols, flavones and hydroxyphenylpropenes. This could have relevant antioxidant and metabolic implications in this group.

Correlations carried out to find associations between diet and anthropometric characteristics of the newborn showed a negative relationship between fibre intake and newborn head circumference.

These results suggest that advanced maternal age may be associated with lower dietary quality, which is reflected in lower levels of essential nutrients. Although no significant phenotypic differences were observed in the newborn, these nutritional deficiencies could have long-term effects on neonatal health and metabolic development.

Regarding the adipokine profile in placentas from AMA mothers, insulin increased (particularly in males), glucagon decreased and GLP-1 was unchanged. Resistin was lower in the AMA group, while GIP was related to weight and head circumference in EMA males. Visfatin increased in AMA and was negatively associated with head circumference in girls. Leptin decreased in AMA and in boys and was negatively correlated with head circumference. Irisin was positively related to neonatal length in control boys, and PAI-1 was decreased in AMA, which could affect placental function. Taken together, the results suggest that AMA alters placental function in a fetal sex-dependent manner, with possible consequences for neonatal health.

Gene and protein expression of placental transporters was analysed as a function of AMA and fetal sex. Although there were no significant differences in several transporters, the SNAT1 gene, crucial for amino acid transport, was found to be less expressed in females with AMD, especially in male foetuses. In addition, female foetuses in the control group showed higher expression of genes such as CD36, DMT1, FABP4 and LAT1, suggesting higher efficiency in nutrient transport.

To complement these results, protein expression of the same transporters was analysed. The findings showed that DMT1 and SNAT1 had higher protein levels in the AMA group, which contrasted with the gene expression results, where SNAT1 was higher in the control group. This discrepancy could be explained by post-transcriptional mechanisms, such as regulation by microRNAs, or by higher protein stability and translational efficiency in the AMA group. In addition, oxidative stress or altered protein degradation machinery in the AMA group could favour protein accumulation. These results suggest that the placenta in AMA pregnancies could adapt its protein expression to ensure adequate nutrient transport, in a context of possible challenges such as hypoxia or inflammation.

Finally, the gut microbiota results showed that during pregnancy, there were differences in gut microbiota between the two groups, with the control group showing more beneficial bacteria such as *Bifidobacterium*. Pregnant women in the AMA group had fewer butyrate-producing

bacteria, explained by the previously found findings of a low-fibre diet, thus negatively affecting their microbiota. The microbiota of the neonates showed differences, with the control group having a more beneficial microbiota, while the AMA neonates had bacteria associated with inflammation. These findings suggest that diet and maternal microbiota influence gut health and fetal development, which may have long-term effects on neonatal health.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. El embarazo

2.1.1. Concepto

El término embarazo o concepción, describe el proceso durante el cual uno o más embriones se desarrollan para dar paso a la formación del feto, dentro del útero de la mujer. (1). En humanos, este periodo abarca desde la concepción, hasta el nacimiento del bebé (1, 2) y esto comprende alrededor de unas 40 semanas desde el primer día del último periodo menstrual hasta la fecha prevista de parto, siendo esta la definición de edad gestacional, que se expresa por tanto en semanas y días completos.

2.1.2. Cambios fisiológicos durante el embarazo

Durante este proceso, se experimentan una serie de cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos en todos los órganos y sistemas del organismo de la mujer (3) (Figura 1). Estos, son una reacción normal al desarrollo del feto, destinados a mantenerlo y primar su desarrollo y crecimiento (4). Estos cambios aparecen tras la concepción y, en embarazos de curso normal, desaparecen tras el alumbramiento (5).

El embarazo se divide en tres trimestres en los que los cambios que se suceden están bien diferenciados, aunque varían de una mujer a otra (6). Estos cambios van a ir en consonancia con los cambios hormonales que se suceden a lo largo del embarazo.

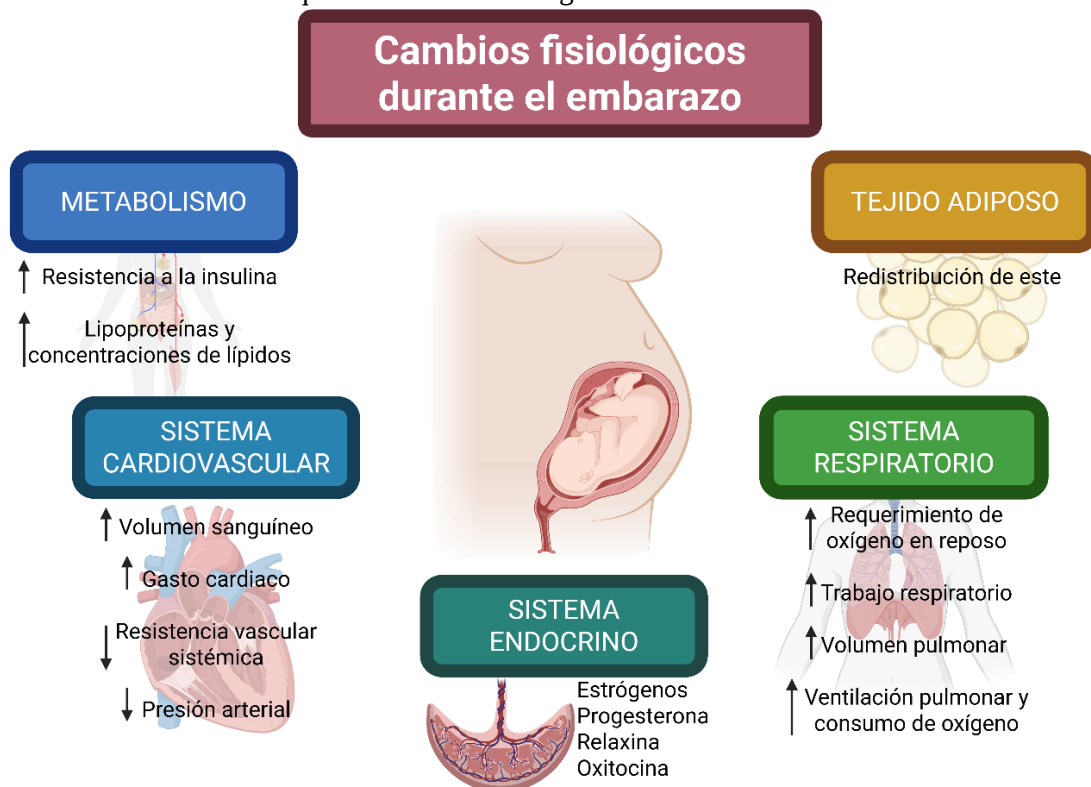


Figura 1. Resumen de los cambios fisiológicos sufridos durante el embarazo. Elaboración propia.

2.1.2.1. Cambios en el sistema endocrino

El sistema endocrino es uno de los que se ve más afectado por el embarazo. Esto se debe a la aparición de un órgano endocrino transitorio, la placenta, que asumirá el papel de interfaz entre la madre y el feto, así como de cuerpo lúteo. Las principales hormonas que se van a ver alteradas van a ser los estrógenos, cuyas funciones van desde la embriogénesis hasta el propio parto. Concretamente el estradiol va a favorecer el crecimiento y la diferenciación placentaria (7). Sus niveles irán aumentando conforme avanzan los trimestres, alcanzando su punto máximo en el tercer trimestre, promoviendo la expansión uterina y preparando el cuello del útero para el parto (8) y aumentando la sensibilidad del útero a la oxitocina y prostaglandinas, hormonas que se encargarán de orquestar el inicio del parto, aumentando también su producción (9). Por otro lado, la progesterona, conocida como la ‘‘hormona del embarazo’’, es producida por los ovarios en las primeras etapas y más tarde por la placenta. Esta se encarga de prevenir las contracciones prematuras y mantener la viabilidad del embarazo además de favorecer el desarrollo del páncreas y los pulmones fetales (10) y suprime ciertas respuestas inmunitarias maternas, evitando de esta forma que el feto sea rechazado por el sistema inmune de la madre (11). Esta va a aumentar también a lo largo del embarazo, pero en el tercer trimestre comienzan a disminuir levemente en relación a los estrógenos para facilitar el trabajo del parto. Otras hormonas, como el cortisol, se ve también modificado, experimentando un marcado aumento durante todo el embarazo, para satisfacer así la carga metabólica extra del cuerpo (12). Por último, la relaxina funcionará sinérgicamente con la progesterona para reducir la liberación de oxitocina durante el embarazo (13). La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es secretada por el hipotálamo en condiciones normales, cuya función principal será la secreción de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) por la hipófisis durante el ciclo ovárico, la cual estimula el desarrollo de los folículos ováricos y cuyos niveles disminuyen drásticamente durante el embarazo. La LH por su parte, es la encargada de desencadenar la ovulación y mantener el cuerpo lúteo, que producirá progesterona durante esos días para sostener al endometrio, durante los primeros días de gestación, antes de que la gonadotropina coriónica humana (hCG) asuma el rol de mantener el cuerpo lúteo y la placenta el de la producción de progesterona. Por último, la hCG es producida por el trofoblasto desde muy temprano, es detectable desde el día 8 postovulación. Su función principal es mantener el cuerpo lúteo activo, asegurando la producción de progesterona en las primeras semanas del embarazo. Por ello, sus niveles aumentan rápidamente durante el primer trimestre, alcanzando un pico alrededor de la semana 10, para después disminuir y mantenerse estables el resto del embarazo.

2.1.2.2. Cambios en el metabolismo

Estos cambios incluyen alteraciones en el metabolismo de la glucosa, los lípidos y los aminoácidos. Se produce un aumento de la resistencia a la insulina, más marcado a final de la gestación, elevando así los niveles maternos de glucosa para garantizar un suministro de energía suficiente al feto (14). Se observa también un incremento significativo en las subclases de lipoproteínas y en las concentraciones de lípidos, incluidos los triglicéridos, tanto en las lipoproteínas de densidad media, baja como alta, en comparación con las mujeres no gestantes (15). Además, otros cambios como la redistribución del tejido adiposo, el cual provocará un aumento de la grasa visceral, conllevará un aumento de citokinas proinflamatorias como el factor de necrosis alfa (TNF- α) y la interleukina 6 (IL-6), que contribuyen aún más a la resistencia a la insulina y la disfunción metabólica (16).

2.1.2.3. Cambios en el tejido adiposo

Durante el embarazo, se produce una redistribución del tejido adiposo, con un aumento de la grasa visceral en comparación con la grasa subcutánea. Estos cambios se creen que son consecuencia del aumento de los niveles de estrógeno y progesterona, que promueven el almacenamiento de grasa en este compartimento. Por un lado, la grasa subcutánea parece que disminuye más pronunciadamente en el primer trimestre, debido a la actividad lipolítica que moviliza los ácidos grasos libres para la producción de energía. Por otro lado, la grasa visceral aumenta de forma más pronunciada en el tercer trimestre, asociada con las demandas metabólicas del feto (17). Por supuesto, esta redistribución del tejido adiposo está influenciada tanto por el índice de masa corporal (IMC) previo al embarazo (18), como por el aumento de peso gestacional (19).

En total, la distribución de ganancia de peso en la gestación se distribuye(20):

- 30% peso fetal
- 40% depósitos maternos de grasa
- 30% placenta, líquido amniótico, aumento del tamaño del útero, de las mamas, aumento del volumen sanguíneo, linfático y del líquido intersticial.

2.1.2.4. Cambios en el sistema cardiovascular

A nivel de sistema cardiovascular, las principales adaptaciones sufridas durante el embarazo se van a encontrar en un aumento del volumen sanguíneo en torno a un 40-50% respecto al comienzo del embarazo, provocando a su vez un aumento del gasto cardiaco entre un 30-50% por encima de los niveles previos al embarazo (21). La frecuencia cardiaca en reposo, aumenta de forma paulatina, llegando a unos 89 latidos de media al final del embarazo (22). La resistencia

vascular sistémica disminuye, traduciéndose en una disminución de la presión arterial (23) y la vasculatura se vuelve más flexible, permitiendo un mejor flujo sanguíneo al útero que sufre una angiogénesis importante (24).

2.1.2.5. Cambios en el sistema respiratorio

Se produce un aumento de requerimiento de oxígeno en reposo y un aumento del trabajo respiratorio, por lo tanto, se produce una disminución de la disponibilidad de oxígeno para la realización de trabajo aeróbico, lo que se traduce en una disminución del rendimiento máximo (25). El volumen pulmonar se ve aumentado en un 40%, aumentando así la ventilación pulmonar y el consumo de oxígeno, que aumenta en un 15-20% (26). Debido a la elevación del diafragma unos 4 cm durante el embarazo, la capacidad residual funcional y el volumen residual se ven disminuidos.

2.2. Edad materna avanzada

2.2.1. Concepto, causas y prevalencia

La edad materna avanzada (EMA) se define como ser madre primípara a la edad de 35 años o más (27, 28), aunque algunos estudios la establecen en 40 años, siendo en estos casos definido como edad materna muy avanzada (EMMA) (29, 30). Esta definición no indica una edad límite del embarazo, sino un periodo a partir del cual se considera que los riesgos, tanto para la madre como para el feto, aumentan (31).

Avances recientes en reproducción asistida han ampliado los límites que hasta ahora se marcaban como edad fértil, permitiendo que incluso mujeres posmenopáusicas logren un embarazo (32). Estos avances, junto con la creciente tendencia a postergar la maternidad, que diversas investigaciones atribuyen a la priorización de la educación superior por parte de las mujeres, así como a las aspiraciones laborales y la seguridad financiera de los jóvenes en general (33), entre otras causas, han llevado a la propuesta de una nueva categoría denominada edad materna extremadamente avanzada (EMEA). Esta categoría incluye a mujeres primíparas mayores de 45 años, llegando incluso a superar los 50 (34), habiéndose comprobado que, en los países más desarrollados, muchas mujeres expresan su deseo de ser madres cuando su fertilidad ya no es óptima (35).

Según el Instituto Nacional de Estadística en su documento ``Movimiento Natural de la Población / Indicadores Demográficos Básicos'' publicado en el año 2023, la edad media de maternidad de las mujeres españolas, fue de 32.6 años, acompañado este aumento de la edad materna a una disminución del número de nacimientos en la población española. Además, en los últimos 10 años, el número de nacimientos de madres mayores de 40 años ha crecido un 19.1%, siendo en 2023 el 10.8% del total de embarazos en España con respecto al 6.8% que ocupaba en

el año 2013. El aumento progresivo de la edad media de primer embarazo en España puede observarse en le Tabla 1 (36).

Tabla 1. Edad media del primer embarazo en España desde el año 2013 hasta 2023. Fuente: INE.

Año	Edad media de primer embarazo en España
2013	31.7
2014	31.8
2015	31.9
2016	32.0
2017	32.1
2018	32.2
2019	32.2
2020	32.6
2021	32.6
2022	32.6
2023	32.6

En Europa, se muestra la misma tendencia como se puede observar en la Figura 2. En 2013 la edad media de embarazo era de 28.8 años, cifra que fue aumentando paulatinamente hasta alcanzar los 29.7 en 2022. En este último año, las madres primíparas de mayor edad se encontraron en España, Italia e Irlanda. Además como puede observarse, España supera en más de 3 años de edad la media europea (37).

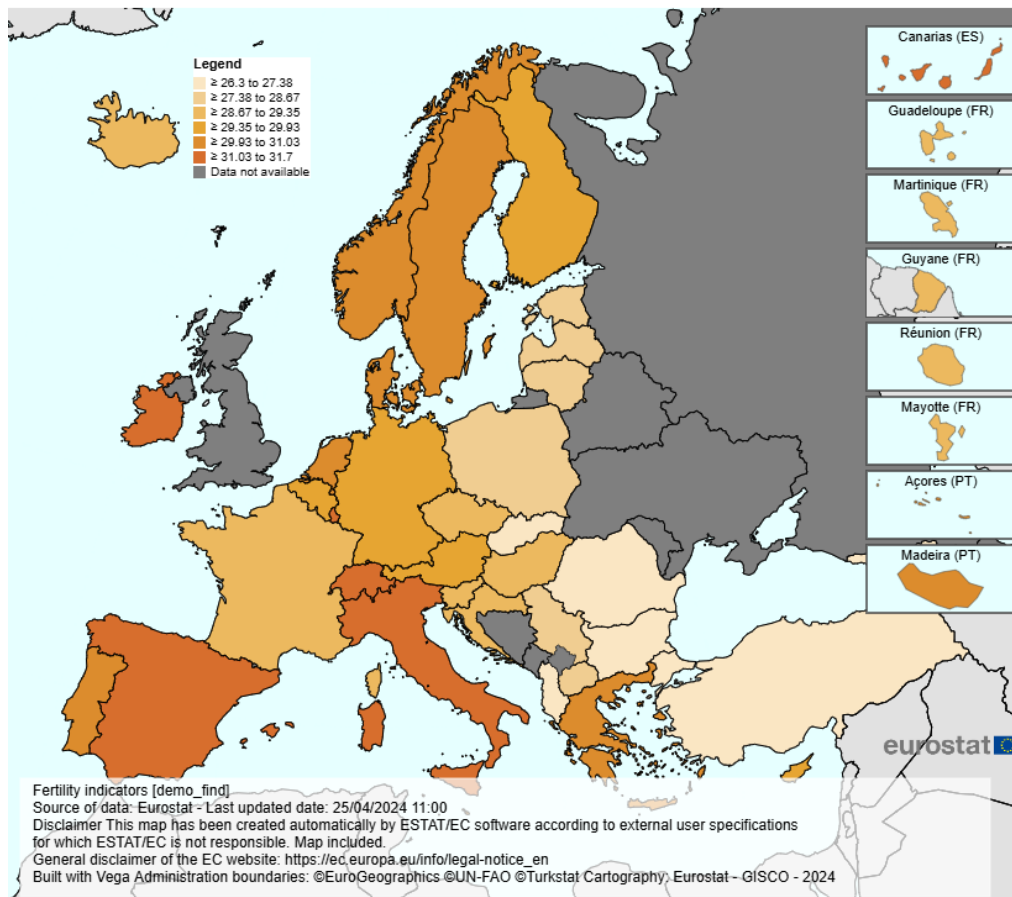


Figura 2. Mapa de edad media de primer embarazo en mujeres europeas. Fuente: EUROSTAT.

Del mismo modo, las madres primíparas mayores de 40 años de edad también han aumentado en la última década en todo Europa, habiéndose incluso duplicado desde el inicio del siglo 21, pasando de un 2.4% en 2001 al 5.4% en 2019, encontrándose la mayor proporción de estas madres en España (con un 10%), seguida de Italia, Grecia, Irlanda y Portugal.

2.3. La placenta

La placenta humana, es un órgano transitorio, que comienza a formarse en torno a la segunda semana de embarazo, y está completamente desarrollada en torno al cuarto mes de embarazo, aunque, durante el resto de gestación, es susceptible a diversos cambios (38). Constituye una interfaz entre el endometrio de la madre y el feto promoviendo el intercambio de sustancias esenciales para el crecimiento fetal, haciendo además la función de barrera (39).

2.3.1. Desarrollo placentario

La placenta humana es un tejido de tipo hemocoriónico, es decir, el corion fetal (una de las membranas que rodean al feto) se encuentra en contacto directo con la sangre materna. Las

vellosidades coriónicas invaden el endometrio y quedan irrigadas por la sangre materna en los espacios intravellosos facilitando así una transferencia eficiente de oxígeno y nutrientes además de desechos, entre la madre y el feto. Por otro lado, esto hace que el sistema inmunológico de la madre deba adaptarse para no rechazar al feto como si fuera un cuerpo extraño (40). El proceso del desarrollo placentario ocurre en tres etapas conocidas como preimplantación, implantación y decidualización.

La preimplantación es la etapa en la que el óvulo desciende a través de las trompas de Falopio hasta el útero, mientras que el endometrio sigue libre (41). Tras la unión ovulo-espermatozoide (en la fecundación) y la diferenciación de mórula a blastocito, ocurre la implantación, en la que el ovocito formado, se introduce en la mucosa uterina. Aquí es dónde el estroma empezará a sufrir los efectos de la decidualización, inducida por la hormona progesterona (42). Simultáneamente, e interactuando entre sí, ocurre la diferenciación trofoblástica, iniciada cuando el trofoblasto, que es la capa celular primaria, se diferencia en dos capas, el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto. El primero, desempeña un papel clave en el intercambio de iones y nutrientes entre madre y feto, además, es el encargado de la síntesis de hormonas esenciales para el mantenimiento del embarazo como la progesterona y la hCG (43). Este tejido se regenera continuamente mediante un proceso en el cual las células del citotrofoblasto mononuclear proliferan y luego se fusionan con el sincitiotrofoblasto. Este proceso ocurre durante toda la gestación, permitiendo un desarrollo fetal adecuado. Cuando se altera, pueden aparecer complicaciones como por ejemplo la preeclampsia (43). Por otro lado, el citotrofoblasto contribuye a la formación de la placenta al generar expansiones celulares que invaden los espacios maternos y recubren la superficie lacunar (41). De esta forma, se completa el proceso de formación placentaria. Un esquema sobre este proceso puede observarse en la Figura 3.

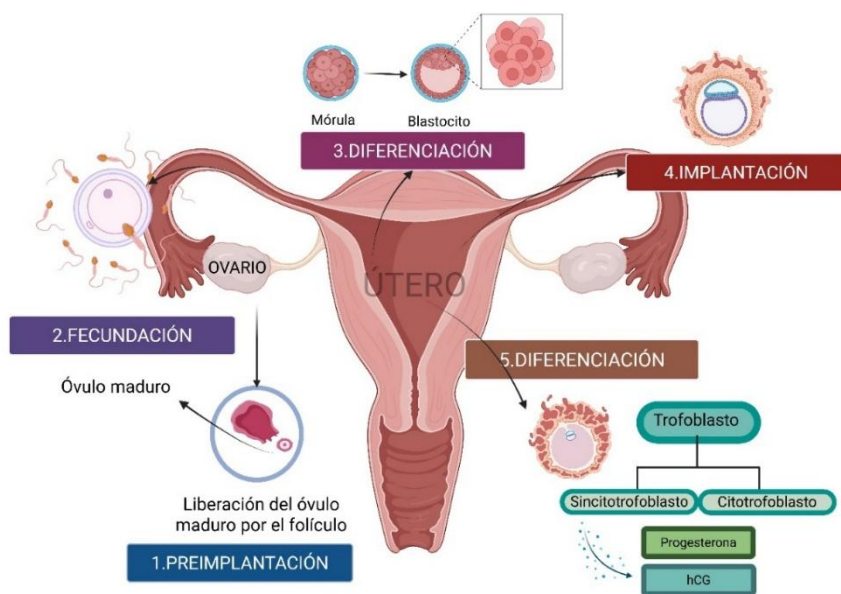


Figura 3. Esquema del proceso del desarrollo placentario. hCG: gonadotropina coriónica humana. Elaboración propia.

2.3.2. La placenta como órgano endocrino

La placenta, además de hacer la función de interfaz entre el feto y la madre, es un órgano endocrino. Es por tanto uno de los responsables los cambios hormonales de la mujer durante este proceso, provocando el aumento de hormonas preexistentes en el organismo de la mujer, estrógenos, progesterona y prolactina, y secretando hormonas específicas del embarazo como la hCG (44), el lactógeno placentario (hPL) y hormonas esteroideas, cuyos efectos diabetogénicos han sido demostrados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (45, 46).

Por otro lado, existen una serie de sustancias conocidas como adipoquinas. Estas son citoquinas con efectos endocrinos y paracrinos (47). El principal órgano secretor de adipoquinas es el tejido adiposo, aunque, investigaciones recientes han demostrado que las células del trofoblasto también expresan las mismas adipoquinas que el tejido adiposo (48-50), lo que sugiere que estas moléculas pueden influir en la interfaz materno-fetal desde la implantación hasta el tercer trimestre del embarazo (51).

2.3.2.1. Adipoquinas

Las adipoquinas constituyen un grupo de péptidos, hormonas y moléculas con actividad autocrina, paracrina y endocrina, que desempeñan un papel fundamental en la comunicación entre el tejido adiposo y diversos órganos diana, como el cerebro, el hígado, el páncreas, el sistema vascular y el tejido muscular, entre otros (52). Estas moléculas participan en la regulación de múltiples procesos fisiológicos tanto a nivel local en el tejido adiposo como a nivel sistémico como el metabolismo, la inflamación y la función vascular. En particular, su secreción influye en la modulación del apetito, el metabolismo, la respuesta inmunitaria innata y la función reproductiva. Alteraciones en su secreción se han asociado con el desarrollo de diversas patologías vinculadas al síndrome metabólico (53).

Durante el embarazo, estas moléculas no son solo producidas por el tejido adiposo materno, sino también por la placenta, donde influirán en el desarrollo fetal y la salud materna. Por un lado, desempeñan un papel fundamental en la regulación del crecimiento placentario y la angiogénesis. Algunas de ellas, como la leptina, han demostrado tener un papel clave en la proliferación e invasión de las células trofoblásticas, que son esenciales para la formación de las vellosidades placentarias y el establecimiento de la circulación materno-fetal (54) además, podrían mejorar la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un regulador clave de la angiogénesis, en la placenta (55). Por otro lado, también van a regular el transporte de nutrientes de la madre al feto modulando la expresión de los transportadores de nutrientes en la placenta, garantizando así que el feto reciba los nutrientes adecuados para su crecimiento y desarrollo estando además implicadas en la regulación de la señalización de la insulina en la placenta, fundamental para el transporte de glucosa al feto (56). Asimismo, es importante

considerar sus funciones más ampliamente reconocidas y estudiadas, particularmente sus propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias, las cuales podrían modular la función placentaria y el desarrollo fetal, contribuyendo potencialmente a la aparición de complicaciones gestacionales como la preeclampsia (57).

A continuación, se describen algunas de las adipoquinas más relevantes en la función placentaria y el desarrollo fetal. En la Figura 4 se puede ver un resumen de cada una y sus funciones.

- Insulina

La relación entre la insulina y la placenta implica diversos mecanismos reguladores, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo fetal y placentario ya que influye en el transporte de nutrientes, la señalización de los factores de crecimiento y la adaptación metabólica. La placenta expresa los receptores de insulina, accesibles tanto para la insulina materna como para la fetal, lo que permite que la insulina influya en la función placentaria y el desarrollo fetal (58, 59). Además, regula el transporte de nutrientes, modulando la expresión de algunos como GLUT1 (transportador de glucosa) o SNAT1 y LAT1 (transportadores de aminoácidos) (60), asegurando de esta forma un correcto aporte de nutrientes al feto. Sin embargo, puede promover también la acumulación de triglicéridos a través de una mayor esterificación de ácidos grasos, lo cual, a la par de mejorar la disponibilidad de nutrientes para el feto, puede conducir a un aumento de la adiposidad y el crecimiento del feto a pesar de las condiciones euglucémicas (61). Por otro lado, su señalización en placenta se relaciona con la vía mTOR (mammalian Target of Rapamycin), estimulando así la síntesis de proteínas y la función mitocondrial. Esta vía es una ruta de señalización celular que regula el crecimiento, la proliferación, la síntesis de proteínas y el metabolismo, en respuesta a señales como nutrientes, factores de crecimiento (como la insulina) y energía celular. En la placenta actúa como sensor de nutrientes y es clave en la señalización a la insulina, promoviendo el crecimiento fetal ya que, cuando la insulina activa mTOR, se estimula la síntesis de proteínas y el transporte de nutrientes al feto (62).

- Grelina

Esta hormona actúa a través del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R1) participando en varios procesos fisiológicos como la proliferación celular y el equilibrio energético. Aunque es producida principalmente en el estómago, la placenta también la produce además de expresar su receptor, que además varía con la edad gestacional como demuestran algunos estudios animales (63). En humanos, parece ser que su forma no acilada, la desacilgrelina (DAG), es la que puede influir en el crecimiento y función placentario, afectando así al crecimiento fetal. Eso es posible ya que la DAG aumenta la expresión de GHS-R1, pero inhibe la diferenciación celular (64), además, los niveles de DAG se correlacionan negativamente

con el peso al nacer y el peso placentario, indicando así un posible papel en la regulación del crecimiento fetal (65).

- Leptina

Desempeña un papel en la regulación del equilibrio energético y el metabolismo. Durante el embarazo sus niveles aumentan. Además, Shen y col., encontraron en recientemente una correlación entre los niveles de leptina del cordón umbilical y el peso al nacer, sugiriendo así un papel directo en la regulación del crecimiento fetal (66). Además, se ha demostrado que influye en la invasión de los trofoblastos y la angiogénesis, haciendo también visible su papel en el desarrollo placentario (54).

- Visfatina

La función de esta adipoquina es muy similar a la de la insulina. Su expresión en placenta y útero fue descubierta hace relativamente poco tiempo, gracias a los estudios llevados a cabo por Astern y col. en 2013 (67) y corroboradas más tarde por Mumtaz y col. en 2015 (68), indicando así su papel en el embarazo. Regula la permeabilidad amniótica para controlar el volumen del líquido amniótico e inhibir así las contracciones uterinas, hecho que se ha demostrado tanto en humanos como en ratas (68). Además, está implicada en la regulación de la inflamación placentaria, la respuesta inmunitaria y la angiogénesis (69).

- Glucagón

La relación entre esta adipoquina y la placenta es compleja, abarcando efectos directos como indirectos sobre el desarrollo fetal y la función placentaria. Aunque el glucagón es ampliamente conocido por su papel en la regulación del metabolismo de la glucosa, también participa en la modulación del crecimiento fetal y en el transporte de nutrientes hacia la placenta. Por ejemplo, en etapas finales de la gestación, niveles elevados de glucagón pueden afectar la función placentaria afectando a la acumulación de proteínas y el crecimiento fetal. Estos efectos se atribuyen a la capacidad del glucagón para reducir el transporte de nutrientes a través de la placenta, disminuir el flujo sanguíneo placentario y regular negativamente la secreción de hormonas placentarias (70). La señalización del receptor de glucagón desempeña un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos más allá de la regulación de la homeostasis de la glucosa como el metabolismo de los lípidos y aminoácidos (71), funciones endocrinas sistémicas como la secreción de hormonas, incluyendo, además, el funcionamiento normal placentario y desarrollo fetal al tener un papel directo en la modulación del transporte placentario de nutrientes (72). La interrupción de esta señalización puede generar alteraciones en la placentación y comprometer el crecimiento fetal, lo que resalta la importancia del glucagón en el adecuado desarrollo fetal (72).

- Péptido 1 similar al glucagón (GLP-1)

El GLP-1, es una hormona incretina, y es un regulador fundamental del metabolismo de la glucosa y la homeostasis energética. Estudios animales recientes han puesto de manifiesto su papel en el desarrollo placentario, particularmente en afectaciones como la diabetes, donde se ha encontrado que el tratamiento con antagonistas de este, mejoró la invasión de los trofoblastos placentarios en ratas (73). Por otro lado, en mujeres con obesidad, los niveles maternos de GLP-1 se correlacionan positivamente con el crecimiento fetal. La evidencia científica indica que concentraciones elevadas de GLP-1 en el plasma materno están asociadas con un mayor peso al nacer y un crecimiento fetal excesivo en este contexto. A nivel celular, la activación del receptor de GLP-1 (GLP-1R) en el trofoblasto humano primario desencadena la activación de vías de señalización como PKA, ERK1/2 y mTOR, favoreciendo tanto el crecimiento como la función placentaria (74).

- Péptido inhibidor gástrico (GIP)

Este péptido, perteneciente a la familia glucagón-secretina, y es una hormona incretina clave en la regulación de glucosa postprandial. Está compuesto por 42 aminoácidos y ha sido tradicionalmente identificado como el péptido inhibidor gástrico. Aunque su secreción principal ocurre en las células K del intestino en respuesta a la ingesta de nutrientes, su presencia en el líquido amniótico y su implicación en el metabolismo fetal sugieren que la placenta también podría actuar como una fuente de esta adipoquina durante la gestación (75). Además, cuenta con una amplia expresión tisular de sus receptores (69). Durante el embarazo, el GIP no solo cumple su función insulínica tradicional, sino que también desempeña un papel más amplio en la regulación metabólica. El GIP de origen placentario podría modular el metabolismo materno y fetal, favoreciendo la adaptación de las rutas metabólicas a las demandas gestacionales. A nivel fetal, estudios en humanos han demostrado su asociación con la circunferencia del abdomen fetal y el peso al nacer (76).

- Inhibidor de los activadores de plasminógeno tipo 1 (PAI-1)

El PAI-1 es un regulador fundamental del sistema fibrinolítico y desempeña un importante papel en la función placentaria y salud materno-fetal. La desregulación del PAI-1 se ha asociado con complicaciones del embarazo, como la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) y la pérdida recurrente de la gestación. En la placenta, su expresión en los trofoblastos extravilosos y vasculares contribuye a la modulación de la invasión trofoblástica durante la implantación y placentación, al inhibir la degradación de la matriz extracelular (77). Su desregulación puede provocar fallos de implantación, lo que pone de manifiesto su papel en el mantenimiento de la receptividad endometrial (78). Además, actúa como un posible marcador de insuficiencia placentaria, ya que sus niveles aumentados se correlacionan con una disminución

del oxígeno en sangre y una disminución de la potencia angiogénica (79). Por otro lado, se ha demostrado que su expresión se ve aumentada en estados inflamatorios y en casos de obesidad (80), y además, es un componente del síndrome metabólico, estando sus niveles aumentados en pacientes con obesidad mórbida, y encontrándose que disminuyen cuando se pierde peso (81).

- Resistina

Esta adipoquina, aunque principalmente es secretada por el tejido adiposo blanco y marrón, también lo hace la placenta por las células trofoblásticas principalmente (48) y desempeña un papel en la modulación de la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los lípidos (82). Su expresión es incluso mayor en placenta que en el tejido adiposo abdominal de mujeres no embarazadas (83). Estudios recientes han demostrado que la exposición de las células placentarias a la resistina reduce la biogénesis mitocondrial al regular a la baja el PGC-1 α , reduciendo así la producción de ATP(84), lo que puede contribuir a problemas del metabolismo energético en el feto expuestos a patologías como la diabetes en el útero (85). A nivel de desarrollo fetal, sus concentraciones en sangre de cordón umbilical, se han correlacionado negativamente con el peso fetal, sugiriendo una posible función en la regulación del crecimiento fetal (86).

- Irisina

La irisina es un péptido cuya expresión se encuentra aumentada durante el embarazo, desempeñando un papel clave en la regulación de la homeostasis energética durante la gestación (87). Aunque recientemente se ha demostrado que sus funciones van más allá del almacenamiento de energía, participando también en diversas funciones moleculares como la diferenciación, la inflamación y el estrés oxidativo en diversos sistemas. En concreto, a nivel placentario parece reducir la apoptosis en sus células al activar la vía de señalización Akt, mejorando así la supervivencia celular y reduciendo el estrés oxidativo (88).

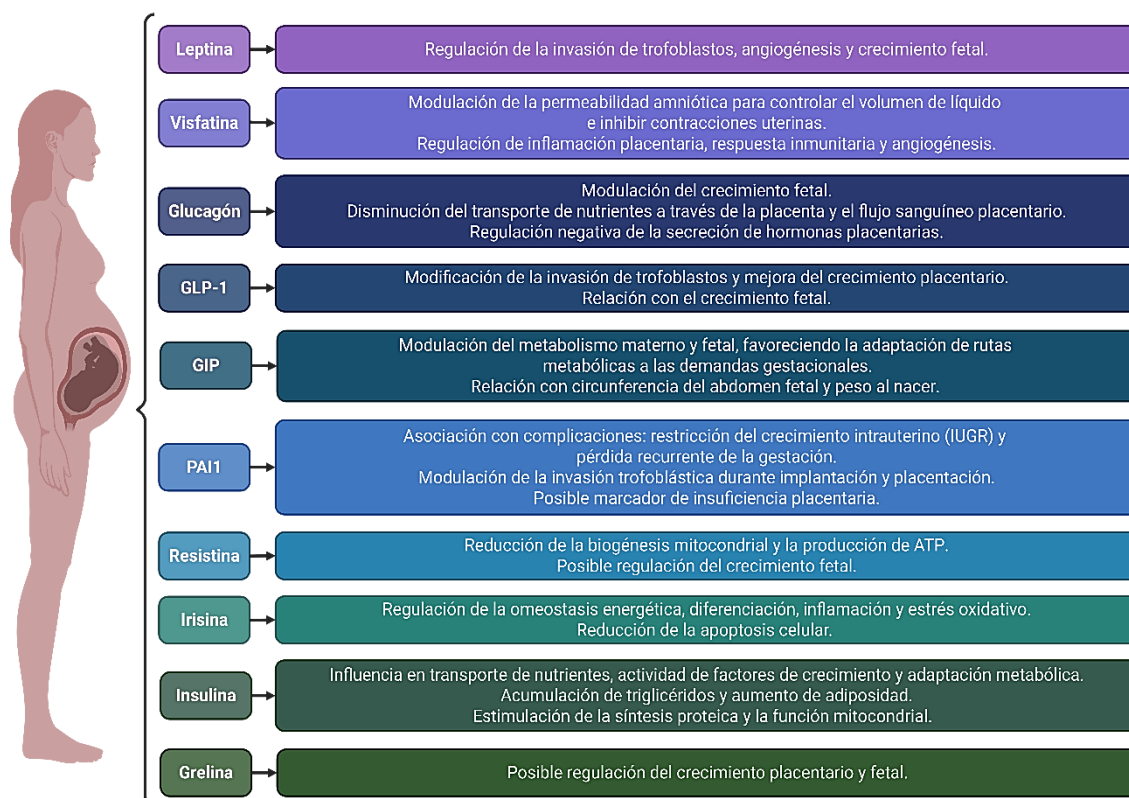


Figura 4. Resumen de las adipocinas más relevantes implicadas en la función placentaria y su función. GLP-1: péptido 1 similar al glucagón; GIP: péptido inhibidor gástrico; PAI1: inhibidor de los activadores de plasminógeno tipo 1. Elaboración propia.

2.3.3. Principales transportadores placentarios de nutrientes

- SNAT1

El papel de este gen es el de transporte aminoácidos de la madre al feto a través de la barrera placentaria. Junto con el SNAT2 y SNAT 4, forman parte del sistema A de transportadores de aminoácidos, todos ellos presentes en el sincitiotrofoblasto de la placenta humana. Aunque el SNAT4 se encuentra más activo en el primer trimestre, mientras que SNAT1 lo está en las últimas etapas (89).

- Transportador de metales divalentes tipo 1 (DMT1)

Este, conocido como transportador de metales divalentes, desempeña un papel crucial al facilitar el transporte de metales esenciales como el hierro, y metales tóxicos como el cadmio. En placenta, se expresa en las células del sincitiotrofoblasto y es el principal responsable del transporte de hierro, liberándolo desde los endosomas al citoplasma (90).

- CD36

CD36, también conocida como translocasa de ácidos grasos, es un componente crucial en la captación y utilización de ácidos grasos. La expresión de CD36 en la placenta facilita el

transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la barrera placentaria, asegurando que el feto reciba un suministro adecuado de estos nutrientes vitales para el crecimiento fetal y la producción de energía. Codifica una glicoproteína transmembrana e influye tanto en el intercambio materno-fetal como en el desarrollo fetal. La importancia de CD36 va más allá del simple transporte de lípidos, ya que también participa en diversos procesos celulares, como la angiogénesis, la inflamación y las respuestas inmunitarias, todos ellos fundamentales durante el embarazo (91).

- Proteínas de unión a ácidos grasos 3 y 4 (FABP3 y FABP4)

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP 1, 3-5), localizadas en el citoplasma del sincitiotrofoblasto, son responsables del tráfico de ácidos grasos a los lugares de esterificación, β -oxidación y posterior transferencia a través de la membrana basal (92).

- Transportador 1 de aminoácidos de tipo L (LAT1)

Este gen media en el transporte de aminoácidos esenciales, además ayuda a la absorción de grandes aminoácidos neutros como la metionina (93), fundamental para el crecimiento y desarrollo fetal y otros como la leucina, la fenilalanina y el triptófano, son cruciales para el crecimiento fetal y el neurodesarrollo (94). Su sobreexpresión activa además la señalización del mTOR, favoreciendo la transferencia de nutrientes al feto (95).

- SLC27A1

Forma parte de la familia de transportadores de solutos, y cumple la función de transportador de ácidos grasos. Se expresa en el sincitiotrofoblasto y su contribución es bidireccional, garantizando el aporte adecuado de ácidos grasos y al mismo tiempo, elimina productos de desecho (96)

- Transportador de glucosa tipo 1 (8GLUT1)

Este gen pertenece al grupo de transportadores GLUT, que son la familia de transportadores de glucosa. La glucosa es la principal fuente de energía para el feto, y su transferencia desde la madre es esencial para un crecimiento fetal normal, ya que en los seres humanos no existe una gluconeogénesis fetoplacentaria significativa. Esta transferencia ocurre exclusivamente a través de la barrera placentaria mediante estos transportadores GLUT, los cuales se encuentran incrustados en las membranas microvellosas y basales de la capa sincitiotrofoblástica placentaria. Dentro de esta familia, el GLUT1 es el transportador más abundantemente expresado en la placenta, lo que resalta su papel crucial en el suministro de glucosa al feto. Por ello, la regulación de la expresión de estos transportadores

sincitiotrofoblásticos resulta fundamental para satisfacer las necesidades energéticas fetales y permitir un desarrollo (97, 98).

2.4. Nutrición en el embarazo

El embarazo, como se ha definido previamente, es una etapa fisiológica en la que las necesidades nutricionales y energéticas cambiarán con respecto a las que se tenían previas a la concepción, consecuencia de los cambios fisiológicos experimentados en el organismo de la mujer. El aporte de nutrientes durante el proceso del embarazo debe ser el adecuado no solo en cuanto a cantidad, sino también en cuanto a calidad, para asegurar una correcta embriogénesis y desarrollo fetal (99).

La vida temprana, entendiendo esta como el periodo comprendido entre la concepción hasta aproximadamente los dos años de vida, representa una etapa crucial de plasticidad, durante la cual las células y los órganos en desarrollo responden y se adaptan a diversas influencias ambientales que afectan a la madre. Factores como el estrés, las infecciones, el consumo de alcohol, el tabaquismo, las enfermedades crónicas, la obesidad y la desnutrición pueden modificar estos procesos, influyendo en la susceptibilidad individual a desarrollar enfermedades en la vida adulta (100). Durante la gestación, el feto es particularmente vulnerable a las influencias del entorno, especialmente a la disponibilidad de nutrientes y al equilibrio energético, los cuales son fundamentales para su crecimiento y desarrollo óptimos.

Desde un punto de vista nutricional y metabólico, la gestación se puede dividir en dos fases, una primera anabólica, en la que el organismo materno experimenta adaptaciones dirigidas a la acumulación de reservas energéticas, principalmente a través del almacenamiento de ácidos grasos y proteínas, así como por modificaciones en la sensibilidad a la insulina. seguida por una fase catabólica, en la cual dichas reservas maternas son movilizadas y transferidas al feto a través de la placenta, con el propósito de satisfacer las demandas energéticas y nutricionales del feto para su adecuado crecimiento y desarrollo (101).

2.4.1. Necesidades nutricionales durante el embarazo

Durante el periodo del embarazo las necesidades energéticas tanto de macro como de micronutrientes se ven modificadas para, como se ha mencionado anteriormente, satisfacer no solo las necesidades energéticas de la mujer, sino también para satisfacer las del feto en formación (4).

Con el fin de pautar unas necesidades específicas acorde a cada población, en España se propone el término Ingestas Nutricionales de Referencia (INR), basado en el concepto de ingesta de referencia de la población (PRI, del inglés *Population Reference Intake*), y representa el nivel de ingesta de nutrientes adecuado para prácticamente la totalidad de una muestra (97-98% del

total). Estas INR fueron actualizadas por última vez en el año 2019 por el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), y son una adaptación de las homónimas *Dietary References Values* (DRV), a nivel europeo pautadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) (102).

Las necesidades nutricionales aumentan a través de los tres trimestres de embarazo, sin embargo, la evidencia científica actual sugiere que las mujeres embarazadas sufren carencias tanto de micro como de macronutrientes (103).

2.4.1.1. *Macronutrientes*

Los macronutrientes engloban a los hidratos de carbono, las proteínas y las grasas y son los encargados de aportar energía y componentes esenciales para mantener la vida (104). Sus requerimientos varían según la edad y el estado fisiológico (105). En la tabla 2 se muestran las recomendaciones diarias de referencia para población embarazada española.

2.4.1.1.1. *Hidratos de carbono y fibra*

Los hidratos de carbono Son la principal fuente de energía para ambos, madre y feto, y, además, van a influir directamente los niveles de glucosa maternos, que, a su vez, afectarán al crecimiento y desarrollo fetal (1). Estos deben aportar en torno al 50-60% de las kilocalorías totales ingeridas, en torno a 175 g/día, una ingesta inferior a esta puede dar lugar a la movilización de reservas proteicas maternas para usarlas como fuente de energía fetal (106).

El tipo, cantidad y calidad de estos carbohidratos, pueden afectar al desarrollo de diabetes mellitus gestacional, a las necesidades maternas de insulina y al perfil metabólico de la descendencia (107). En este sentido, el consumo de fibra es beneficioso de por si en cualquier etapa de la vida, pero durante el embarazo, su aumento parece tener efectos positivos tanto en la salud de la madre, como en el alivio del estreñimiento causado en esta situación fisiológica (1), así como una reducción del aumento de peso durante el embarazo, el riesgo de dislipidemia, y de preeclampsia, además de estar asociado una menor ingesta con aumento del riesgo de obesidad (108).

2.4.1.1.2. *Proteínas*

El crecimiento fetoplacentario, así como algunos órganos maternos como el útero, necesitan un aporte elevado de aminoácidos y proteínas, ya que aproximadamente unos 925 g de proteína se estima que son depositadas en estos tejidos, correspondiendo a unos 0.95 g/kg/día, aportando torno al 12-15% del total de calorías ingeridas (106).

Una dieta baja en proteína durante el embarazo se ha relacionado con bajo peso al nacer (109) y un aumento de proteínas procedente de los lácteos se ha asociado con aumento del crecimiento fetal (110) sin embargo, si estas proteínas proceden de alimentos cárnicos, un mayor

consumo se asocia puede aumentar el riesgo de sobrepeso en la descendencia (111). Por lo tanto, un aumento de proteínas de calidad procedentes de productos cárnicos, lácteos y legumbres de calidad de unos 25 g con respecto a los de una mujer no gestante, debe ser considerado (112). En mujeres que sigan un patrón de dieta vegetariano, el consumo de estas debe aumentarse a través de un mayor consumo de legumbres, tofu, nueces y semillas (113).

2.4.1.1.3. Lípidos

Con respecto a este macronutriente, sus recomendaciones generales establecen que deben cubrir un 20-35% de la energía total consumida. Al igual que con los hidratos de carbono y las proteínas, no solo importa la cantidad total consumida, sino también la calidad y procedencia de las grasas. En este sentido, se aconseja favorecer el consumo de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados frente a los saturados (114).

Los ácidos grasos poliinsaturados, en particular el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), desempeñan un papel fundamental durante el embarazo, ya que contribuyen al crecimiento y desarrollo adecuado de los tejidos tanto del feto como de la madre (115). Las guías nutricionales recomiendan que menos del 10% de las calorías diarias provengan de grasas saturadas, mientras que la mayoría debe provenir de grasas saludables, como las monoinsaturadas y en torno a un 10% de las poliinsaturadas (116).

Una ingesta equilibrada de lípidos y sus diferentes tipos tiene un impacto significativo en la salud del recién nacido. Un exceso, especialmente de grasas saturadas, se ha relacionado con un mayor riesgo de obesidad infantil, resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares (117).

Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados destacan los omega-3 (como el ácido alfa-linolénico) y los omega-6 (como el ácido linoleico), ambos considerados esenciales, ya que el organismo no puede sintetizarlos. Sus derivados de cadena larga, el ácido araquidónico (AA) y el DHA, son componentes estructurales clave de las membranas celulares, especialmente en el sistema nervioso y la retina. Por esta razón, una deficiencia durante el embarazo se ha asociado con problemas en el desarrollo visual y cognitivo del recién nacido. Aunque, como se comentaba anteriormente, el consumo de AGPI se recomienda que no exceda el 10% de las kcal totales, asegurando a su vez una ingesta diaria de 2 g de ácido alfa-linolénico y 200 mg de DHA al día (118).

Tabla 2. Ingestas nutricionales de referencia de macronutrientes para población embarazada española según la AESAN.

Nutriente	INR para población embarazada		
Hidratos de carbono (%de energía)	45-60%		
De los cuales fibra	25 g/día		
Proteínas (incremento sobre las recomendaciones basales)	1^{er} trimestre	2^o trimestre	3^{er} trimestre
	+ 1 g/día	+ 9 g/día	+ 28 g/día
Lípidos totales (%de energía)	20-35 %		
Ácido linoleico (%de energía)	4 %		
Ácido α -linolénico (% de energía)	0.5 %		
EPA + DHA	250 mg/día		
DHA	+100-200 mg/día		

INR: Ingestas Nutricionales de Referencia; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexanoico.

2.4.1.2. Micronutrientes

Las sustancias químicas conocidas como micronutrientes permiten que los sistemas metabólicos y bioquímicos del organismo funcionen sin problemas cuando se ingieren en pequeñas cantidades. El déficit o la falta de alguno de ellos puede provocar deficiencias en el crecimiento, problemas en el desarrollo de las funciones cognitivas y fisiológicas e inmunodeficiencias (119).

Sin embargo, es importante señalar que un exceso de ellos también afectará negativamente a la salud, lo que pone de relieve la importancia de establecer una dosis adecuada para cada situación específica (120).

2.4.1.2.1. Vitaminas

Se definen como moléculas orgánicas necesarias en pequeñas cantidades ya que participan activamente en diversos procesos del metabolismo. La gran mayoría son nutrientes esenciales, por lo que no son sintetizadas por el organismo, y por ende deben consumirse a través de la dieta. Se clasifican en dos grupos según su solubilidad (119).

- Hidrosolubles: vitaminas del grupo B (B1, B2, B3, B6 y B12) y la vitamina C
- Liposolubles: A, D, E y K

Sus requerimientos durante la gestación están aumentados debido a las demandas del feto, la formación de la placenta y el aumento del volumen plasmático (121), aunque por otro lado, un consumo excesivo puede ser perjudicial para el feto en desarrollo. Hay ciertas vitaminas cuya

suplementación debe considerarse seriamente en el embarazo tales como el ácido fólico y la vitamina B12 (122).

En la Tabla 3, se resumen las principales funciones en el embarazo y desarrollo del feto y su recomendación diaria en población embarazada española.

Tabla 3. Vitaminas de ambos grupos, principales funciones en el embarazo y recomendaciones diarias para población de embarazadas españolas según AESAN.

Vitamina	Principales funciones en el embarazo	INR para embarazadas españolas
Vitamina A	Crecimiento, diferenciación celular y desarrollo correcto del feto	800 µg/día
Vitamina D	Absorción y utilización del calcio. Buen estado inmunológico del recién nacido	15 µg/día
Vitamina E	Mejora del estado inmunológico del recién nacido. Acción antioxidante	12 µg/día
Vitamina K	Su déficit se ha relacionado con muerte fetal	70 µg/día
Vitamina C	Desarrollo temprano del feto. Formación de colágeno y tejidos.	85 µg/día
Ácido fólico	Prevención de malformaciones congénitas del tubo neural	500 µg/día
Vitamina B12	Formación del sistema nervioso y producción de glóbulos rojos	2.6 µg/día

INR: Ingestas Nutricionales de Referencia.

2.4.1.2.2. Minerales

Son sustancias inorgánicas, todos ellos esenciales, y claves para el crecimiento y la salud (119). Los minerales se encuentran en los alimentos en diversas formas, mezclados o combinados con diferentes macronutrientes. Los requerimientos de estos se ven aumentados también durante el embarazo, y en algunos casos cobran especial importancia, como en el del calcio, para conseguir una correcta mineralización del esqueleto del feto y cubrir las necesidades de la madre,

que desviará la gran parte a la nutrición fetoplacentaria (123), y el hierro que necesita cubrir las pérdidas habituales y cubrir el aumento de masa eritrocitaria, sumado a las necesidades del feto y la placenta (106). En la tabla 4 se muestra un resumen de los minerales imprescindibles en el embarazo, su función y los requerimientos diarios para población española embarazada.

Tabla 4. Minerales, principales funciones en el embarazo y recomendaciones diarias para población de embarazadas españolas según la AESAN.

Mineral	Principales funciones en el embarazo	INR para embarazadas españolas
Calcio	Menor riesgo de parto pretérmino, mejora de la tensión, mejora de la salud ósea materna.	1000 mg/día
Hierro	En la madre, ayuda a cubrir el aumento de masa eritrocitaria. En el feto, depósito hepático necesario en las primeras etapas de vida.	27 mg/día
Zinc	Crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. Ayuda a hormonas relacionadas con el crecimiento óseo como testosterona, hormonas tiroideas e insulina	10 mg/día
Yodo	Correcto funcionamiento del Sistema Nervioso Central ya que interviene en la síntesis de hormonas tiroideas	200 µg/día
Selenio	Altas dosis de este se ha relacionado con preeclampsia	60 µg/día

INR: Ingestas Nutricionales de Referencia.

2.4.1.3. Polifenoles

Los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles dietéticos, abarcan una amplia y diversa categoría de más de 8,000 sustancias con actividad biológica, que se encuentran en alimentos de origen vegetal. Representan la fracción más abundante de antioxidantes de la dieta y conforman el grupo principal de sustancias no nutritivas (124). Las fuentes alimentarias más

ricas en estos son las frutas y ciertas bebidas como los zumos, vino, té, café, chocolate y la cerveza, aunque también están presentes, aunque en menor medida en vegetales, legumbres secas y cereales (125).

Se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con grupos hidroxilo (126), y se clasifican de diferentes formas, aunque la más común es en base a la cantidad de estos anillos y en los componentes estructurales que los interconectan. Los mayores grupos de polifenoles, según la base de datos más utilizada en países europeos Phenol-Explorer, son flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (127).

- *Flavonoides*, estos se caracterizan por tener 2 anillos de benceno conectados por un tercer carbono y conforman el 60% aproximadamente de todos los polifenoles conocidos (128). Se consideran potentes antioxidantes de la dieta, ya que previenen la formación de especies reactivas del oxígeno. Pueden inducir enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa, a la par que inhiben aquellas prooxidativas como la fosfolipasa 2. Efectos quimipreventivos, cardioprotectores, antineurodegenerativos y actividad antimicrobiana, son otros de los efectos que se le atribuyen (129).
- Los *lignanos*, estos están formados por 2 unidades de fenilpropano y la mayoría no son absorbibles en el tracto gastrointestinal, permitiéndose llegar al intestino grueso para ser metabolizados por la microbiota intestinal (128, 130). Estos, además de su función antioxidativa, se les atribuyen también actividad anticancerígena, efectos cardio protectores y actividad antimicrobiana (129).
- Los *estilbenos*, cuya estructura básica está compuesta por dos anillos bencénicos (fenilos) unidos por un puente de dos átomos de carbono con un doble enlace. Uno de los más conocidos dentro de este grupo es el resveratrol, presente en el vino tinto y en algunas frutas como las uvas y los arándanos (131). Estos ayudan a la mejora del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (132).
- Los *ácidos fenólicos*, son compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de un anillo fenólico unido a un ácido carboxílico (133). El contenido de estos en alimentos es particularmente bajo y, salvo en alimentos procesados, no suelen encontrarse en forma libre (128, 134). Propiedades como ser gastroprotectores, antidiabéticos, cardioprotectores, y como no, potentes antioxidantes son las que se les atribuyen a este grupo de polifenoles (129)

Es importante tener en cuenta que, los polifenoles que más se consumen con la dieta no serán aquellos más biodisponibles, eso dependerá de su estructura química. Dependiendo de esta, los polifenoles pueden ser absorbidos y metabolizados de distintas maneras en el cuerpo. Algunos de estos polifenoles se presentan unidos a moléculas de glucosa, glicosilados. Antes de ser

absorbidos, enzimas intestinales deben romper esos enlaces. En cambio, los polifenoles no glicosilados pueden traspasar la barrera intestinal directamente por difusión pasiva. Una vez que alcanzan el torrente sanguíneo, llegan al hígado donde serán modificados mediante procesos como metilación, sulfatación o glucorinidación. Dependiendo de cuanto se transformen seguirán diferentes caminos, si se han modificado débilmente, vuelven a la sangre y se eliminarán mediante orina; si han sufrido muchas modificaciones, se excretan en la bilis y regresan al intestino grueso, donde las bacterias intestinales pueden procesarlos nuevamente, permitiendo que algunos sean reabsorbidos en la sangre o bien, eliminados con las heces (135).

Estos micronutrientes son de gran interés debido a la evidencia reciente que sugiere su participación en la prevención de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas, además de algunos tipos de cáncer (136), por ello, son tan importantes en la nutrición humana.

En mujeres embarazadas, estudios recientes han mostrado que es donde se produce el mayor consumo de polifenoles a través de la dieta, 2 gramos aproximadamente al día (137), frente a 1 g de ingesta media de polifenoles en población general (125). Aunque, como ya se ha explicado anteriormente, su biodisponibilidad va a diferir mucho dependiendo del tipo de polifenol que sea. Se han encontrado niveles bajos de polifenoles en la placenta (138), y su transporte a través de la placenta implica mecanismos de transporte selectivo, por lo que son capaces de atravesar la barrera placentaria y por tanto, pueden tener efectos biológicos en la descendencia (138). Los polifenoles desempeñan un papel bien documentado como antioxidantes, ya que actúan como donadores de electrones o hidrógeno, lo que contribuye al aumento de la capacidad antioxidante en el plasma y a la mejora de los indicadores de estrés oxidativo en la unidad fetoplacentaria. Estos efectos son relevantes en diversas patologías asociadas al embarazo. Más allá de su función antioxidante, los polifenoles dietéticos y sus metabolitos pueden influir en las células mediante la modulación de vías de señalización, como las reguladas por la proteína quinasa y la lípido quinasa (139). Además, tienen la capacidad de alterar la actividad de diversas enzimas y receptores celulares, así como de afectar la expresión y función de distintos transportadores de membrana (140). En este contexto, la placenta representa una diana clave para la acción de los polifenoles, ya que podrían impactar en la absorción de nutrientes y otras sustancias bioactivas provenientes de la circulación materna (141).

Por otro lado, en cuanto a salud materna se refiere, gracias a las propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias, antioxidantes y vasculoprotectoras, diversos estudios tanto en animales como en humanos, han encontrado prometedores resultados de su uso en patologías del embarazo como la preeclampsia (142-144). Otra patología en la que podrían suponer una ayuda extra a los tratamientos farmacológicos y nutricionales convencionales es la diabetes

mellitus gestacional (DMG), la cual concurre con un estado de inflamación crónica subclínica (145), para lo cual, el consumo de polifenoles en la dieta podría ser clave en su tratamiento gracias a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes, así como a sus efectos positivos sobre la secreción de insulina y la vía de señalización de la insulina (146, 147).

Por lo tanto, su consumo durante el embarazo requiere una especial atención, ya que teniendo en cuenta la posible influencia de estos en los mecanismos de adaptación materna y en el desarrollo fetal, deben tenerse en cuenta tanto los beneficios potenciales para la salud como los posibles efectos adversos que pueden provocar.

2.5. Microbiota intestinal y embarazo

2.5.1. Concepto de microbiota y generalidades.

El término microbioma, abarca todos los microorganismos que habitan y viven de forma simbiótica en el cuerpo humano, el genoma de estos, y los metabolitos que estos secretan y que van a interactuar con el huésped. En total, alrededor de 10^{13} microorganismos conviven en todo el cuerpo humano (148). Este microbioma es esencial para el desarrollo humano y desempeña un papel significativo en diversos procesos fisiológicos vitales, como las reacciones metabólicas y las respuestas inmunitarias. Se puede considerar como un genoma en constante interacción con el medio ambiente, por ello una alteración en la composición o funcionamiento del mismo, conocida como disbiosis, puede producir alteraciones en la respuesta inmune y ocasionar enfermedades (149) estando también estrechamente relacionado con la aparición de gran variedad de enfermedades.

Por otro lado, el término microbiota intestinal, hace referencia a todos estos microorganismos que se encuentran exclusivamente en el intestino humano, albergando este a billones de microbios, que en su mayoría son bacterias, habiéndose descrito más de 3000 especies bacterianas (150). Concretamente, en el tracto gastrointestinal, la microbiota es una comunidad bacteriana compleja, dinámica y balanceada que juega un papel relevante en la salud del huésped, ya que está involucrada en numerosas funciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas.

La siguiente clasificación (Figura 5) presenta las bacterias desde el nivel más amplio, el reino, en este caso Bacteria, hasta el más específico, la especie.

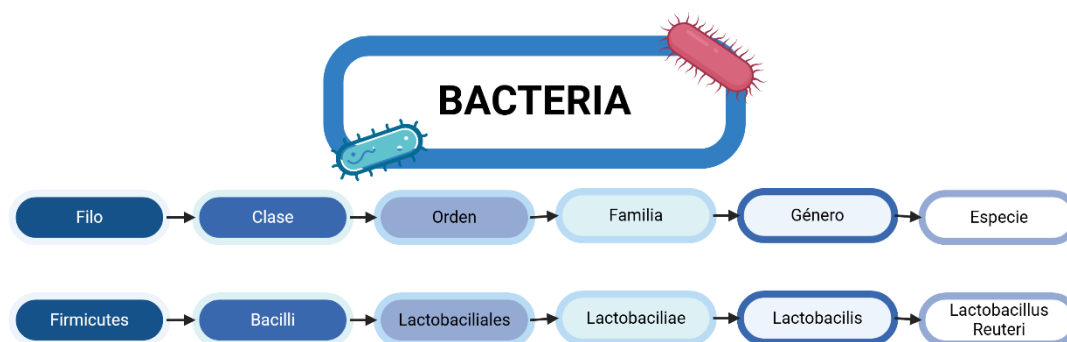


Figura 5. Esquema del orden filogenético de taxones, y ejemplos de ellos, del reino Bacteria. Elaboración propia.

A nivel de filo, aquellos que predominan en la microbiota intestinal de una persona adulta sana son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia, constituyendo los dos primeros el 90% del total de bacterias que colonizan el intestino (151). Hay que tener en cuenta que, esta microbiota no solo se conforma de bacterias, sino también de arqueas, hongos y virus que, aunque en menor medida, son igualmente importantes ya que la conservación de todos estos microorganismos y su equilibrio es crucial para la supervivencia (152, 153).

2.5.2. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota desempeña una amplia variedad de funciones que van a influir en todo el organismo. A continuación, se describen brevemente todas sus funciones.

2.5.2.1. Barrera y protección

La microbiota intestinal constituye un componente clave en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, impidiendo el paso de sustancias nocivas hacia el torrente sanguíneo, mientras que permite la absorción de nutrientes siempre que se mantengan niveles sanos en las abundancias de las bacterias que la conforman (154). Además, contribuye al mantenimiento de las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales, las cuales forman parte esencial de la barrera epitelial que delimita el medio interno de la luz intestinal. Esta estructura proporciona impermeabilidad a la barrera intestinal, cuya función principal es prevenir la translocación de patógenos desde la mucosa hacia el interior del huésped (155). Una alteración en la composición de la microbiota intestinal, puede conducir a una disfunción o permeabilidad de esta barrera, aumentando el riesgo enfermedad crónica e inflamación (156) (Figura 6).

2.5.2.2. *Metabólica*

Desempeña un papel fundamental en procesos metabólicos al influir en procesos como la extracción de energía, la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos. Las bacterias intestinales producen enzimas que ayudan a descomponer componentes dietéticos complejos como los polisacáridos y las proteínas, en moléculas más simples para la correcta absorción o utilización por parte del huésped. De hecho, estas bacterias pueden absorber entre un 10 % y un 30 % de la energía total consumida a través de los alimentos, generando metabolitos esenciales para el organismo, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), entre otros (157). En este contexto, los carbohidratos desempeñan un papel fundamental, especialmente aquellos que no se digieren hasta alcanzar el colon. Estos, conocidos como fibra dietética, incluyen lignina, polisacáridos no amiláceos, almidón resistente y oligosacáridos (158). Las diversas enzimas que la microbiota produce, permiten descomponer los hidratos de carbono y facilitar su digestión (159). En el caso de las proteínas, aquellas que no han sido digeridas se descomponen en péptidos, aminoácidos y otros metabolitos gracias a la acción de enzimas como las proteasas y peptidasas bacterianas (160). Además, la microbiota también tiene la capacidad de convertir los ácidos biliares primarios en secundarios mediante la acción de deshidroxilasas bacterianas. Por otro lado, la disbiosis de la microbiota intestinal se ha relacionado con trastornos metabólicos como la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (161) (Figura 6).

2.5.2.3. *Modulación del sistema inmunitario*

Por otro lado, desempeña un importante papel protector al producir metabolitos asociados al sistema inmunológico, como los ya mencionados AGCC a través de la fermentación, el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR) y las poliaminas, todos ellos implicados en procesos inmunológicos como el reconocimiento de células cancerígenas por los AHR (162).

Influye tanto en respuestas innatas como adaptativas. La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por su capacidad para reconocer y diferenciar entre microorganismos patógenos y comensales mediante el uso de receptores específicos. Además, la barrera intestinal cuenta con una capa de mucosa compuesta por glicoproteínas, cuya estructura viscosa unifica los epitelios intestinales y contribuye a la impermeabilidad de la mucosa intestinal. Esta propiedad impide la translocación de bacterias patógenas a través de la barrera intestinal, al tiempo que le confiere una función estructural esencial en la homeostasis del tracto gastrointestinal (163). Ciertas especies bacterianas, además, son capaces de modular la producción de citokinas y anticuerpos, mientras que otras mejoran la actividad de células inmunitarias como macrófagos y células T (164) (Figura 6)

2.5.2.4. Influencia neuropsicológica

La microbiota también desempeña un papel en la función neurológica, destacándose en los últimos años el estudio del eje intestino-cerebro, un sistema de comunicación bidireccional mediado por el sistema nervioso entérico, la parte más compleja del sistema nervioso periférico (165). Este eje permite el intercambio de señales a través de neurotransmisores, hormonas y metabolitos microbianos influyendo en el estado de ánimo, la cognición y el comportamiento. El equilibrio de los microorganismos que habitan en el intestino es fundamental para el mantenimiento de estas funciones, y su alteración, la ya mencionada disbiosis, puede desencadenar una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado. Esta inflamación se asocia con un aumento en la prevalencia de diversas enfermedades no transmisibles mencionadas anteriormente como alergias, trastornos inflamatorios intestinales, intolerancias alimentarias y obesidad (166), así como con alteraciones neurológicas y cognitivas (167). De este modo, las investigaciones más recientes han demostrado una asociación entre la disbiosis intestinal y trastornos de la salud mental como depresión, ansiedad (168) y trastorno del espectro autista (169) (Figura 6).

2.5.3. Cambio de la microbiota durante el embarazo.

Así como diversos procesos fisiológicos se ven afectados por el embarazo, la microbiota es otro factor que se verá afectado en esta etapa, tanto en composición como en diversidad. Estos cambios no solo van a ocurrir en la microbiota intestinal, sino también en la vaginal y la oral (170).

El embarazo es un momento crítico que depende de un delicado equilibrio entre las necesidades físicas de la madre y del feto, y durante este proceso aumentará la translocación bacteriana (171). Este cambio de la microbiota se produce de forma progresiva, siendo la microbiota del primer trimestre muy similar a la de una mujer no gestante de las mismas características, siguiendo el clásico patrón de abundancia de Bacteroidetes y Firmicutes. Conforme avanza el embarazo, se alterarán todas las microbiotas del organismo siendo sus consecuencias a nivel intestinal de gran significancia, ya que se produce una pérdida de gran parte de la diversidad (172-174). A partir del segundo trimestre, las proteobacterias, las bifidobacterias, las actinobacterias y algunas cepas específicas de *Lactobacillus*, que se consideran productoras de ácido láctico, aumentan al mismo tiempo que se reduce la cantidad de bacterias productoras de butirato, como las especies del género *Faecalibacterium*, con actividades antiinflamatorias (175). Así, se podrá observar cómo se produce una disminución de bacterias productoras de butirato como del género *Faecalibacterium*, mientras que, de otras, como las bacterias productoras del ácido láctico, se verán aumentadas. En el tercer trimestre, se produce un aumento de proteobacterias, estreptococos y algunos tipos específicos de lactobacilos (173).

En el momento del nacimiento es cuando el recién nacido entra por primera vez en contacto directo con la microbiota materna, y se ha demostrado que existe una gran similitud entre el intestino del recién nacido y el de la madre, similitudes apreciables incluso con la leche materna. Por lo tanto, es a partir de este mismo momento cuando el recién nacido se va a ver expuesto a grandes comunidades microbianas procedentes del medio que le rodea, tanto en el momento del nacimiento, como inmediatamente después (176) (Figura 6).

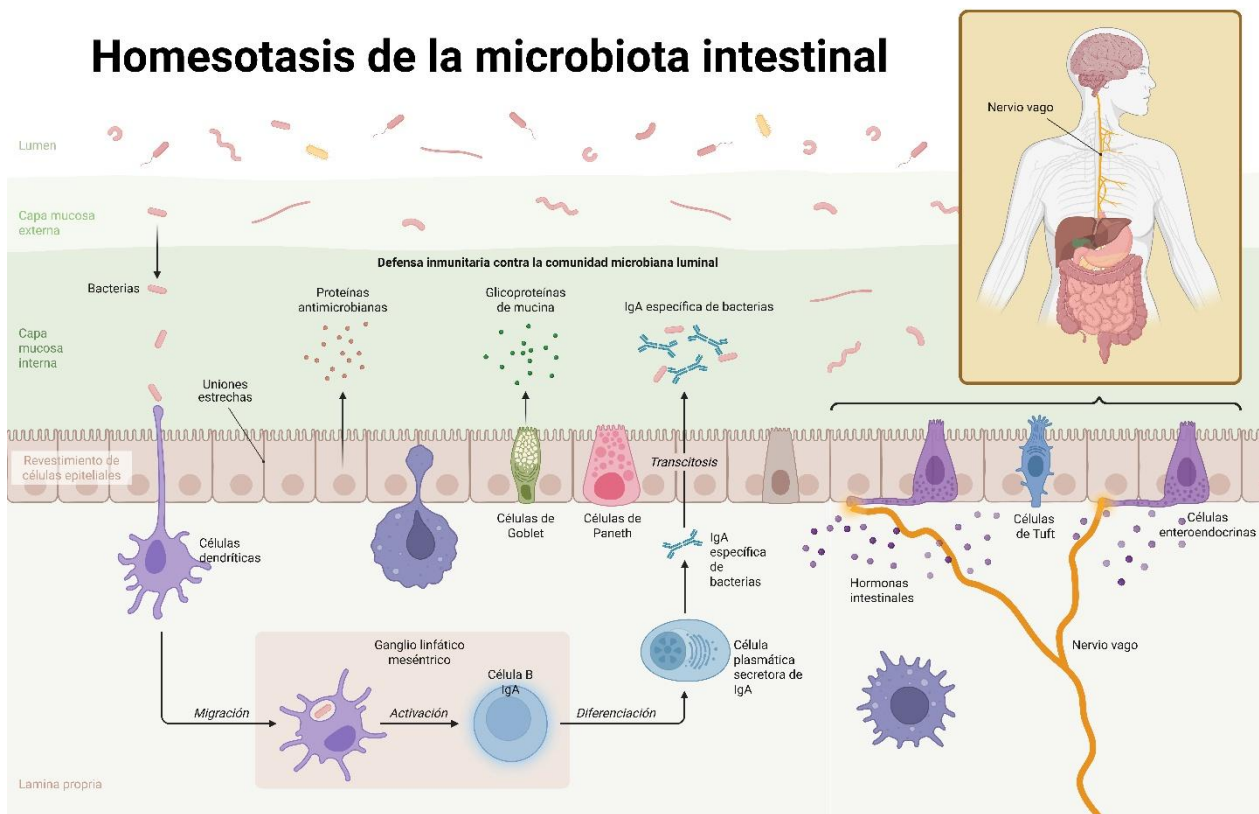


Figura 6. Esquema resumen de las funciones de la microbiota intestinal. Elaboración propia.

2.6. Programación metabólica temprana

La “hipótesis del origen fetal” propone que el entorno nutricional y hormonal del feto desencadenará cambios en la expresión génica, que dará lugar a cambios adaptativos en la fisiología y el metabolismo, que podrían comprometer la salud del feto (177), estos son los denominados cambios epigenéticos, conocidos como mecanismos en los que el ADN y las proteínas que interaccionan con él, sufren ciertas modificaciones químicas, pero sin alterar el código genético (178).

La programación temprana, por tanto, es un proceso de adaptación a las condiciones ambientales, durante las primeras etapas de la vida, que puede alterar la expresión de los genes y afectar a las funciones y estructuras de diversos órganos y tejidos, aumentando la susceptibilidad

y la probabilidad de que el individuo desarrolle determinados trastornos metabólicos en la edad adulta (179).

El enfoque de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) evolucionó de estudios epidemiológicos de mortalidad infantil y adulta. Un trío de artículos científicos publicados en The Lancet por Barker y su equipo (180, 181) representan quizás las primeras publicaciones más influyentes en esta área que llevaron a la hipótesis de los orígenes fetales (a menudo llamada "hipótesis de Barker"). Para desarrollar la hipótesis, Baker y col. (180) describieron cómo la desnutrición fetal en diferentes las etapas de la gestación se pueden vincular a diferentes fenotipos de nacimiento, cada uno vinculado a adaptaciones asociadas con cambios en las concentraciones de hormonas placentarias y fetales y más tarde con diferentes anomalías metabólicas, que modifican permanentemente la estructura, función y metabolismo y aumenta el riesgo de enfermedad metabólica y coronaria en la edad adulta.

Esta programación fetal puede condicionar el crecimiento y desarrollo neonatal en muchos sentidos, pudiendo ayudar en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles tan presentes hoy en día en nuestra sociedad, como la obesidad, el sobrepeso, la diabetes mellitus 2, hipertensión. En la Figura 7 se resumen los factores más relevantes que pueden influir en esta programación metabólica temprana.

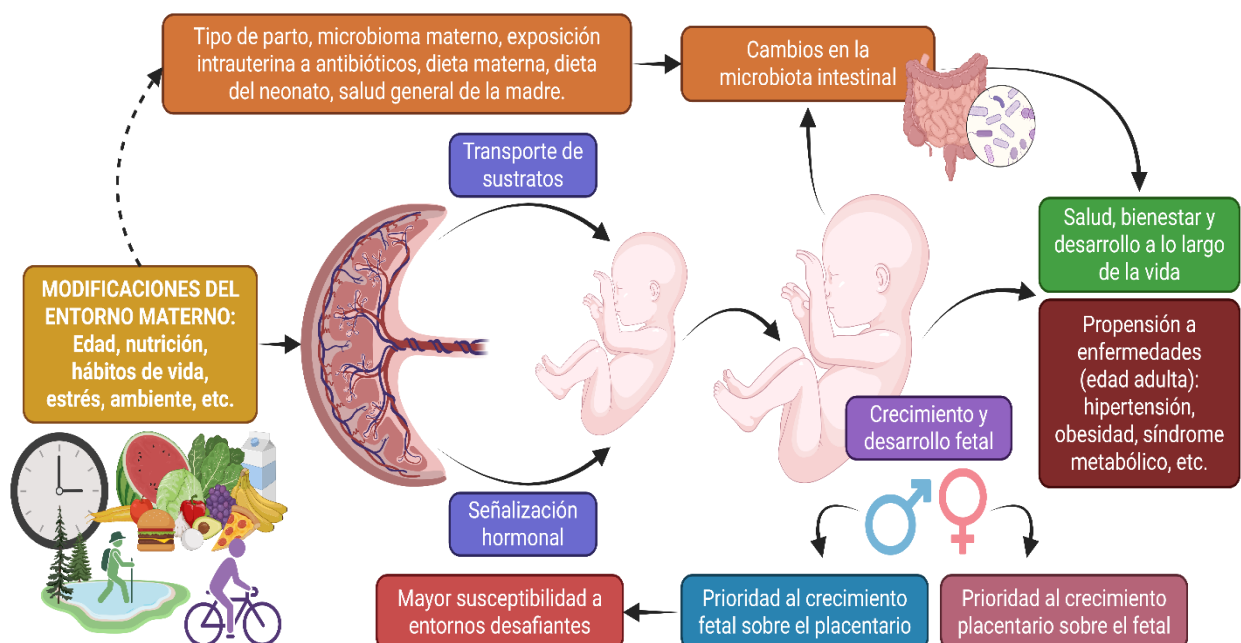


Figura 7. Resumen de factores que afectan potencialmente a la programación metabólica temprana. Elaboración propia.

2.6.1. Programación placentaria

Como se ha comentado anteriormente, la placenta es la interfaz entre madre y feto, y realiza diversas funciones destinadas a asegurar la supervivencia del feto. Por lo tanto, se puede afirmar que la placenta es un órgano clave en la programación fetal, ya que puede modificar tanto la señalización hormonal como la cantidad de sustratos que llegan al feto, lo que impacta en su desarrollo. Numerosos estudios han evidenciado alteraciones de estos procesos en complicaciones en el embarazo como preeclampsia o retraso del crecimiento intrauterino, además, se ha reportado que muchas de estas complicaciones pueden afectar a la expresión de transportadores de glucosa y aminoácidos en la placenta (182). Estos hallazgos sugieren que un desarrollo placentario inadecuado podría ser la causa de un retraso en el crecimiento intrauterino y, en consecuencia, de una programación fetal alterada.

Un aspecto relevante es que la placenta es sintetizada por el feto a partir del trofoblasto, por lo que comparte su sexo. Esto ha llevado a la hipótesis de que existen diferencias en la respuesta de placentas que albergan fetos masculinos y femeninos frente a factores estresantes durante la gestación, lo que podría contribuir al dimorfismo sexual en la programación fetal de enfermedades cardiometabólicas (183).

La respuesta placentaria y la capacidad de adaptación a entornos adversos para la madre pueden verse modificadas por el sexo del feto (184). Se ha sugerido que los varones tienden a priorizar el crecimiento fetal sobre el crecimiento placentario, siendo así más susceptibles a entornos desafiantes que las hembras (que suelen tener placentas más grandes). De hecho, también se han demostrado diferencias sexuales en la respuesta de la placenta a entornos gestacionales alterados, incluida la hipoxia de mediados a finales del embarazo (185, 186), el asma materna (187) y los cambios en la dieta materna (188). En cuanto a la edad materna avanzada, el dimorfismo sexual solo se ha abordado en modelos animales (189), y nunca analizando su posible asociación con los niveles de adipoquinas.

2.6.2. Programación nutricional

La nutrición materna durante el embarazo ejerce una profunda influencia en el desarrollo fetal, con consecuencias de gran alcance para la salud y el bienestar de la descendencia a lo largo de la vida. Este fenómeno, conocido como programación fetal o programación del desarrollo, pone de relieve la notable plasticidad del feto en desarrollo en respuesta a las señales ambientales, en particular las relacionadas con la dieta materna (190). La intrincada interacción entre la nutrición materna y la programación fetal subraya la importancia de optimizar la ingesta dietética materna durante la gestación para promover un desarrollo fetal saludable y reducir el riesgo de enfermedades crónicas en etapas posteriores de la vida. La programación fetal sirve de marco para comprender el desarrollo de la salud y la enfermedad, haciendo hincapié en las condiciones

prenatales (191). Esto implica desnutrición o estímulos externos que podrían alterar la fisiología y el metabolismo del cuerpo (192). El sistema nervioso central y el sistema inmunitario del feto son especialmente susceptibles a las alteraciones provocadas por factores ambientales, como la malnutrición, las toxinas y el estrés, que pueden afectar a los sistemas fisiológicos maternos (193). El peso fetal anormal al nacer, se cree que puede verse influenciado por una mala alimentación materna, induciendo una mayor propensión a desarrollar enfermedades como hipertensión, síndrome metabólico y obesidad más adelante en la vida (194). .

2.6.3. Programación mediada por la microbiota

Desde edades muy tempranas, las distintas microbiotas del organismo comienzan a establecerse, y son susceptibles de alteraciones debido principalmente a la edad, nutrición, el medio ambiente y los hábitos de vida en general (195).

La microbiota intestinal se establece desde los primeros días de vida. Los 1000 primeros días de vida son un momento crucial para el establecimiento de esta, y su composición estará condicionada por el tipo de parto (196), el microbioma materno, la exposición intrauterina a antibióticos (197), la dieta materna (198) y la dieta del propio neonato y por supuesto la salud general de la madre, donde factores como el estrés entran en juego (199) y a su vez condicionará etapas posteriores como la adolescencia (152, 153) y el envejecimiento (200) a través de la modulación de las funciones microbianas anteriormente descritas, modulación del sistema inmunitario, salud metabólica y neurodesarrollo.

2.6.4. La edad materna como condicionante en la programación fetal

El desarrollo fetal y la infancia son etapas de la vida caracterizadas por el rápido crecimiento, desarrollo y maduración de los órganos. Las alteraciones bioquímicas, metabólicas y endocrinas asociadas a la EMA pueden ejercer efectos permanentes y potentes sobre estos tejidos en formación (201).

La EMA se ha asociado con resultados obstétricos y neonatales adversos. En este sentido, la hipertensión, la diabetes gestacional, el parto prematuro, la placenta previa, el desprendimiento prematuro de placenta, la preeclampsia, las anomalías cromosómicas, el bajo peso al nacer, la restricción del crecimiento fetal, la macrosomía, el bajo Apgar y la mortalidad perinatal son complicaciones altamente prevalentes en mujeres con EMA (202). No obstante, algunos estudios indican que esta relación podría estar influenciada por factores como condiciones médicas previas, antecedentes obstétricos y aspectos socioeconómicos maternos independientes de la edad. Esto plantea la duda de si la EMA por sí sola constituye un factor determinante en los resultados del parto (203).

La edad materna avanzada, presenta una compleja interacción de factores fisiológicos y ambientales que pueden influir significativamente en la programación metabólica temprana de la descendencia (204). Este cambio hacia el retraso de la maternidad se asocia con una multitud de resultados adversos del embarazo, incluida la diabetes gestacional, los trastornos hipertensivos, el parto prematuro y el aumento de las tasas de parto por cesárea (205). Estas complicaciones, a su vez, pueden alterar el delicado equilibrio metabólico del feto en desarrollo, lo que conlleva consecuencias para la salud a largo plazo que pueden manifestarse en la infancia o en la edad adulta (31). El entorno intrauterino, moldeado por la salud y el estilo de vida maternos, desempeña un papel crucial en la configuración de la trayectoria de desarrollo del feto, influyendo en la organogénesis, la diferenciación celular y el establecimiento de vías metabólicas. Por lo tanto, comprender los mecanismos a través de los cuales la edad materna avanzada afecta a la programación metabólica temprana es esencial para desarrollar intervenciones dirigidas a mitigar los posibles resultados adversos para la salud en la descendencia (206).

El mayor riesgo de diabetes gestacional en madres mayores es un factor crítico en la programación metabólica temprana, ya que los niveles elevados de glucosa materna pueden provocar hiperglucemia e hiperinsulinemia fetales. Esto, a su vez, puede promover un crecimiento fetal excesivo, una condición conocida como macrosomía, que aumenta el riesgo de lesiones en el parto y complicaciones neonatales (207). No solo una patología como la diabetes gestacional en sí, dietas con índices glucémicos altos, que causan picos de glucosa rápidos, se han asociado con resultados neonatales adversos como un crecimiento fetal excesivo y resistencia a la insulina materna (107, 208), sin la necesidad de llegar a desarrollar la patología propiamente dicha.

3. HIPÓTESIS

La edad materna es un factor que puede condicionar el desarrollo y desenlace del embarazo, algo que se ha puesto de manifiesto previamente a través de la observación de un aumento de la morbilidad perinatal, así como de la prevalencia de alteraciones fisiológicas gestacionales en mujeres de edad materna avanzada. El aumento creciente del número de embarazos en esta etapa de la vida y la actual falta de estudios que evalúen en profundidad su implicación en la salud materno-fetal, plantea la necesidad de investigar cómo este hecho puede afectar a factores clave que actúan como grandes moduladores del crecimiento y desarrollo fetal, como la funcionalidad placentaria y la composición de la microbiota intestinal durante la gestación. En este contexto, la dieta materna adquiere un papel central, ya que no solo condiciona el estado nutricional y metabólico de la madre y es la principal fuente de nutrientes para el feto, sino que también modula la microbiota intestinal, influyendo en la producción de metabolitos con potencial efecto sobre la placenta y el desarrollo fetal. Por tanto, teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos, la hipótesis de la presente Tesis Doctoral es que la edad materna avanzada podría inducir alteraciones funcionales y genéticas en la placenta, cuya expresión estaría modulada, en parte, por la calidad de la dieta durante el embarazo y su impacto sobre la microbiota y la comunicación materno-placentaria.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es evaluar el impacto que la edad materna avanzada puede ejercer sobre los hábitos alimentarios de las gestantes, la programación metabólica placentaria, y la microbiota de la madre y del recién nacido, evaluando si dichos factores pueden condicionar la antropometría neonatal y ejercer un efecto programador clave para un correcto desarrollo del neonato.

Para lograr este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la ingesta total de alimentos, nutrientes y polifenoles en mujeres embarazadas españolas, comparándola con los valores de referencia dietéticos establecidos, y analizar las posibles correlaciones entre dichas ingestas dietéticas y las medidas antropométricas del recién nacido.
2. Estudiar la influencia de la edad materna avanzada sobre la secreción de adipocinas placentarias y sus efectos a nivel endocrino y paracrino, así como su posible implicación en el perfil antropométrico del recién nacido.
3. Analizar cómo la edad materna avanzada afecta la funcionalidad placentaria, mediante el análisis de la expresión génica y proteica de los principales transportadores de nutrientes y su papel en la transferencia materno-fetal.
4. Analizar las alteraciones en la composición y diversidad de la microbiota intestinal materna y neonatal asociadas a la edad materna avanzada, evaluando tanto la diversidad bacteriana global, como las variaciones en la abundancia diferencial, a nivel de familias y géneros y su posible relación con factores dietéticos maternos y parámetros del desarrollo neonatal.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Captación

La captación de mujeres gestantes se llevó a cabo con la colaboración de dos hospitales españoles, el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y el Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. El periodo de captación fue desde junio de 2022 hasta enero de 2024 y se llevó a cabo durante las primeras revisiones ginecológicas de mujeres embarazadas en torno a la semana 12 de gestación. El estudio fue aprobado por el Comité Bioético de Investigación con sujetos humanos (Referencia 27/04/2020/4/2020).

Para el correcto desarrollo del proceso de captación se establecieron junto con el equipo de obstetricia y ginecología los siguientes criterios de inclusión y exclusión:: aceptar libremente participar en el estudio y tener el consentimiento informado firmado por la voluntaria o los padres/tutores legales del recién nacido; mujer embarazada con un embarazo de curso normal; índice de masa corporal de 18-30 kg/m² al inicio del embarazo y gestación simple; los criterios para ser excluidas del estudio fueron: enfermedad crónica que requiera tratamiento a largo plazo, desnutrición, obesidad mórbida o bajo peso, malformaciones cromosómicas o congénitas, retraso del crecimiento uterino, muerte fetal, no aceptación del consentimiento informado para participar en el estudio por parte del voluntario o de los padres/tutores legales del recién nacido.

Una vez se informó a las gestantes sobre los objetivos del estudio, y se obtuvo el consentimiento informado por su parte, las mujeres embarazadas fueron seleccionadas en base a su edad para pertenecer al grupo de estudio o control. Teniendo en cuenta los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral, que incluyen el análisis de la expresión génica y proteica en placenta, la composición de la microbiota intestinal materna y neonatal, y la evaluación de hábitos dietéticos, se estimó un tamaño muestral suficiente para detectar diferencias significativas entre dos grupos (control vs. EMA) en variables continuas y categóricas.

Para ello, se asumieron los siguientes parámetros para un cálculo estimado del tamaño muestral:

- Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$
- Potencia estadística deseada: 80% ($1 - \beta = 0.80$, donde β es la probabilidad de cometer un error)
- Diferencia mínima clínicamente relevante (d) en variables continuas: $d \approx 0.5$ DS (donde DS es la desviación estándar)

Bajo estos criterios, y asumiendo una prueba bilateral para comparar medias entre dos grupos independientes (test t o U de Mann-Whitney), se requeriría un mínimo de 63 sujetos por grupo para detectar una diferencia media con tamaño del efecto de 0.5 y potencia del 80%.

Considerando la posibilidad de pérdidas durante el seguimiento o la obtención de muestras no válidas, estimadas en hasta un 20%, conforme a lo observado habitualmente en estudios longitudinales que implican la recolección de muestras biológicas, se decidió ampliar el tamaño muestral hasta 100 gestantes por grupo. Esta ampliación tuvo como objetivo garantizar una potencia estadística suficiente para detectar diferencias significativas entre grupos, permitiendo además el ajuste por covariables y la realización de análisis multivariantes o estratificados. Como resultado, los grupos de estudio fueron:

- Grupo control (n=100), madres primíparas de 20 a 34 años de edad
- Grupo EMA (n=100), madres primíparas de edad igual o superior a 35 años.

Este tamaño muestral es también consistente con estudios similares previos que han analizado diferencias en expresión génica, proteica y composición de microbiota en poblaciones humanas.

El diagrama de flujo de trabajo junto con las pérdidas sufridas durante el proceso se explica en la Figura 8.

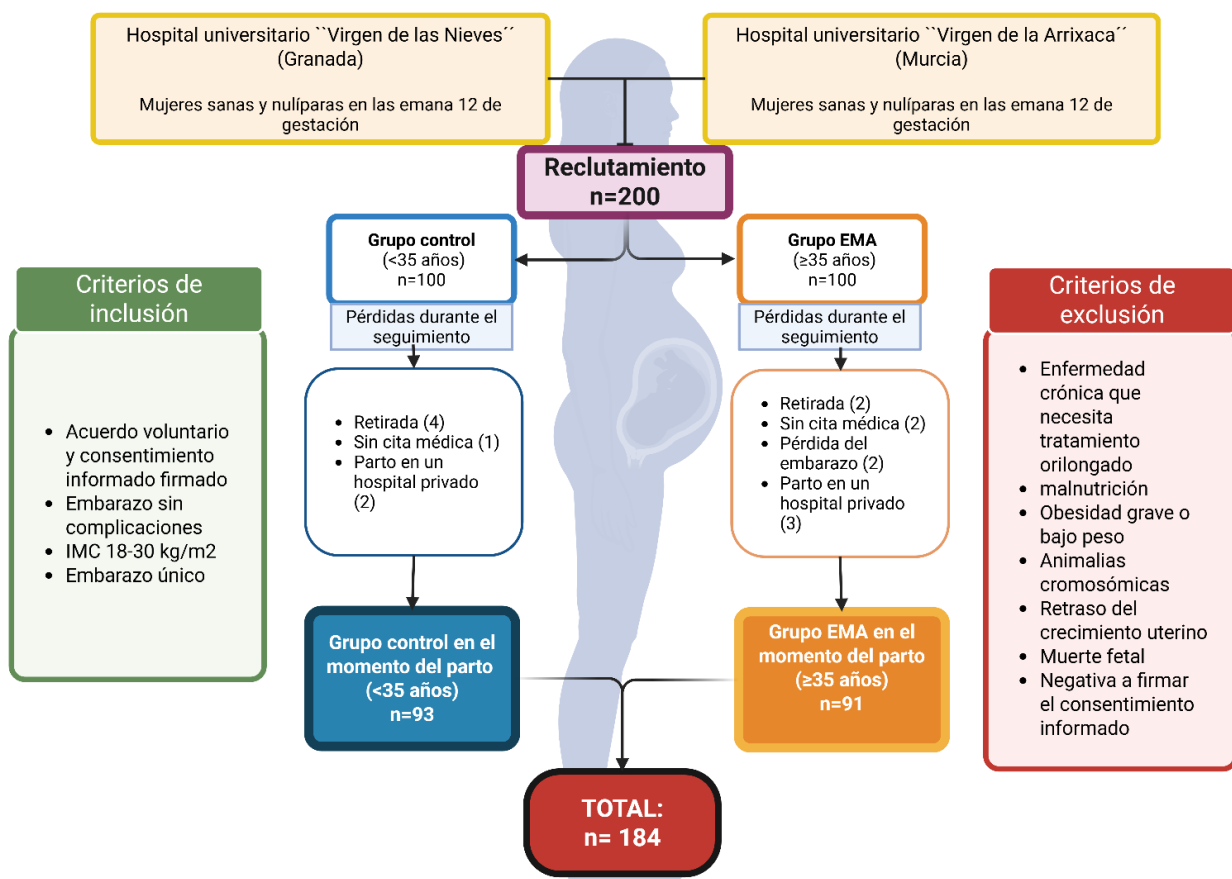


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de captación de gestantes voluntarias. Elaboración propia.

5.2. Recogida de muestras

La recogida de muestras y datos se realizó en dos fases, una en el mismo momento de la captación, y otra en el momento del parto donde además se recolectaron datos tanto de la madre como del neonato.

5.2.1. Primera fase

Esta fase comprende desde el momento de la captación, hasta el momento del parto.

5.2.1.1. *Datos maternos*

Estos datos fueron obtenidos y cedidos por los hospitales implicados en el estudio. Personal cualificado y con acceso a las bases de datos privadas de los hospitales, volcaron la información necesaria en una base de datos a la que solo personal autorizado ha tenido acceso. Además, todos los datos fueron codificados y anonimizados de acuerdo con el Reglamento General de Protección de Datos (GDPR).

- Datos clínicos: fecha de nacimiento, fecha del último periodo, fecha estimada de parto, método de concepción, abortos previos, peso, estatura, IMC, patologías previas, medicación, suplementos.

5.2.1.2. *Extracción de sangre*

En la misma visita, el personal sanitario encargado para ello tomó una muestra de sangre por participante en tubos con anticoagulante (EDTA) para el análisis hematológico y con gel separador para el análisis bioquímico de las mismas. Los datos obtenidos de estas muestras fueron:

- Análisis completo de sangre (hematología y bioquímica) del primer trimestre. En él se incluyeron: recuentos de células sanguíneas completas, serologías, análisis de orina y urocultivo (glucosuria, proteinuria, bacteriuria, leucocituria y/o nitritos y hematuria), TSH, O'Sullivan, prueba de Coombs indirecta, PAPP-A, Beta-HCG, triple screening y una bioquímica (glucosa, creatinina, ácido úrico, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, GOT, GPT, hierro, ferritina, colesterol, HDL, LDL, triglicéridos, calcio, potasio, sodio y fosfato).

5.2.1.3. *Muestras fecales*

A cada participante se le facilitó un recipiente estéril de recogida de muestras fecales en la consulta ginecológica que llevaron en días posteriores al mismo hospital. Las muestras fueron transportadas en frío y conservadas en un ultracongelador a -80°C para el posterior análisis de la porción hipervariable del gen 16S a fin de determinar las comunidades bacterianas más abundantes en las muestras.

5.2.2. Segunda fase

Esta fase se desarrolla el mismo día del parto.

5.2.2.1. *Datos del parto y del neonato*

En la misma base de datos donde se volcó la información de las gestantes en la semana 12 de gestación, el día del parto, el personal sanitario reflejó también: fecha de parto, semana y día de gestación, si el parto se inició de forma espontánea o fue inducido y cómo finalizó el parto, cesárea o vaginal. Respecto al neonato, se reflejaron los datos de sexo, peso al nacimiento, longitud y perímetro cefálico.

5.2.2.2. *Muestras de placenta*

Tras el parto, se examinó el tamaño, forma, consistencia e integridad de la placenta, por parte de las enfermeras y matronas que asistieron el mismo. Se comprobó la ausencia de lóbulos accesorios, infartos placentarios, hemorragias, tumores y nódulos. Se obtuvieron varias muestras de 6x6x6 cm de cotiledones, excluyendo las membranas placentarias y de la parte central, evitando zonas de necrosis, infarto o calcificación. Inmediatamente, las muestras fueron lavadas por separado con una solución fría de NaCl al 0.9% con hidroxitolueno butilado al 0.1%. La mayoría se guardaron en recipientes estériles destinados a ello y codificados según el número de muestra y se almacenaron en congeladores a -80°C para la posterior extracción proteica del tejido. Previo a su congelación, una porción de placenta se sumergió en RNAlater (ThermoFisher Scientific, Whatam, MA, EE.UU.) durante 24 horas a 4°C a fin de que el reactivo penetrara correctamente en el tejido para evitar la degradación del material genético. Pasadas estas horas, estas porciones se conservaron también en un ultracongelador a -80°C hasta que fueron usadas para extracción de ARN y determinación de la expresión génica.

5.2.2.3. *Extracción de sangre*

Previo al parto, el personal encargado para ello tomó una muestra de sangre por paciente en tubos con anticoagulante (EDTA) para el análisis hematológico y con gel separador para el análisis bioquímico de las mismas.

- Análisis completo de sangre (hematología y bioquímica) en el momento del parto. En él se incluyeron: recuentos de células sanguíneas completas, serologías, análisis de orina y urocultivo (glucosuria, proteinuria, bacteriuria, leucocituria y/o nitritos y hematuria), TSH, O'Sullivan, prueba de Coombs indirecta, PAPP-A, Beta-HCG, triple screening y una bioquímica (glucosa, creatinina, ácido úrico, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, GOT, GPT, hierro, ferritina, colesterol, HDL, LDL, triglicéridos, calcio, potasio, sodio y fosfato).

5.2.2.4. *Muestras fecales*

De nuevo, se recogieron muestras fecales, si no el mismo día del parto, en días posteriores cercanos a este. Siguiendo el mismo procedimiento descrito en la primera fase, se le facilitó a cada participante botes estériles, y las muestras fecales fueron entregadas en el mismo hospital y conservadas como se ha descrito anteriormente.

En el caso de los recién nacidos, se recogieron muestras de los primeros meconios con un hisopo estéril directamente del pañal y se conservaron siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras fecales maternas.

Estas muestras, fueron codificadas igual que las de la primera fase y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento y análisis de las regiones hipervariables del gen 16S del ARN ribosómico (ARNr) son nueve segmentos (V1-V9) que varían entre diferentes bacterias, útiles para identificar y clasificar bacterias a nivel de especie y género, porque son una fuente importante de información genómica para estudios de taxonomía y filogenia, es un componente de todos los sistemas autorreplicantes y posee una función esencial en la síntesis de las proteínas.

5.3. *Evaluación nutricional*

Para evaluar la ingesta total de nutrientes en el registro dietético se utilizó un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ), previamente validado en la población española de mujeres embarazadas (209). Estos cuestionarios, evalúan la ingesta habitual de una población durante un tiempo específico y, al ser semicuantitativo, se presenta con un tamaño de raciones de los alimentos para ajustar al máximo posible el consumo. El FFQ incluía una variedad de alimentos (87 ítems), clasificados en siete grupos como productos lácteos; huevos, carnes y pescados; verduras y legumbres; frutas; pan, cereales y otros; aceites, grasas y productos procesados; bebidas y varios. Además, el tamaño de la ración de cada alimento se especificó de acuerdo con el atlas de raciones alimentarias Encuesta Nacional de Alimentación en la población Infantil y Adolescente (ENALIA) (210). El FFQ consta de 9 posibles respuestas basadas en la frecuencia de consumo: nunca; 1-3 veces/mes; 1/semana; 2-4/semana; 5-6/semana; 1/día; 2-3/día; 4-5/día; 6 o más/día. El FFQ se completó una vez durante el embarazo, en el periodo comprendido entre las semanas 15 y 20 de gestación.

Para reducir el sesgo y mejorar la tasa de respuesta y la exactitud de los datos obtenidos, los FFQ fueron realizados con la compañía de personal capacitado, una nutricionista, que ayudó a responder las preguntas. Los datos de frecuencia de consumo recogidos en el cuestionario se convirtieron en gramos de alimento mediante la estimación de raciones proporcionada por el atlas ENALIA anteriormente mencionado. En el cuestionario se especificaba el tamaño de una ración para cada alimento y la frecuencia de consumo (por día, semana o mes). A partir de esta información, y considerando semanas de 7 días y meses de 30 días, se estimó la cantidad diaria

en gramos de cada alimento consumido. Posteriormente, estos gramos se transformaron en nutrientes utilizando la base de datos española de composición de alimentos Novartis (211). De este modo, se pudo estimar la ingesta diaria de distintos nutrientes, incluyendo energía total, macronutrientes (proteínas, grasas e hidratos de carbono) y micronutrientes (vitaminas y minerales esenciales).

Las ingestas medias de nutrientes por grupo, calculadas como previamente se ha descrito, se compararon con los valores de referencia indicados por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (212) para la población gestante. Para la comparación de las medias y los valores de referencia dietéticos (VRD) de las embarazadas españolas, las variables se transformaron logarítmicamente con el fin de representarlas en la misma escala.

Además, el mismo FFQ fue usado para la estimación de consumo de polifenoles. Para ello, la base de datos Phenol-Explorer 3.6 fue utilizada (213). Este recurso proporciona datos sobre el contenido total de polifenoles de los alimentos mediante el método de Folin-Ciocalteu y las concentraciones de las distintas familias y subfamilias de polifenoles (213, 214). Las cantidades totales de cada subfamilia de polifenoles se utilizaron para estimar la ingesta total de polifenoles de cada participante. Las subfamilias de compuestos fenólicos se clasificaron en varios grupos principales según los criterios de Phenol-Explorer: (a) flavonoides (incluidas antocianinas, chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonoles, flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonoides); (b) ácidos fenólicos (como ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxifenilacéticos, ácidos hidroxifenilpropenos y ácidos hidroxifenilpropanoicos); (c) lignanos (lignans); (d) estilbenos (stilbenes); y (e) otros polifenoles (alquilmetoxifenoles, alquilfenoles, hidroxibenzaldehídos, hidroxibenzocetonas, hidroxycumarinas, metoxifenoles, naftoquinonas, tirosoles y otros polifenoles). Para estimar el contenido en polifenoles de alimentos complejos, incluidos algunos alimentos procesados, las muestras se separaron según sus ingredientes principales, siguiendo recetas comerciales típicas, y se ajustaron utilizando factores de rendimiento de cocción (213-215).

5.4. Procesado de las muestras biológicas

5.4.1. Aislamiento de ARN

Se procedió a la extracción de RNA utilizando la muestra recogida para ello tras el parto y sumergida en RNAlater, unos de 0.08g de tejido.

Debido a las especiales características de la muestra, a la elevada presencia de RNAsas y para evitar su degradación, el método de extracción utilizado fue con una mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, el cual utiliza un TRIagente que contiene tiocianato de guanidinio para desnaturalizar proteínas, y un fenol, disolvente orgánico. La solución tampón de TRIagente mantiene la integridad de los ARN, rompe las células y desnaturaliza las proteínas. Este método

se basa en los trabajos de Piotr Chomczynski y Nicoletta Sacchi, realizados en 1987 y 2006 (216, 217).

Tras su descongelación, se eliminó el RNAlater en el cual estaba el tejido. Tras ello, el primer paso fue añadir el tejido con 800µl de TRIzol y se procedió a su homogeneización manual en un homogeneizador de vidrio. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos para después centrifugar las muestras para eliminar los residuos celulares a 12000 *g* durante 5 minutos y a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo.

En este punto, comienza el proceso de separación de las distintas fases. El sobrenadante recogido se incubó otros 5 minutos a temperatura ambiente y acto seguido se añadió 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol añadido al principio del proceso, trabajando dentro de la campana de extracción en todo momento, por lo tanto, añadimos 160 µl de cloroformo. Se vorteo durante 15 segundos hasta conseguir un color homogéneo rosa, y se incubaron las muestras 3 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugarlas durante 15 minutos a 12000 *g* a 4°C. Esta centrifugación hace que se separe la muestra en dos fases; el ARN se mantiene en la fase acuosa exclusivamente, que es la que transferiremos a un nuevo tubo y trabajaremos con ella. Se encuentra también una interfase, con ADN y al fondo del tubo una fase orgánica con proteínas y lípidos.

Tras obtener la fase acuosa y pasarla a un nuevo tubo eppendorf, se precipitó el ARN añadiendo 0.5 ml de isopropanol frío por cada 1 ml de TRIzol del principio. En este caso se añadieron 400 µl. Tras una mezcla completa mediante pipeteo suave e inversión se incubó 10 minutos a 4°C para centrifugarlo de nuevo a 12000 *g* 10 minutos a la misma temperatura. El pellet formado en el fondo de cada tubo que corresponde al ARN precipitado.

Por último, el ARN precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70% por cada 1 ml de TRIzol añadido en la primera fase; es decir, sobre el mismo pellet se añade 1 ml de etanol al 70%. Para mezclarlo bien, se agita en vortex antes de llevarlo a centrifugar a 7500 *g* a 4°C durante 5 minutos. Tras esta centrífuga, se elimina el etanol y se deja secar cada muestra durante 10-15 minutos.

Finalmente, se resuspende el ARN en un volumen total de 60 µl de agua fría tratada con DEPC (Invitrogen Carlsbad, CA, EE.UU.).

La cantidad y pureza del ARN aislado se determinaron por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific) a 260/280 nm. El RNA aislado se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

5.4.2. Extracción de proteínas

El tejido placentario se utilizó para extracción proteica del mismo. Para ello se utilizaron unos 0.5 g de tejido que se homogeneizaron manualmente en un Potter-Elvehjem de vidrio utilizando el tampón de extracción T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent ThermoFisher Scientific, Whatam, MA, EE.UU.). El homogenado resultante se centrifugó a 10000 *g* durante 5 minutos a 4 °C para eliminar restos celulares siguiendo las instrucciones del fabricante, conservando el sobrenadante obtenido a -80°C hasta su posterior uso.

5.5. Determinación del perfil de adipoquinas en placenta

5.5.1. Determinación de adipoquinas mediante Bio-Plex

La determinación de las principales adipoquinas implicadas en el trabajo presente, se llevó a cabo mediante el ensayo Bio-Plex ProHuman Diabetes Assays (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Este ensayo es una tecnología basada en inmunoensayos de múltiples parámetros que utiliza microesferas fluorescentes recubiertas con anticuerpos específicos para la detección simultánea de múltiples analitos en una misma muestra. En este sistema, las microesferas, diferenciadas por distintos niveles de fluorescencia, se acoplan a biomoléculas de interés, como citocinas, hormonas o proteínas. Tras la incubación con la muestra, los analitos presentes se unen a sus respectivos anticuerpos en las microesferas. Posteriormente, un segundo anticuerpo marcado con un fluoróforo, permite la detección mediante citometría de flujo en un analizador Bioplex-200 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.). La intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra, lo que permite su cuantificación precisa mediante curvas de calibración.

Para ello, se utilizó extracto proteico de placenta con una dilución 1:2. La lectura de las microesferas presentes en cada pocillo placa se llevó a cabo en el equipo LABScan 100 system (Luminex Corporation, Texas, EE.UU.) con el software xPONENT para la adquisición de datos. Este equipo se basa en la citometría de flujo con láseres que excitan los fluoróforos presentes en las microesferas. Los resultados fueron expresados en Unidades de Fluorescencia Media (MFI, Mean Fluorescence Intensity), las cuales se extrapolaron a una curva estándar y se analizaron dichos datos. Las adipoquinas estudiadas y su rango de detección se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Adipoquinas placentarias medidas a través del kit Bio-Plez Pro Human Diabetes Assay y sus rangos de fluorescencia.

Analito	Rango pg/ml
Grelina	100 - 233
GIP	1.140 – 2.659
GLP-1	1.788 – 4.173
Glucagon	2.594 – 6.052
Insulina	130 – 303
Leptina	289 – 555
PAI-1	157 – 365
Resistina	238 – 555
Visfatina	1.357 – 3.167

5.5.2. Determinación de Irisina mediante enzimoinmunoensayo

La cuantificación de Irisina se realizó mediante el kit Human Irisin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Viena, Austria). El ensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se basa en la interacción específica antígeno-anticuerpo y el uso de una enzima conjugada a un anticuerpo que genera una señal colorimétrica detectable.

Igualmente se realizó en extracto proteico de placenta. La absorbancia de la reacción se determinó a 450 nm en un lector de placas Bio-Tek (Bio-Tek, Vermont, EE.UU.).

5.6. Retrotranscripción y Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

5.6.1. Retrotranscripción

Para la síntesis del ADN complementario (cADN) se llevó a cabo una retrotranscripción del ARN obtenido. Para ello, se utilizó el kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), con 2 µg de ARN por muestra con el fin de obtener cDNA, una biomolécula más estable que permite su manejo de forma más segura. Para llevar a cabo este proceso, el propio kit proporciona una mezcla de cebadores aleatorios, mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP), la enzima encargada de llevar a cabo la reacción llamada transcriptasa inversa y el tampón de retrotranscripción, para asegurar las condiciones óptimas para el trabajo de la enzima. Todo ello, en las condiciones indicadas por la casa comercial, y expresadas en la Tabla 6, junto con el ARN obtenido previamente, se incubó en un termociclador (QuantStudio 5, Thermo Fisher), durante 10 minutos a 25 °C, con el fin de que los cebadores se hibridasen con su secuencia complementaria; 2 horas a 37°C para que tenga lugar la

retrotranscripción ya que la enzima alcanza su temperatura óptima y cataliza la síntesis de cDNA, seguido de 5 minutos a 85°C para desactivar la enzima. El cDNA sintetizado se conservó a -20°C hasta su posterior uso para determinación de expresión génica.

Tabla 6. Volúmenes necesarios de reactivo para llevar a cabo la retrotranscripción de ARNm con el kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription KIT.

Reactivo	Volumen
10X Tampón de RT	2 µl
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 µl
10X RT Primers aleatorios	2 µl
MultiScribe transcriptasa inversa	1 µl
H ₂ O tratada con DEPC	4.2 µl
Volumen TOTAL por reacción	10 µl

H₂O: agua; DEPC: dietilpirocarbonato.

5.6.2. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La expresión de los genes implicados en el transporte de nutrientes se determinó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), denominada así ya que partimos de cDNA obtenido a partir de ARNm en la retrotranscripción anteriormente descrita.

El método de cuantificación de la expresión de ARN fue el de sondas TaqMan específicas para cada gen, que permiten la detección exclusiva de secuencias específicas. Los oligonucleótidos utilizados en esta estrategia presentan una longitud de 20 a 24 bases y se hibridan de manera complementaria con una secuencia interna del fragmento de ADN objetivo. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador (*reporter*), como FAM y VIC en este caso, y en el extremo 3' con un aceptor o molécula apagadora (*quencher*), generalmente TAMRA, que absorbe la fluorescencia emitida por el fluoróforo donador. Para que este mecanismo sea eficiente, el espectro de emisión del fluoróforo donador debe solaparse con el espectro de absorción del *quencher*. En estado intacto, la proximidad entre ambos fluoróforos permite la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), evitando la detección de señal fluorescente. Durante la fase de elongación de la amplificación, la sonda hibridada con su secuencia complementaria permanece unida a la hebra de ADN y flanqueada por cebadores específicos. Al avanzar la Taq-polimerasa sobre la hebra molde, su actividad exonucleasa 5'-3' degrada la sonda, liberando el fluoróforo donador, lo que permite la emisión de fluorescencia. La señal fluorescente es detectada en tiempo real, y su intensidad es proporcional a la cantidad de secuencias diana presentes en la muestra.

Para ello, se utilizó el sistema de de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific ,Watham, MA, EE.UU).

Durante la fase exponencial del proceso de amplificación, se define un umbral denominado *cycle threshold* (Ct), que corresponde al ciclo en el cual el incremento de la señal fluorescente se vuelve estadísticamente significativo y se distingue de la fluorescencia de fondo (*background*). La detección de este umbral ocurre en un punto crítico en el que la amplificación del ADN alcanza un nivel detectable. En este contexto, una mayor cantidad de copias iniciales del ADN diana permite alcanzar el umbral de fluorescencia en un menor número de ciclos, reflejando una correlación inversa entre la concentración inicial de la muestra y el valor de Ct. Para la cuantificación, se empleó el método de comparación de cycle threshold (Ct), conocido como el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por Livak y Schmittgen en 2001 (218). Este enfoque permite estimar la cantidad relativa de ADNc, expresada en unidades de expresión de la diana estudiada, tras su normalización con un gen de referencia (*housekeeping gene*). La normalización mediante este gen endógeno corrige posibles variaciones en la cantidad de ARN inicial y en la eficiencia de la transcripción reversa, garantizando una cuantificación más precisa de la expresión génica relativa.

Para la elección del gen endógeno adecuado, se testaron 32 genes endógenos en humanos mediante TaqMan Array Human Endogenous Control (Thermo Fisher Scientific ,Watham, MA, EE.UU). Finalmente, el gen CASC3 resultó ser el gen que se expresaba de manera más constante en ambos grupos de estudio y, por tanto, el gen elegido como endógeno para la normalización de cada gen diana.

Las sondas utilizadas en cada PCR se muestran en la Tabla 7. Se llevó a cabo mediante ensayo multiplex, esto quiere decir que en un mismo pocillo se midió tanto el gen estudio (target) como el gen endógeno. Esto es gracias a la aplicación de dos fluoróforos diferentes para cada gen, en nuestro caso, todos los genes a estudiar fueron marcados con FAM y el gen target fue marcado con VIC. En una placa de 96 pocillos las muestras fueron analizadas por duplicado. Cada reacción tuvo un volumen final de 10 µl cuya composición se muestra en la Tabla 8.

El análisis de la curva de fusión fue usado para confirmar el tamaño del producto final de la PCR.

Tabla 7. Sondas TaqMan de genes estudiados y su referencia. Todos de la casa comercial ThermoFisher.

Sonda	Referencia
CD36	Hs00354519_m1

DMT1	Hs00167206_m1
FABP3	Hs07287863_m1
FABP4	Hs01086177_m1
GLUT4	Hs00892681_m1
LAT1	Hs01001189_m1
SLC27A1	Hs01587911_m1
SNAT1	Hs01562175_m1
CASC3	Hs00201226_m1

Tabla 8. Volúmenes de reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-qPCR.

Reactivo	Volumen
Master Mix TaqMan Gene Expression 2X	10 µl
TaqMan Gene Expression Assay 20X (sonda gen studio)	1 µl
TaqMan Gene Expression Assay 20X (sonda gen endógeno)	1 µl
H ₂ O tratada con DEPC	6 µl
cDNA	2 µl
TOTAL	20 µl

H₂O: agua; DEPC: dietilpirocarbonato.

5.7. Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot

Este análisis permite la detección y cuantificación de proteínas específicas presentes en las proteínas totales extraídas previamente, mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida y su posterior transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), incubadas con anticuerpos específicos para cada proteína.

Para el análisis de la expresión de proteínas placentarias implicadas en el transporte de nutrientes de la madre hacia el feto, se utilizó el homogenado de extracción proteica descrito previamente. Para la cuantificación de la cantidad de contenido proteico se utilizó el kit Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc., Hanover Park, IL, EE.UU.) y la lectura de las absorbancias y concentraciones se llevó a cabo en el sistema Bio-Tek Tek (Bio-Tek, Vermont, EE.UU.).

Se normalizaron las muestras de tal forma que se tomó 15 µg de proteína para mezclarlos con un tampón de carga comercial 4x Laemli Sample Buffer (Bio-Rad California, EE.UU.) y β-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y se calentaron durante 5 minutos a 95°C.

Se procedió entonces a la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida stain-free de 4-20% (Mini-Protean-TGX Stain-free Gels, Bio-Rad California, EE.UU.). Se llevó a cabo en cubeta de electroforesis vertical (Criterion; Bio-Rad California, EE.UU.) a un voltaje constante de 300 V durante 20 minutos. Acto seguido, los geles fueron activados mediante exposición a luz UV utilizando el sistema ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad California, EE.UU.), lo que permitió la detección de la proteína total en cada carril sin necesidad de tinción adicional.

Tras ello, se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana TransBlot Turbo Mini-Size PVDF Membrane (Bio-Rad California, EE.UU.). Esta se llevó a cabo de forma húmeda con un buffer de transferencia compuesto por agua, metanol y Tris-Glicina 1X (preparado a partir de Transfer-Blot-Turbo 5X, Bio-Rad California, EE.UU.) y previa activación de las membranas con metanol. Se realizó a 25V durante 3 minutos en el sistema de transferencia húmeda Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad California, EE.UU.).

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% diluida en Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) (Tris 50 nM, NaCl 0.15 M y Tween 20 0.1%) durante 1 hora en agitación mecánica. Tras este proceso, las membranas fueron lavadas 2 veces con Tris Buffered Saline (TBS) (Tris 50 nM, NaCl 0.15 M) durante 5 minutos para eliminar los restos de buffer de bloqueo, y se procedió a la incubación de los anticuerpos primarios durante 18 horas a 4°C en agitación mecánica continua. Los anticuerpos utilizados y sus diluciones pueden consultarse en la Tabla 9. Los anticuerpos monoclonales fueron diluidos en TBS-T, mientras que aquellos policlonales fueron diluidos en leche en polvo desnatada al 2% en TBS-T. Tras la incubación del anticuerpo primario se procedió a lavar la membrana 3 veces con TBS-T durante 5 minutos cada lavado y posteriormente se incubó el anticuerpo secundario que correspondía a cada gen diluidos a distintas concentraciones en leche desnatada al 2% en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente y en agitación mecánica.

Tabla 9. Anticuerpos, diluciones e información utilizados para la determinación proteica mediante Western Blot.

Anticuerpo	Especie huésped	Tipo	Dilución	Peso molecular	Casa comercial
Anti-DMT1	Ratón	Policlonal	1:250	64 kDa	Santa Cruz
Anti-CD36	Conejo	Monoclonal	1:1000	70-110 kDa	CellSignalling
Anti-SNAT1	Ratón	Monoclonal	1:1000	54 kDa	CellSignalling

Anti-FABP3	Ratón	Monoclonal	1:5000	14 kDa	CellSignalling
Anti-FABP4	Ratón	Policlonal	1:5000	15 kDa	CellSignalling
Anti-LAT1	Ratón	Policlonal	1:5000	39 kDa	CellSignalling
Anti-GLUT1	Conejo	Monoclonal	1:2000	45-60 kDa	CellSignalling

A continuación, se lavaron las membranas dos veces con TBS-T durante 10 minutos y una última vez con TBS durante otros 10 minutos. Las bandas obtenidas de cada unión de anticuerpo a las proteínas de la membrana fueron detectadas por quimioluminiscencia con el reactivo Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad California, EE.UU.). La cuantificación de la señal de las bandas se realizó mediante ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad California, EE.UU.). Para cada muestra, la intensidad de la banda correspondiente a la proteína diana fue normalizada frente a la señal de proteína total del mismo carril, obtenida de la imagen stain-free inicial. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software ImageLab 6.1 (Bio-Rad California, EE.UU.).

5.8. Análisis de la composición microbiológica fecal

Para el análisis de microbiota fecal se incluyó la secuenciación de marcadores filogenéticos a partir de las regiones variables V3 y V4 del gen rRNA 16S bacteriano a partir del material genómico presente en las muestras biológicas de las madres y del meconio de los recién nacidos.

La extracción de RNA a partir de las muestras de heces y meconio, la generación de librerías de 16S así como su secuenciación, fue realizado por el personal de la Unidad de genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”.

Para la extracción del material genómico de partida se utilizó el kit QIAamp PowerFecal Pro DNA siguiendo las recomendaciones de ©QIAGEN para una extracción en QIAcube. Las librerías de 16S se construyeron siguiendo el protocolo de PCR en dos pasos recomendado por el fabricante Illumina (Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Protocol).

La amplificación específica de la región V3/V4 del gen rRNA 16S se hizo por triplicado utilizando los primers Pro341F (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN BGC ASC AG)/ Pro805R (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CNV GGG TAT CTA ATC C) (219). Las condiciones de PCR fueron 95°C 3'; (95°C 30"; 75°C 10"; 55°C 30"; 72°C 30") x 25 ciclos; 72°C 5'; mantener a 4°C. Para minimizar la amplificación del gen rRNA 16S mitocondrial y/o cloroplastidial a partir del DNA eucariota presente en el material biológico, se incluyeron dos PNAs específicos de dicha región

como bloqueadores de PCR (220) mPNA (GGC AAG TGT TCT TCG GA) y pPNA (GGC TCA ACC CTG GAC AG) a una concentración final de 2.5 μ M.

Tras la amplificación, los triplicados de cada muestra se combinaron. El segundo paso de PCR de indexado así como las limpiezas mediante bolas magnéticas SPRI (inmovilización reversible en fase sólida) se hicieron siguiendo el protocolo anteriormente citado. Como control negativo del proceso de producción de librerías se incluyó una muestra sin DNA genómico.

Las librerías finales se cuantificaron mediante fluorimetría y se normalizaron a una concentración final de 5 nM. Un volumen fijo de cada librería se combinó para generar un pool que se sometió a un análisis mediante electroforesis microfluídica en gel (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) usando el Kit DNA HS. A partir del electroferograma generado se determinó la correcta distribución de tamaños de las librerías y el tamaño medio en bp fue utilizado para calcular la molaridad final del pool tras su cuantificación fluorométrica en el equipo Qubit 3.0 (Thermo). El *pool* de librerías fue desnaturalizado y diluido siguiendo las indicaciones de la guía de usuario del equipo Miseq® de Illumina® (https://support-docs.illumina.com/IN/MiSeq_DnD/Content/MiSeq/DnD-MiSeq.htm?protocol=standard). La secuenciación se llevó a cabo en este equipo con un cartucho V3 de 600 ciclos y con una configuración de lectura de 2x275 pares de bases. Tras la secuenciación se obtuvo una profundidad de lectura media por muestra de más de 75000 lecturas pareadas (153689 lecturas totales por muestra). Solamente 4 muestras resultaron negativas para la secuenciación coincidiendo con las 4 muestras para las que no se obtuvo suficiente DNA genómico por falta de material.

5.9. Procesado y elaboración de figuras

Todas las figuras y esquemas incluidos en este trabajo han sido diseñados, procesados y elaborados por la autora utilizando la plataforma BioRender (<https://BioRender.com>).

5.10. Análisis estadístico

5.10.1. Caracterización de la población

En la caracterización de los rasgos sociodemográficos de la población estudiada se utilizaron la media y el error estándar de la media (EEM), para las variables continuas, y las frecuencias absolutas (valor n) y relativas (%), para las variables categóricas.

5.10.2. Análisis nutricional

Antes del análisis estadístico para la comparación de las ingestas de nutrientes y polifenoles entre los grupos, se examinaron todas las variables para determinar la varianza homogénea y la normalidad mediante las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnoff, respectivamente. Cuando los datos estaban distribuidos normalmente, se aplicó el test paramétrico

t de student, considerándose $p < 0.05$ como significativo; si los datos no estaban distribuidos normalmente, se utilizó la prueba U-Mann-Whitney, una prueba no paramétrica para muestras no apareadas en la que se consideró que $p < 0.05$ indicaba significación estadística. Para este análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 9.4.1. (Graphpad Software, LLC, BOSTON, MA, EE.UU.).

Tras comprobar que los datos no seguían una distribución normal, se calculó una correlación de Spearman para comprobar la relación entre la ingesta de todos los nutrientes medidos mediante el FFQ y las medidas antropométricas del recién nacido. Todas las correlaciones con un valor $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas y, por lo tanto, los datos se normalizaron por z-score en un modelo de regresión Stepwise. Para este análisis se utilizó el software de código abierto RStudio versión 4.3.1. (Posit, Boston, MA, EE.UU.).

5.10.3. Análisis de datos del perfil de adipoquinas, expresión génica y expresión proteica placentaria

Los resultados procedentes de estas determinaciones han sido expresados como media aritmética $\pm$ EEM. Previo a la comparativa de significación estadística, los datos fueron sometidos a las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnoff con el fin de comprobar la varianza homogénea y la normalidad respectivamente. Tras ello, se utilizó el test paramétrico t-Student en aquellas determinaciones cuyos datos seguían una distribución normal; y la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney si los datos no estaban distribuidos normalmente. Ambas pruebas midieron la significación estadística entre el grupo control y el grupo EMA. La comparación y estudio de la significancia estadística del perfil de adipoquinas placentarias dividido por sexo del recién nacido entre ambos grupos de estudio fue analizada mediante un ANOVA de dos vías. La significación estadística se estableció cuando $p < 0.05$ en todas las comparaciones. Para todas ellas se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 9.4.1. (Graphpad Software, LLC, Boston, MA, EE.UU.).

Para el estudio de asociaciones entre el perfil de adipoquinas y las medidas antropométricas del recién nacido, se comprobó que la normalidad de los datos no seguía una distribución normal, por lo que se llevó a cabo una correlación de Spearman para comprobar la relación entre los parámetros a estudiar donde todas aquellas correlaciones con un valor $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Para este análisis se utilizó el software de código abierto RStudio versión 4.3.1. (Posit, Boston, MA, EE.UU.).

5.10.4. Análisis estadístico de resultados de microbiota

El análisis de las muestras de 16S se llevó a cabo siguiendo Terrón-Camero et al. (221, 222). En términos generales, el flujo de trabajo comenzó con una evaluación de la calidad de las secuencias obtenidas. Cada muestra fue secuenciada en dos lecturas de 275 pares de bases y,

posteriormente, su calidad fue examinada utilizando FastQC (223), una herramienta ampliamente utilizada para la inspección rápida de la calidad de los datos de secuenciación, y MultiQC v1.14 (224), que permite visualizar los informes de múltiples muestras en un único documento de resumen para la toma de decisiones en relación al filtrado por calidad.

Para el procesamiento y análisis de los datos, se utilizó el software Qiime2 (225) (<https://qiime2.org/>), una plataforma de código abierto especializada en la identificación taxonómica basada en genes ribosomales (Metabardcoding). Este software permite el análisis eficiente de datos de 16S rRNA y proporciona herramientas para la filtración, el procesamiento de calidad y la clasificación taxonómica de las secuencias.

5.10.4.1. Preprocesamiento de las secuencias con DADA2

Dentro de Qiime2, se empleó el complemento DADA2 (226) para mejorar la calidad de los datos crudos antes de la clasificación taxonómica. Este método realiza tres funciones clave:

1. Filtrado de calidad y recorte: Se eliminaron bases de baja calidad y regiones no deseadas. En particular, los extremos 3' y 5' de las secuencias fueron recortados para eliminar adaptadores y regiones de baja calidad, con los siguientes parámetros:
 - o trim-left-f y trim-left-r: 9 nucleótidos recortados del extremo 5'
 - o p-trunc-len-f: 267 nucleótidos retenidos en la lectura forward
 - o p-trunc-len-r: 275 nucleótidos retenidos en la lectura reverse
2. Eliminación del ruido (denoising): Se corrigieron errores de secuenciación y se eliminaron secuencias quiméricas, permitiendo obtener unidades de secuencia amplicónica (ASVs, por sus siglas en inglés) de alta resolución.
3. Emparejamiento de lecturas: Se fusionaron las lecturas forward y reverse, asegurando una reconstrucción precisa del fragmento de 16S rRNA amplificado.

5.10.4.2. Identificación taxonómica y análisis de diversidad

Tras la asignación de las ASVs, se utilizó la base de datos SILVA v.138-99 database (227) como referencia para la anotación taxonómica. Se generó una matriz de abundancia relativa en diferentes niveles taxonómicos.

Para evaluar la diversidad microbiana dentro de las muestras, se realizaron análisis de diversidad beta:

- Diversidad beta: Se evaluaron las diferencias en la composición microbiana entre muestras mediante análisis de distancia basada en Bray-Curtis y Jaccard.

5.10.4.3. *Detección de valores atípicos y visualización*

Para asegurar la robustez de los resultados, se realizó un análisis de agrupamiento de muestras utilizando la herramienta EMPeror (228), que permitió identificar un valor atípico (outlier). Este paso fue esencial para garantizar la coherencia de los datos antes de proceder con interpretaciones ecológicas y comparaciones entre grupos.

Para evaluar diferencias en la composición microbiana entre los grupos experimentales, se utilizó el paquete de R metagenomeSeq (229). Este enfoque es particularmente útil en estudios de microbiomas, ya que maneja de manera eficiente datos dispersos y con un alto número de ceros, como los que se obtienen en secuenciaciones de 16S rRNA.

5.10.4.4. *Filtrado de especies raras y normalización de datos*

Antes del análisis, se realizó un filtrado inicial para eliminar taxones raros, definiéndolas como aquellas con un recuento total de lecturas igual a cero en todas las muestras. Este paso es fundamental para evitar sesgos en la inferencia estadística y mejorar la robustez de los resultados.

Debido a la variabilidad en la profundidad de secuenciación entre muestras, se aplicó un procedimiento de normalización para minimizar el impacto de estas diferencias. En este caso, se empleó el método *Cumulative Sum Scaling* (CSS), el cual ajusta los conteos crudos dividiéndolos por la suma acumulativa de los conteos hasta un percentil que refleja la distribución estable dentro del conjunto de datos. Este método fue seleccionado porque ofrece una mayor sensibilidad en comparación con otros enfoques de normalización de abundancias taxonómicas (229) permitiendo una mejor detección de diferencias biológicamente relevantes.

Para identificar cambios significativos en la abundancia de los taxones entre los grupos experimentales, los datos normalizados fueron sometidos a un análisis de abundancia diferencial mediante el modelo Gaussiano con inflación de ceros (*Zero-Inflated Gaussian model*) integrado en metagenomeSeq. Este modelo es particularmente adecuado para datos de microbiomas, ya que tiene en cuenta la gran cantidad de ceros en la matriz de abundancia, los cuales pueden deberse tanto a la ausencia real de un taxón en una muestra como a limitaciones de sensibilidad en la detección por secuenciación.

En conjunto, este enfoque permitió una evaluación precisa de las diferencias en la composición microbiana entre los grupos experimentales, asegurando que los efectos observados no estuvieran influenciados por artefactos técnicos derivados de la secuenciación o el procesamiento de los datos.

6. RESULTADOS

6.1. Características de la población de estudio

Las características antropométricas de las mujeres pertenecientes a ambos grupos de estudio, así como el método de concepción y el método de finalización del parto, se muestran en la Tabla 10. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10. Características antropométricas, así como método de concepción y finalización del parto de las mujeres embarazadas del grupo control y grupo EMA.

		Control (n=93)	EMA (n=91)
Peso (kg)		64.36 ± 5.00	64.16 ± 13.16
Altura (cm)		163.55 ± 3.50	163.87 ± 5.89
IMC (kg/m²)		24.04 ± 2.88	23.84 ± 4.57
Método de concepción	E (%):	92.50	75.50
	I-OI (%):	1.25	1.01
	FIV-ICSI (%):	5.00	13.13
	OD (%):	1.25	10.10
Finalización del parto	V (%):	53.12	46.83
	C (%):	31.25	35.44
	OV (%):	15.62	17.72

EMA: Edad materna avanzada (≥ 35 años); E: espontáneo; I-OI: Inseminación-Inductores de ovulación; FIV-ICSI: fecundación in vitro-inyección intracitoplasmática de espermatozoides; OD: ovodonación; V: vaginal; C: cesárea; OV: operatoria vaginal. Peso, altura e IMC expresados como media $\pm$ error estándar de la media (EEM)

Las características antropométricas de los recién nacidos se muestran en la Tabla 11, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ninguno de los dos grupos.

Tabla 11. Medidas antropométricas de los recién nacidos, así como la edad gestacional y el sexo de ambos grupos de estudio, control y EMA.

		Control (n=93)	EMA (n=91)
Peso (kg)		3181.38 ± 47.50	3072.06 ± 512.10
Talla (cm)		49.8 ± 12.75	49.41 ± 2.54
Perímetro cefálico		33.42 ± 12.75	34.11 ± 1.66
Edad gestacional (semanas)		38.84 ± 9.00	38.28 ± 3.21
Sexo	F (%)	46.03	48.75
	M (%)	53.96	51.25

EMA: edad materna avanzada (≥ 35 años); F: femenino; M: Masculino. Peso, talla, perímetro cefálico y edad gestacional expresados como media del grupo $\pm$ error estándar de la media.

Las características de la madre y las medidas antropométricas de los recién nacidos en ambos grupos de estudio y separadas según el sexo de los recién nacidos se muestran en la Tabla 12. No se encontraron diferencias estadísticas.

Tabla 12. Medidas antropométricas de la madre y el recién nacido, método de concepción y método de parto del recién nacido del grupo control y EMA separadas por sexo del recién nacido.

		Madres			
		Control (n=93)		EMA (n=91)	
		Niños (n=50)	Niñas (n=43)	Niños (n=46)	Niñas (n=45)
Peso (kg)		62.25 ± 15.89	65.6 ± 13.45	64.2 ± 13.7	60.49 ± 6.58
Altura (cm)		163 ± 5.74	163.53 ± 5.59	162.9 ± 5.83	164.35 ± 6.10
IMC (kg/m ²)		23.44 ± 5.25	24.17 ± 5.57	24.12 ± 4.70	22.34 ± 3.13
Método de concepción	E (%)	90.00	86.66	85.00	75.00
	I-IO (%)	0	6.66	0	0
	FIV-ICSI (%)	10.00	6.66	10.00	25.00
Finalización del parto	DO (%)	0	0	5.00	0
	E (%)	60.00	60.00	65.00	60.00
	C (%)	30.00	33.33	35.00	35.00
	O (%)	10.00	6.66	0	5.00
		Neonato			
		Control (n=93)		EMA (n=91)	
		Niños (n=50)	Niñas (n=43)	Niños (n=46)	Niñas (n=45)
Peso (g)		3164.05 ± 564.04	3090.66 ± 720.72	3158.84 ± 521.21	3081.45 ± 469.74
Talla (cm)		50.62 ± 2.02	49.53 ± 3.42	49.88 ± 2.99	49.82 ± 2.26
Perímetro cefálico (cm)		33.84 ± 1.30	33.03 ± 3.20	34.29 ± 1.56	34.22 ± 1.34

EMA: Edad materna avanzada (≥ 35 años); E: espontáneo; I-IO: Inseminación-Inductores de ovulación; FIV-ICSI: fecundación in vitro-inyección intracitoplasmática de espermatozoides; OD: ovodonación; V: vaginal; C: cesárea; OV: operatoria vaginal. Peso, altura e IMC expresados como media $\pm$ error estándar de la media (EEM).

6.2. Análisis nutricional

6.2.1. Comparativa nutricional por grupos de alimentos

No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimentos en las siguientes categorías: aceites y grasas, frutas, cereales, verduras y legumbres, pescado y crustáceos, huevos, carnes y productos cárnicos, leche y productos lácteos, bebidas no alcohólicas y varios, todos ellos ilustrados en la Figura 9.

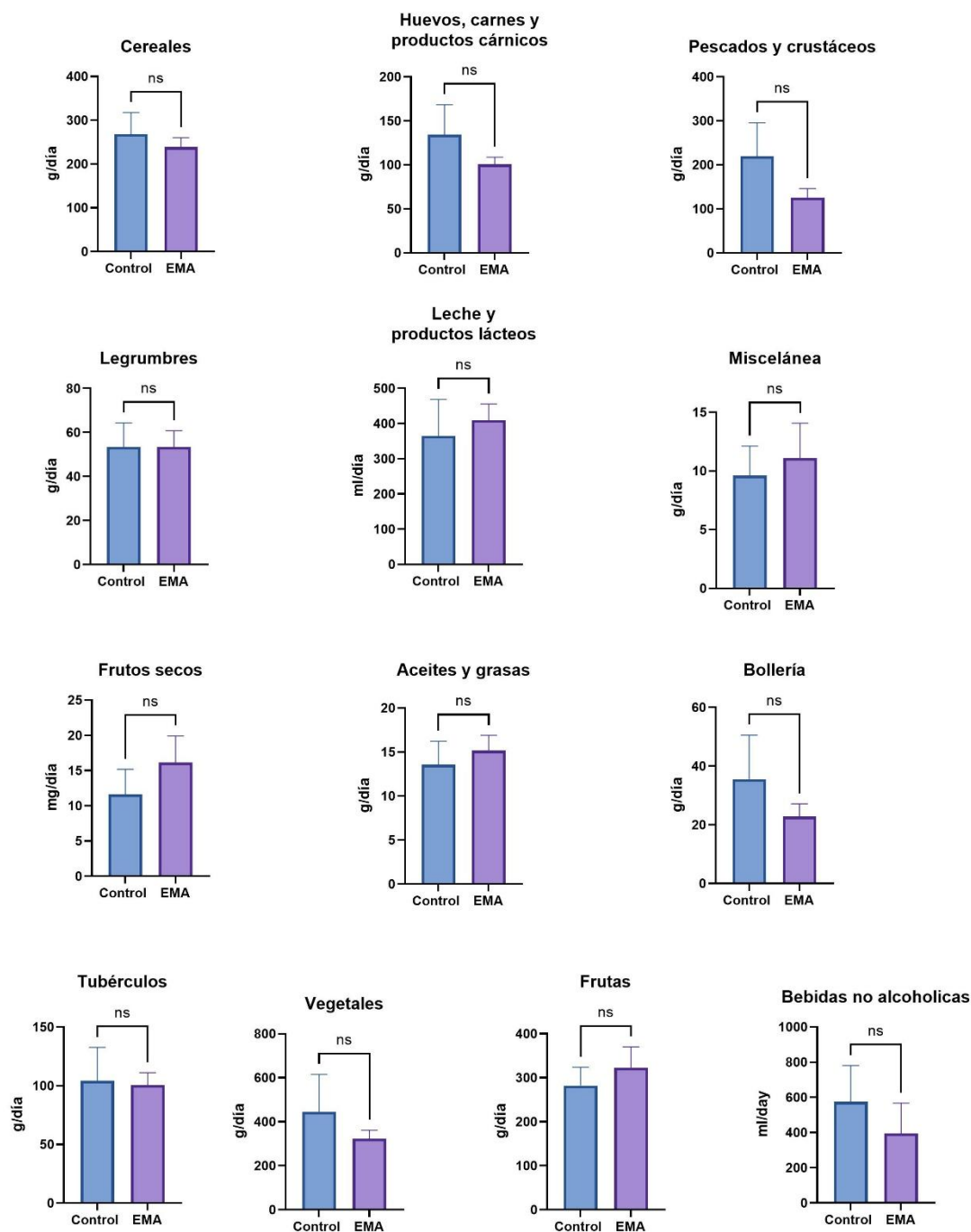


Figura 9. Consumo medio de grupos de alimentos de gestantes control y EMA estimado mediante FFQ. Los datos se representan como valores medios $\pm$ EEM. EMA: Edad materna avanzada; ns: no significativo.

6.2.2. Ingesta media de nutrientes

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en términos de energía total, ni en el total de macronutrientes entre el grupo control y EMA. Del mismo modo, al diferenciar por tipo de grasa, no se mostraron diferencias estadísticamente significativas. El

consumo de fibra, sin embargo, fue significativamente menor en el grupo EMA en comparación con el grupo control (22.65 ± 2.6 g/día para el grupo control y 11.95 ± 1.38 g/día para el grupo EMA; $p < 0.05$). En la Figura 10 se muestran las diferencias en la ingesta de macronutrientes, así como en el tipo de grasa y fibra.

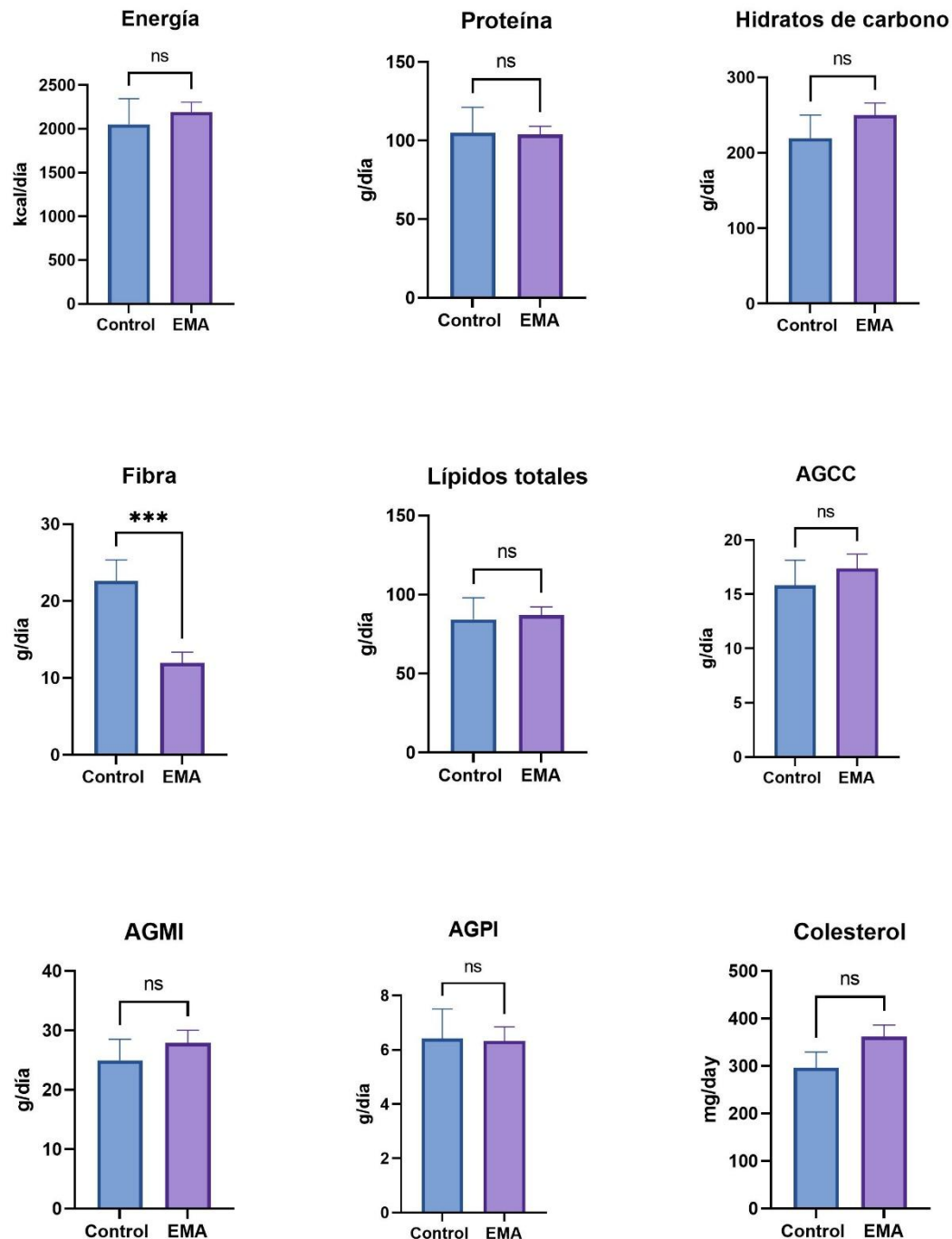


Figura 10. Consumo medio de macronutrientes en ambos grupos de estudio estimados mediante FFQ. Los datos se representan como valores medios $\pm$ EEM. EMA: Edad materna avanzada; ns: no significativo.

En la Tabla 13 se muestra la ingesta media de minerales y vitaminas en ambos grupos. Se observó una mayor ingesta en el grupo control en comparación con el grupo EMA, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para los siguientes minerales: zinc, cobre y selenio, y también para las siguientes vitaminas: vitamina C, vitamina B1, vitamina B3 y folato.

Tabla 13. Consumo medio de minerales y vitaminas por ambos grupos de estudio, control y EMA, estimados mediante FFQ.

Micronutriente	Control (n=93)	EMA (n=91)
Sodio (mg/día)	1562 ± 202.50	1862 ± 140.80
Potasio (mg/día)	3172 ± 383.80	3473 ± 239
Calcio (mg/día)	1086 ± 179.90	96.55
Magnesio (mg/día)	315.7 ± 40.60	361.4 ± 24.60
Hierro (mg/día)	15.69 ± 2.00	16.5 ± 0.99
Zinc (mg/día)	13.35 ± 1.80	8.46 ± 0.62 **
Fósforo (mg/día)	1370 ± 173.40	1623 ± 106.50
Yodo (µg/día)	48.37 ± 8.54	46.2 ± 4.48
Flúor (µg/día)	714.2 ± 112.10	709.8 ± 108.60
Cobre (µg/día)	1388 ± 177.10	653.9 ± 55.10 ***
Selenio (µg/día)	64.19 ± 8.10	25.53 ± 2.59 ***
Vit. A (µeq/día)	3983 ± 512.80	3001 ± 218.20
Vit. D (mg/día)	6.1 ± 0.83	4.47 ± 0.55
Vit. C (µeq/día)	293.4 ± 43.34	150.9 ± 14.72 **
Vit. E (µg/día)	5.47 ± 0.88	5.39 ± 0.48
Vit. B1 (mg/día)	1.53 ± 0.21	0.889 ± 0.072 **
Vit. B2 (mg/día)	1.76 ± 0.24	1.2 ± 0.08
Vit B3 (mg/día)	21.83 ± 3.5	11.02 ± 0.87 **
Vit. B6 (mg/día)	1.722 ± 0.22	1.83 ± 0.11
Vit. B12 (µg/día)	3.811 ± 0.52	4.979 ± 0.44
Folate (µg/día)	256.4 ± 24.76	201.4 ± 22.85 *

Los datos se muestran como valores medios ± EEM. Significativamente diferente del grupo de control (* $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba t de Student). EMA: edad materna avanzada.

6.2.3. Ingesta media de polifenoles

Las ingestas medias de polifenoles totales, por grupos y subgrupos se muestran en la Tabla 14. En cuanto a su ingesta, no se observaron diferencias notables entre los grupos de estudio. Las principales diferencias se observaron en algunos componentes del grupo de los flavonoides: se observó una mayor ingesta de antocianinas en el grupo EMA en comparación con el grupo control (90.46 ± 9.38 mg/día frente a 56.11 ± 7.103 mg/día, respectivamente) ($p < 0.01$), flavonas (43.06 ± 4.97 mg/día frente a 29.2 ± 3.77 mg/día, respectivamente) ($p < 0.05$) y flavonoles (94.5 ± 10.67 mg/día frente a 58.85 ± 6.62 mg/día, respectivamente) ($p < 0.05$). También se observó una mayor ingesta de hidroxifenilpropenos en el grupo EMA (0.499 ± 0.101 mg/día) en comparación con el grupo control (0.197 ± 0.064 mg/día) ($p < 0.05$). El resto de polifenoles estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 14. Ingesta media de grupos y subgrupos de polifenoles estimados mediante FFQ en ambos grupos de estudio, control y EMA.

Grupo	Subgrupo	Control (n=93)	EMA (n=91)
Polifenoles totales (mg/día)		1509 ± 232	1335 ± 120.9
Flavonoides (mg/día)		532.2 ± 92.98	650.4 ± 74.62
	Anthocianinas	56.11 ± 7.103	90.46 ± 9.38**
	Chalcones	0.0017 ± 0.001	0.000726 ± 0.0004
	Dihydrochalcones	3.185 ± 0.55	2.230 ± 0.42
	Dihydroflavonoles	0.193 ± 0.049	0.202 ± 0.031
	Flavanoles	352.6 ± 58.76	369.1 ± 37.92
	Flavonones	50.69 ± 9.66	36.14 ± 5.53
	Flavones	29.2 ± 3.77	43.06 ± 4.97*
	Flavonoles	58.85 ± 6.62	94.5 ± 10.67*
	Isoflavonoides	0.473 ± 0.086	0.283 ± 0.028
Ácidos Fenolicos (mg/día)		955.8 ± 202.2	817.8 ± 124.9
	Ácidos Hydroxibenzoicos	102 ± 19.18	99.92 ± 13.32
	Ácidos Hydroxicinnamicos	879.3 ± 203.8	725 ± 116.7
	Ácidos Hydroxyphenylaceticos	3.119 ± 0.818	3.299 ± 0.538
	Ácidos Hydroxyphenylpropanoicos	0.223 ± 0.06	0.275 ± 0.05
	Ácidos Hydroxyphenylpropenos	0.197 ± 0.064	0.499 ± 0.101*
Lignanós (mg/día)		28.4 ± 3.79	35.09 ± 4.129
Stilbenos (mg/día)		0.112 ± 0.02	0.136 ± 0.01
Otros polifenoles (mg/día)		59.01 ± 7.52	64.34 ± 6.26
	Alkylmethoxyphenoles	5.94 ± 1.19	4.01 ± 0.49
	Alkylphenoles	26.22 ± 4.95	33.53 ± 4.74
	Hydroxybenzaldehydos	0.02 ± 0.004	0.27 ± 0.004
	Hydroxybenzoketonas	0.00018 ± 0.00005	0.00037 ± 0.0001
	Hydroxycoumarinas	0.0004 ± 0.0001	0.001 ± 0.0004
	Methoxyphenoles	0.578 ± 0.15	0.451 ± 0.09
	Naphtoquinonas	0.082 ± 0.02	0.03 ± 0.004
	Tyrosoles	22.38 ± 4.31	23.8 ± 2.57
	Otros polifenóles	5.12 ± 1.36	2.95 ± 0.59

EMA: edad maternal avanzada. Los datos se muestran como media de los valores ± EEM (* p < 0.05;

**p<0.01, test t-student).

6.2.4. Comparación de las ingestas medias de nutrientes con los valores dietéticos de referencia para población de embarazadas en España

La Figura 11 muestra una comparativa entre la ingesta de nutrientes estimada por el FFQ y las IDR indicados por la AESAN. Para la mayoría de los nutrientes, se observa que el grupo EMA se encuentra muy por debajo de las recomendaciones para minerales como zinc, cobre y selenio y vitaminas del complejo B como B1, B2 y B3. Hay otros nutrientes como los hidratos de carbono, el hierro, el yodo, el flúor, la vitamina D, la vitamina E y el ácido fólico que están por debajo de los DRV en ambos grupos.

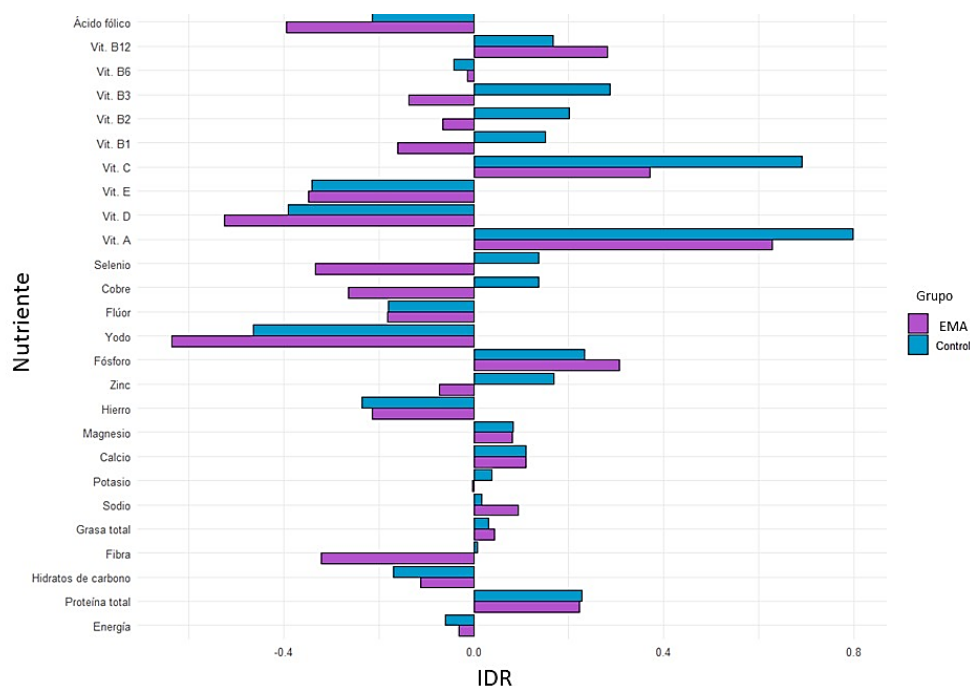


Figura 11. Comparativa entre la ingesta de nutrientes estimada por el FFQ y las IDR indicados por la AESAN. EMA: edad materna avanzada; IDR: ingestas dietéticas de referencia.

6.2.5. Correlación entre la ingesta dietética de nutrientes y las medidas antropométricas del recién nacido

Los coeficientes de correlación y los valores p de todas las correlaciones entre la ingesta de nutrientes durante el embarazo y las características antropométricas del recién nacido, medidas el día del parto, se muestran en la Tabla 1 del anexo.

6.2.5.1. *Macronutrientes e ingesta total de energía*

Se midió la correlación entre las medidas antropométricas del recién nacido y la ingesta estimada de macronutrientes, y en la Figura 12 se muestra un heatmap con los coeficientes de correlación. Se encontró una correlación negativa significativa entre el consumo total de fibra y el perímetro cefálico del recién nacido con un coeficiente de correlación (r) de -0.41 y $p = 0.03$.

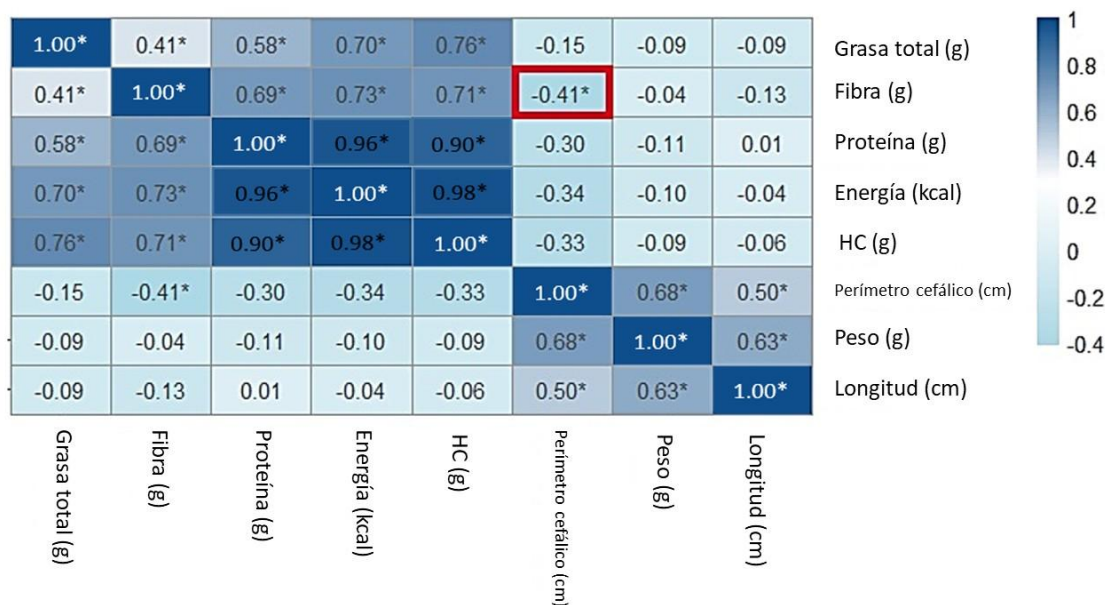


Figura 12. Heatmap de las correlaciones entre energía y macronutrientes, incluyendo fibra, y medidas antropométricas del recién nacido (* $p < 0.05$, en cuadrado rojo). HC: hidratos de carbono.

6.2.5.2. Minerales

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la correlación entre el perímetro cefálico, la longitud y el peso y la ingesta de minerales, todos los datos pueden observarse en la Tabla 1 del anexo.

6.2.5.3. Vitaminas

Con respecto a estos micronutrientes, se encontraron algunas correlaciones significativas. El heatmap de las vitaminas puede observarse en la Figura 13. Se encontraron correlaciones

significativas entre el perímetro cefálico, la vitamina A ($r = -0.38$, $p = 0.01$) y la vitamina E ($r = -0.41$, $p = 0.03$).

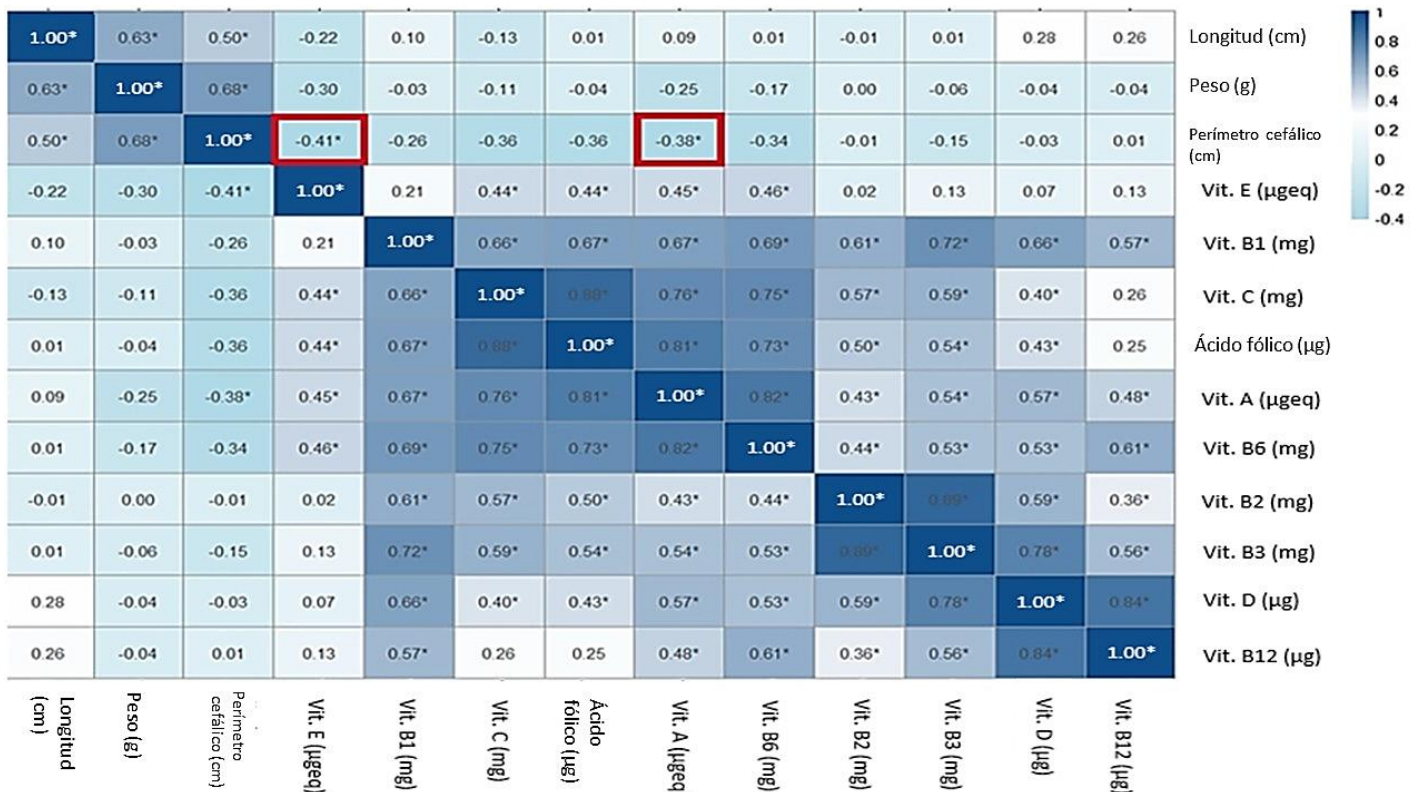


Figura 13. Heatmap de las correlaciones entre vitaminas y medidas antropométricas del recién nacido (* $p < 0.05$, en cuadrado rojo).

6.2.6. Modelo de regresión para las asociaciones entre la ingesta de nutrientes y las medidas antropométricas de los recién nacidos

Los nutrientes que estaban significativamente correlacionados ($p < 0.05$) con cualquiera de las medidas antropométricas del recién nacido se transformaron en un modelo multivariable de regresión por pasos (modelo de regresión Stepwise) como predictores candidatos de cualquiera de las medidas. Como se muestra en la Figura 14, el consumo de fibra durante la gestación podría ser un factor predictor de la circunferencia craneal con un índice de estimación de -0.037.

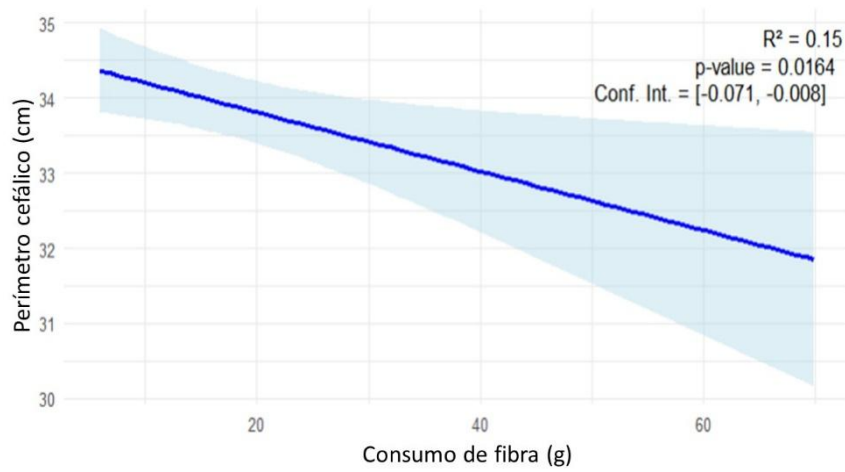


Figura 14. Línea de regresión entre el consumo de fibra medio y el perímetro cefálico del recién nacido.

6.3. Perfil de adipocinas placentarias

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en cuanto a GIP, grelina, GLP-1, e irisina. Sin embargo, la concentración placentaria de insulina y visfatina fue estadísticamente superior en el grupo EMA ($p < 0.05$) y, por el contrario, la de glucagón, PAI-1, resistina y leptina fue inferior en comparación con el grupo de control ($p < 0.05$) (Figura 15).

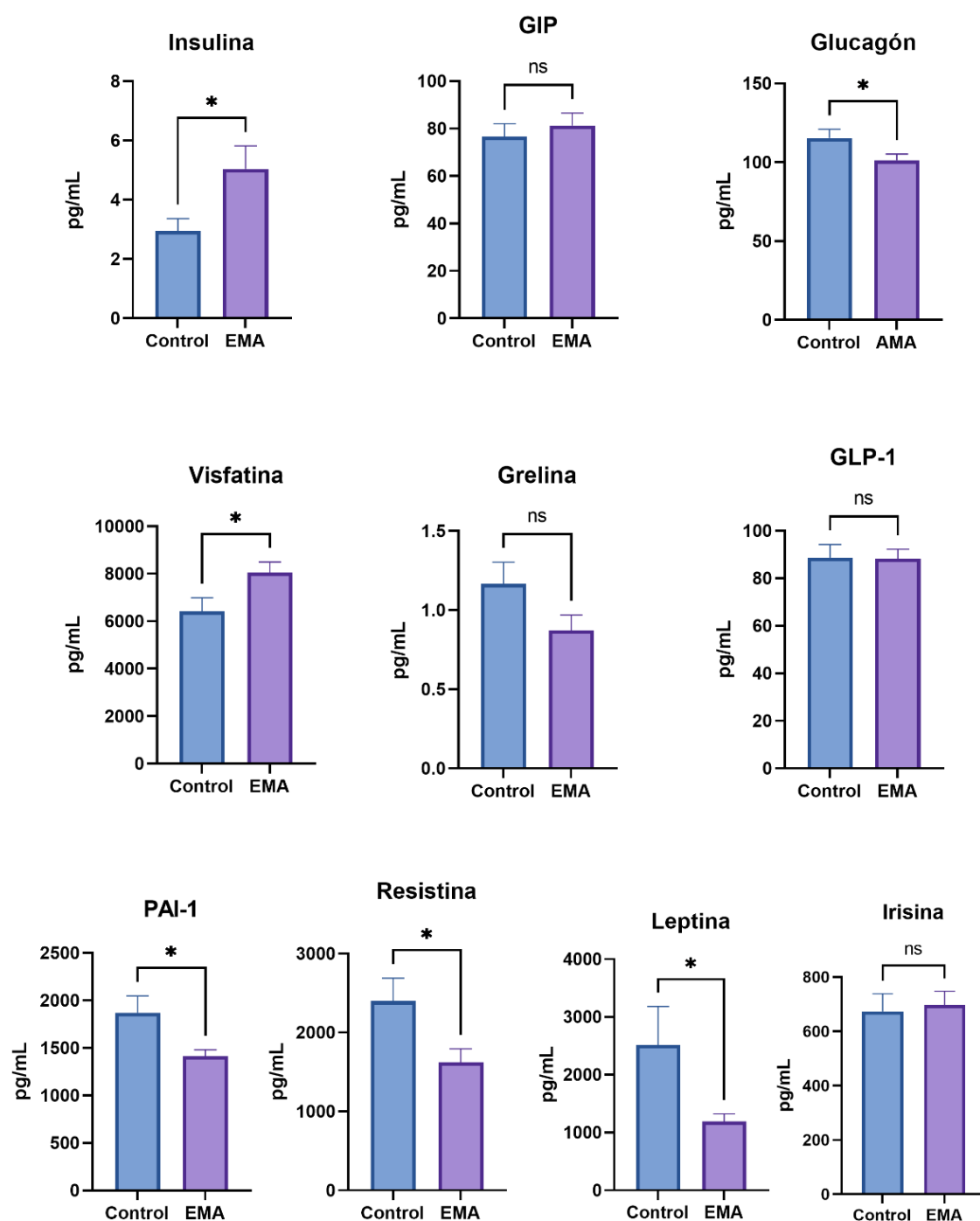


Figura 15. Expresión de adipocinas placentarias en ambos grupos de estudio. Los datos se representan como valores medios $\pm$ EEM. EMA: Edad materna avanzada; ns: no significativo. (* $p < 0.05$, test t-student).

6.3.1. Perfil de adipocinas placentarias divididas por el sexo del recién nacido

En las placentas de los fetos masculinos del grupo EMA, los niveles de insulina fueron significativamente superiores en comparación con los de las placentas de los fetos masculinos del grupo de control ($p < 0.05$). Por el contrario, los niveles placentarios de glucagón y leptina fueron significativamente más bajos en las placentas de los fetos masculinos del grupo EMA en comparación con los del grupo control ($p < 0.05$). Los niveles de leptina también fueron significativamente más bajos en las placentas de los fetos masculinos del grupo EMA en comparación con los fetos femeninos de los grupos control y EMA ($p < 0.05$). Además, los niveles placentarios de PAI-1 en los fetos femeninos del grupo EMA fueron significativamente inferiores a los de los fetos masculinos del grupo control ($p < 0.05$).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de GIP, visfatina, grelina, GLP-1 e irisina entre los grupos de estudio, diferenciados por sexo (Figura 16).

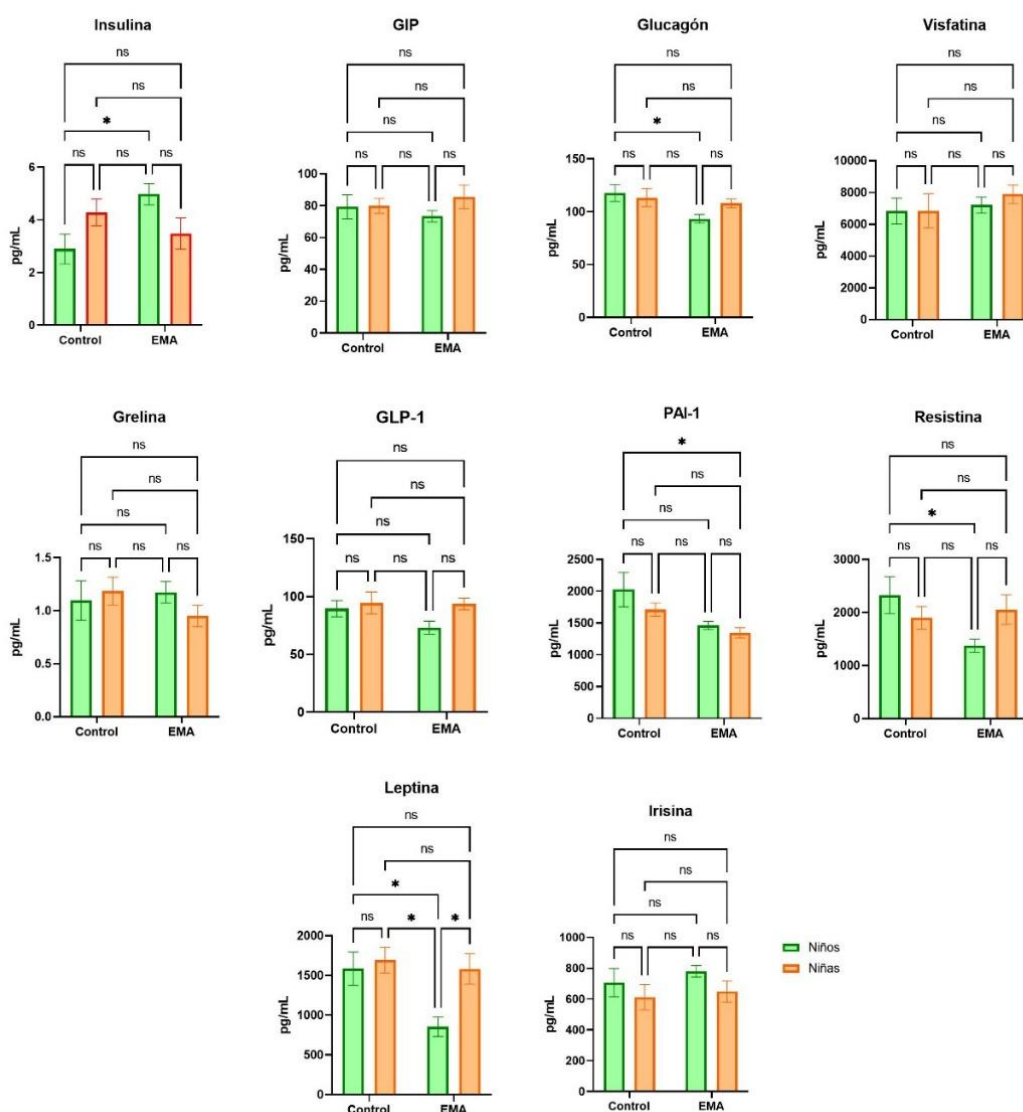


Figura 16. Expresión de adipocinas placentarias diferenciadas por el sexo del feto. Los datos se representan como valores medios $\pm$ EEM. EMA: Edad materna avanzada; ns: no significativo. (* $p < 0.05$, test t-student).

6.3.2. Correlación entre las adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas del recién nacido

No se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Figura 17).

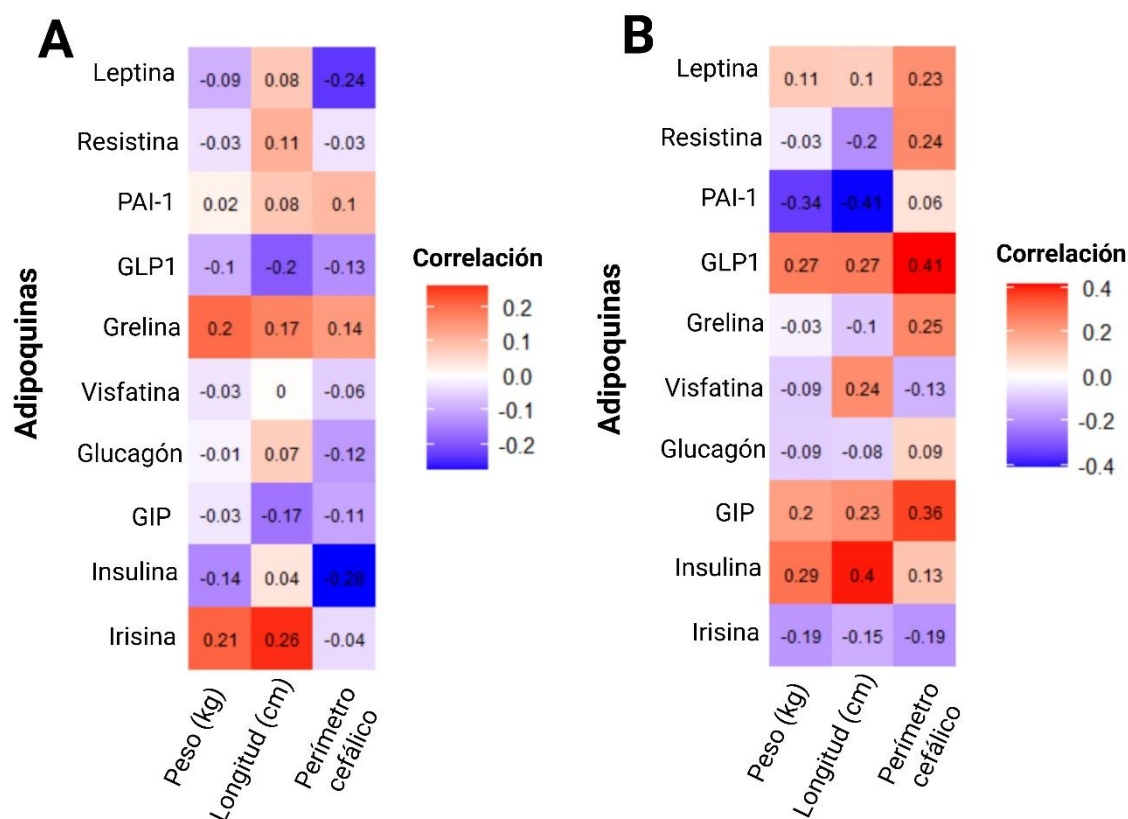


Figura 17. Heatmaps de las correlaciones entre la expresión de adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas del recién nacido. A: grupo control; B: Grupo EMA

6.3.3. Correlación entre las adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas del recién nacido divididas por sexo.

En placentas de fetos masculinos del grupo control, se observó una correlación negativa entre la leptina y el perímetro cefálico ($r = -0.54$, $p < 0.05$), mientras que se observó una correlación positiva entre la irisina y la longitud ($r = 0.52$, $p < 0.05$). En placentas de fetos masculinos del grupo EMA, se observó una correlación positiva entre el GIP con el peso al nacer ($r = 0.81$, $p < 0.05$) y el perímetro cefálico ($r = 0.77$, $p < 0.05$).

Al analizar placentas de fetos femeninos del grupo control, no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa. En el caso de placentas de fetos femeninos del grupo EMA, se encontró una correlación negativa entre visfatina y la circunferencia de la cabeza ($r = -0.54$, $p < 0.05$) (Figura 18).

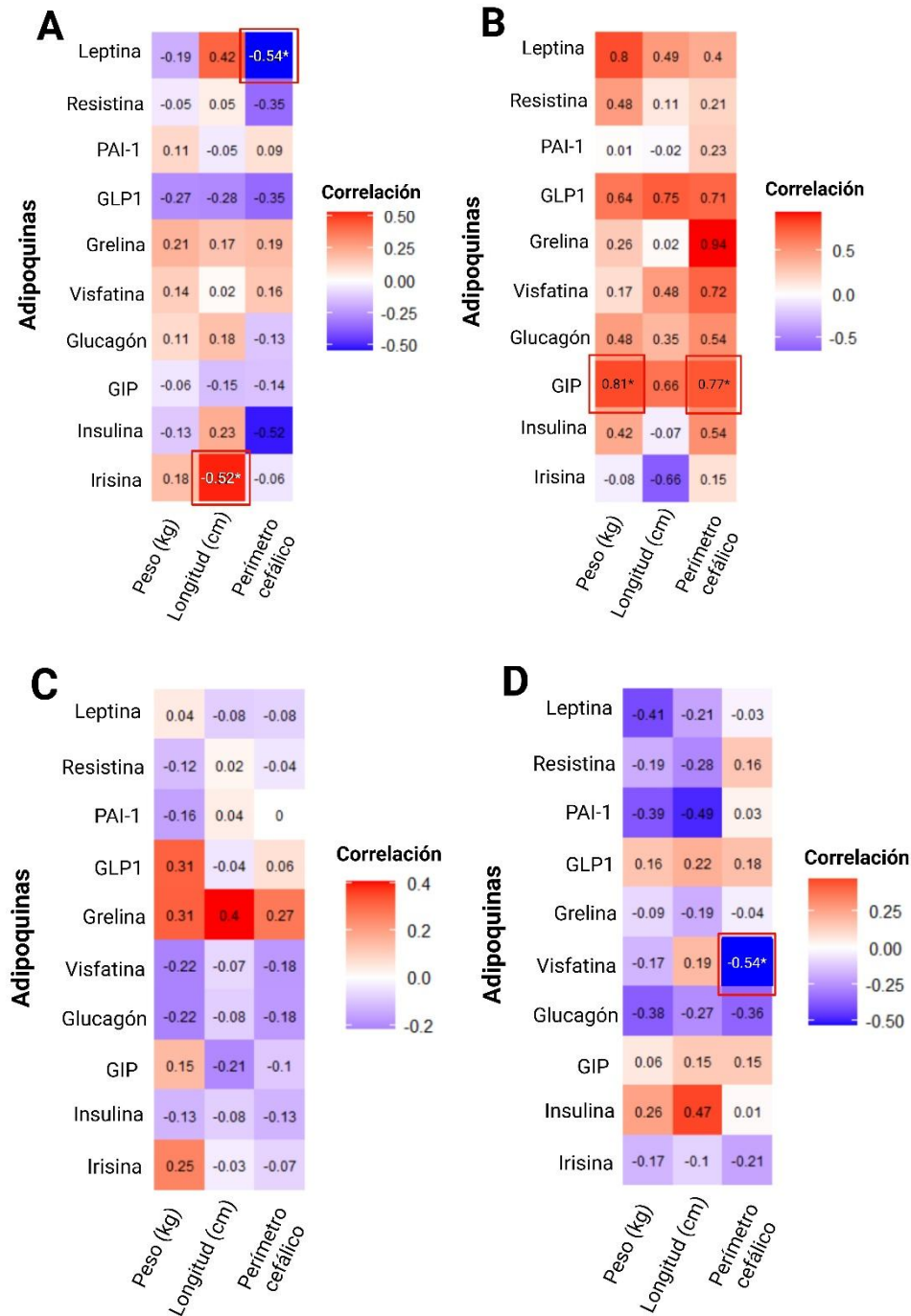


Figura 18. Heatmaps de las correlaciones entre la concentración de adipoquinas placentarias y las medidas antropométricas de los recién nacidos diferenciadas por sexo. **A:** recién nacidos del grupo control, sexo masculino; **B:** recién nacidos del grupo EMA, sexo masculino; **C:** recién nacidos del grupo control, sexo femenino; **D:** recién nacidos del grupo EMA, sexo femenino.

6.4. Expresión génica de transportadores de nutrientes a nivel placentario

Los resultados de la expresión génica de transportadores de nutrientes a nivel de placenta pueden observarse en la Figura 19. La expresión de los genes DMT1, CD36, FABP3, FABP4, LAT1 y SLC27A1 resultó no ser estadísticamente significativo entre ambos grupos de estudio.

Sin embargo, La expresión del gen SNAT1 fue significativamente mayor en el grupo control con respecto al grupo EMA ($p<0.05$), al igual que el transportador GLUT 1 ($p<0.001$).

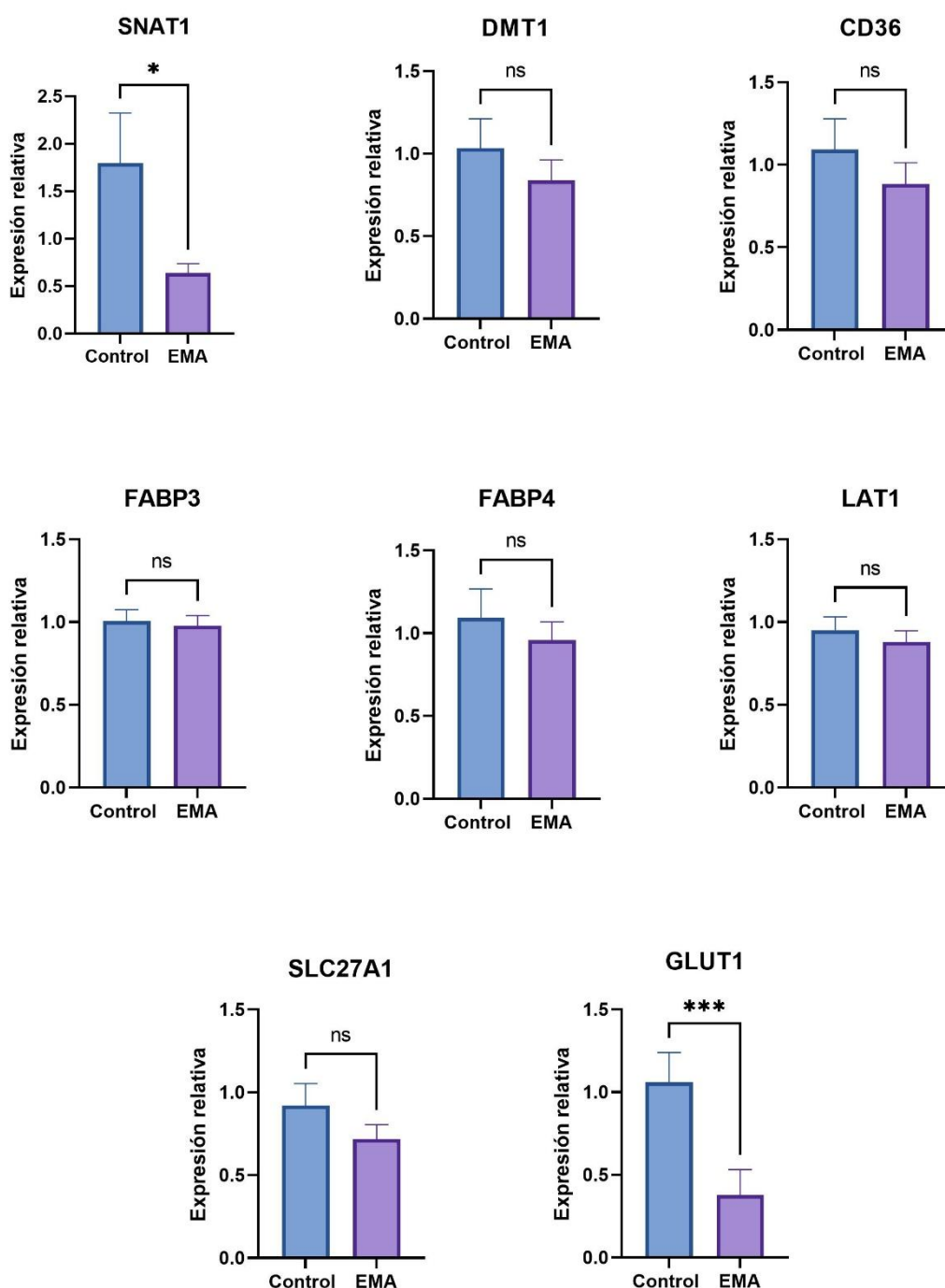


Figura 19. Expresión relativa de genes transportadores de nutrientes placentarios. Los datos se expresan como media y EEM (* $p<0.05$, *** $p<0.001$). EMA: edad materna avanzadas; ns: no significativo.

6.4.1. Expresión génica de transportadores de nutrientes a nivel placentario: comparativas según el sexo del neonato

En el grupo control, la expresión génica de los transportadores CD36 y DMT1 fue significativamente mayor en placentas de sexo femenino en comparación con las del mismo sexo del grupo EMA ($p<0.05$). Además, también lo fueron dentro del mismo grupo control comparándolas con las del sexo masculino ($p<0.01$ y $p<0.05$ respectivamente). En el caso del transportador de ácidos grasos FABP4 y del transportador de glucosa GLUT1, su expresión génica en placenta fue mayor en aquellas que procedían del sexo femenino y grupo control en comparación con el mismo grupo, pero sexo masculino ($p<0.01$ y $p<0.05$), así como con aquellas placentas de ambos sexos en el grupo EMA ($p<0.05$). La expresión génica del transportador LAT 1 resultó ser significativamente mayor en placentas control procedentes de niñas frente a placentas control masculinas ($p<0.05$). El SLC27A1 se expresó de manera significativa en placentas control que albergaron niñas al compararlas con el resto de grupos, es decir, placentas control procedentes de niños y placentas del grupo EMA en ambos sexos ($p<0.01$). Por último, la expresión de SNAT1 fue significativamente mayor en el caso del sexo femenino del grupo control al compararse tanto con placentas procedentes del mismo sexo como del sexo masculino del grupo EMA ($p<0.05$) (Figura 20).

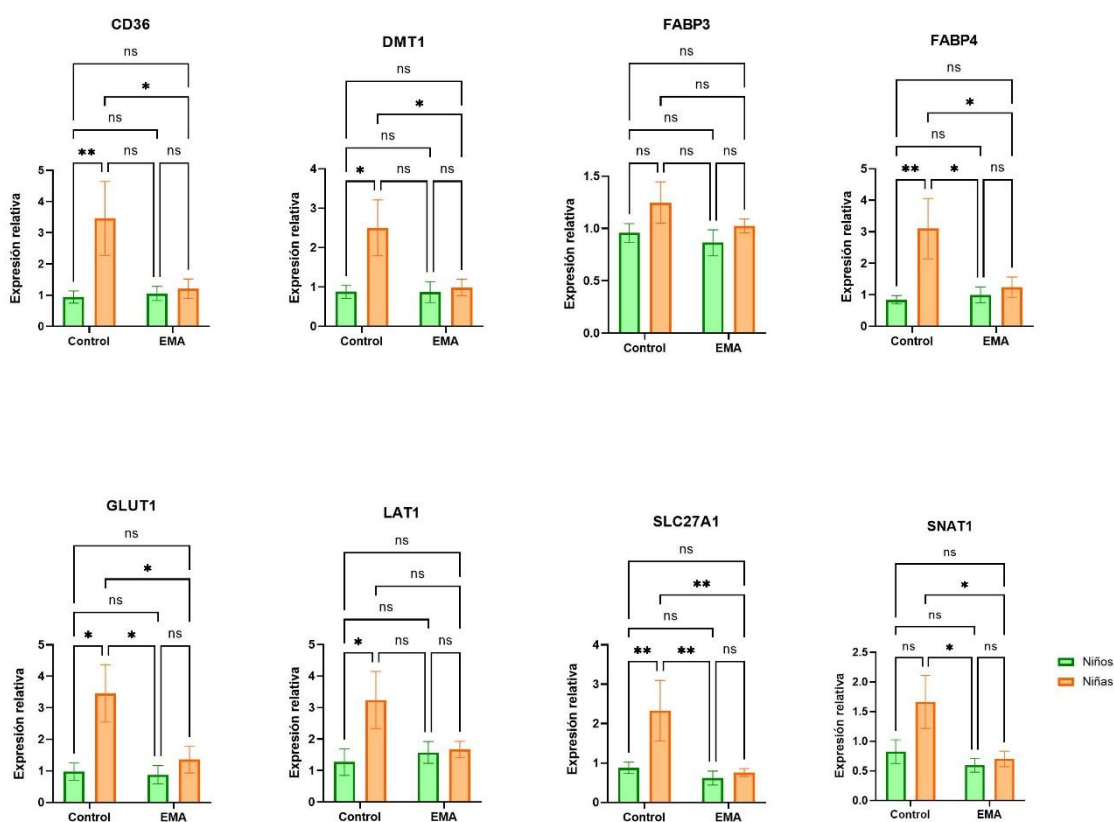


Figura 20. Expresión relativa de genes transportadores de nutrientes en la placenta dividida por sexos. Comparación mediante test estadístico ANOVA entre ambos grupos de estudio (* $p<0.05$, ** $p<0.001$). EMA: edad materna avanzadas; ns: no significativo.

6.5. Expresión proteica de transportadores de nutrientes placentarios

A nivel de expresión proteica de transportadores de nutrientes en la placenta, se encontraron diferencias significativas en DMT1 y SNAT1, siendo aquí la expresión significativamente mayor en el grupo EMA en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Para el resto de transportadores estudiados, no se encontró ninguna significancia estadística. Los resultados pueden observarse en la Figura 20.

A nivel de expresión proteica de transportadores de nutrientes en la placenta, se encontraron diferencias significativas en DMT1 y SNAT1, siendo aquí la expresión significativamente mayor en el grupo EMA en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Para el resto de transportadores estudiados, no se encontró ninguna significancia estadística. Los resultados pueden observarse en la Figura 21, así como las imágenes de las bandas detectadas por quimioluminiscencia, en la Figura 22.

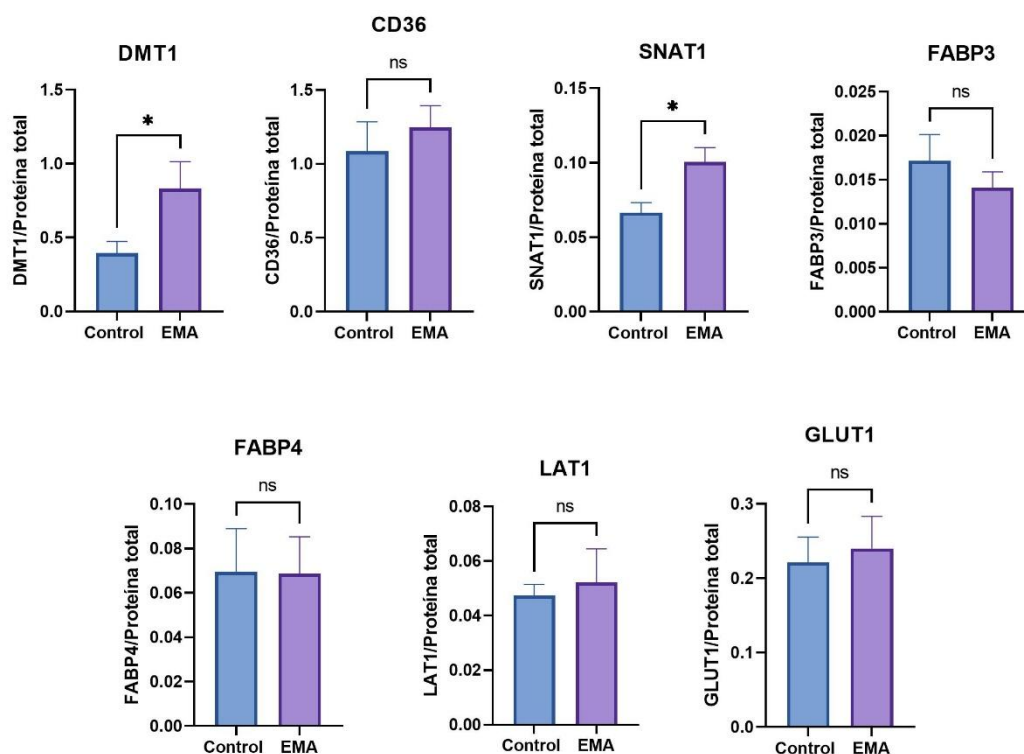


Figura 21. Expresión proteica de transportadores de nutrientes placentarios. Comparación entre ambos grupos de estudio, control y EMA, mediante t de Student o U de Mann Whitney ($*p < 0.05$). EMA: edad materna avanzadas; ns: no significativo.

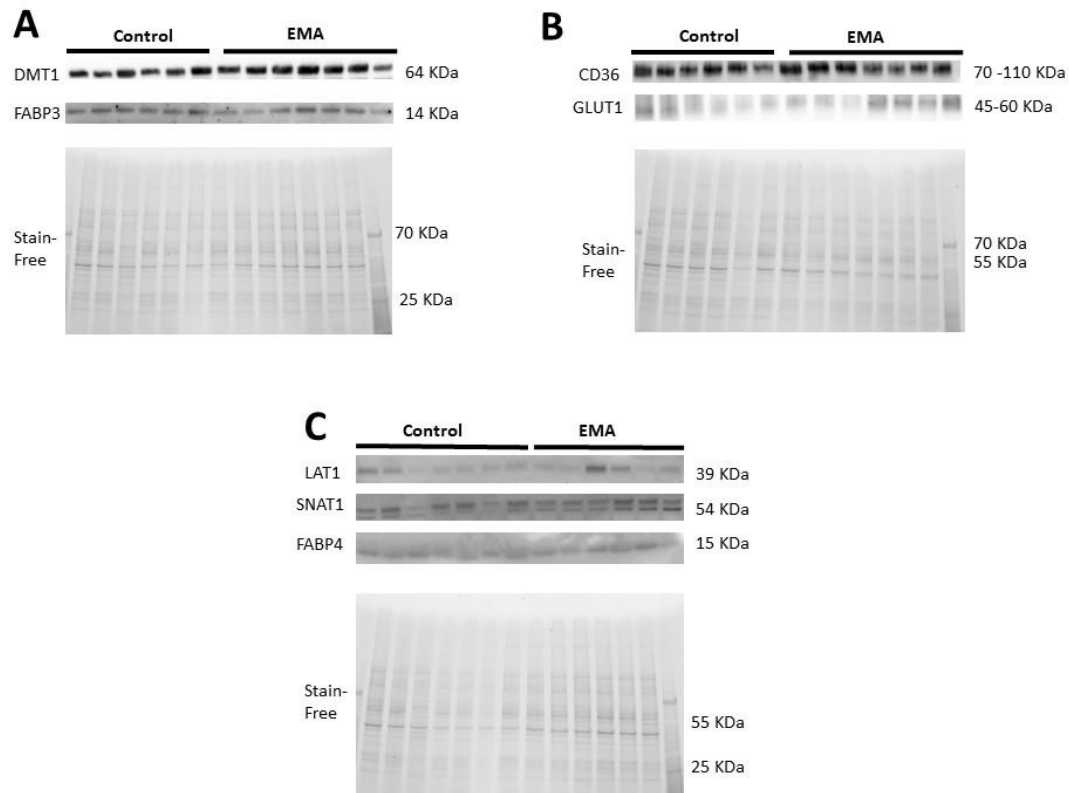


Figura 22. Imágenes de las bandas detectadas por quimioluminiscencia para los anticuerpos analizados, junto con sus respectivos geles stain-free utilizados para la normalización de la cuantificación proteica por Western blot. EMA: edad materna avanzada.

6.6. Análisis de la microbiota intestinal materna y neonatal

La abundancia relativa a nivel de filo de la microbiota intestinal de las madres de ambos grupos durante el periodo de captación (~semana 12 de gestación), tras el parto, así como la de los meconios de los recién nacidos de ambos grupos, se representan en la Figura 23. Los filos más abundantes en ambos grupos de gestantes, durante el embarazo, fueron Firmicutes, Actinobacteriota y Bacteroidota. Tras el parto, Firmicutes y Actinobacteriota predominaron de nuevo en ambos grupos, pero en el caso de las gestantes EMA, el filo Verrucomicrobia, resultó más abundante frente a Bacteroidota, que si se mantuvo en abundancia en las madres control.

Respecto a los meconios, los filos más abundantes fueron Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes para ambos grupos de estudio. Tras estos, en el grupo control lo más abundantes fueron *Bacteroidota*, *Acidobacteriota* y *Chloroflexi* por orden de abundancia relativa, frente a *Acidobacteriota*, *Chloroflexi* y *Bacteroidota* en el grupo de niños nacidos de madres EMA.

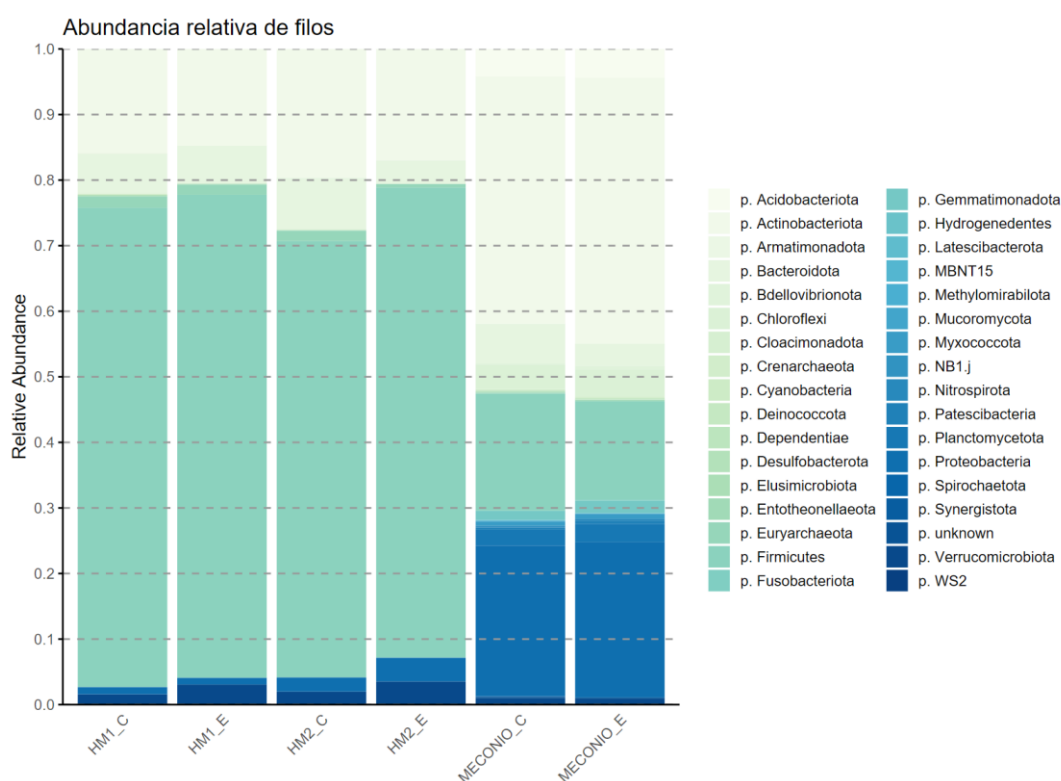


Figura 23. Gráfico de barras de la abundancia relativa de filos bacterianos encontrados en las heces de las madres de ambos grupos de estudio y en los meconios de su descendencia. HM1_C: Heces recogidas durante el embarazo de madres control; HM1_E: Heces recogidas durante el embarazo de madres EMA; HM2_C: Heces recogidas tras el parto de madres control; HM2_E: Heces recogidas tras el parto de madres EMA; MECONIO_C: meconio de los niños nacidos de madres control; MECONIOS_E: meconios de las madres nacidas de madres EMA.

La diversidad beta se muestra en la Figura 24, donde se representa la distancia de Jaccard, un índice que mide la similitud entre muestras en función de la presencia o ausencia de taxones. Los resultados indican una marcada diferencia entre las comunidades bacterianas presentes en los meconios y aquellas presentes en las heces maternas. Asimismo, se observa una relativa homogeneidad entre las comunidades bacterianas de las madres, aunque se aprecia cierta separación entre los grupos de estudio.

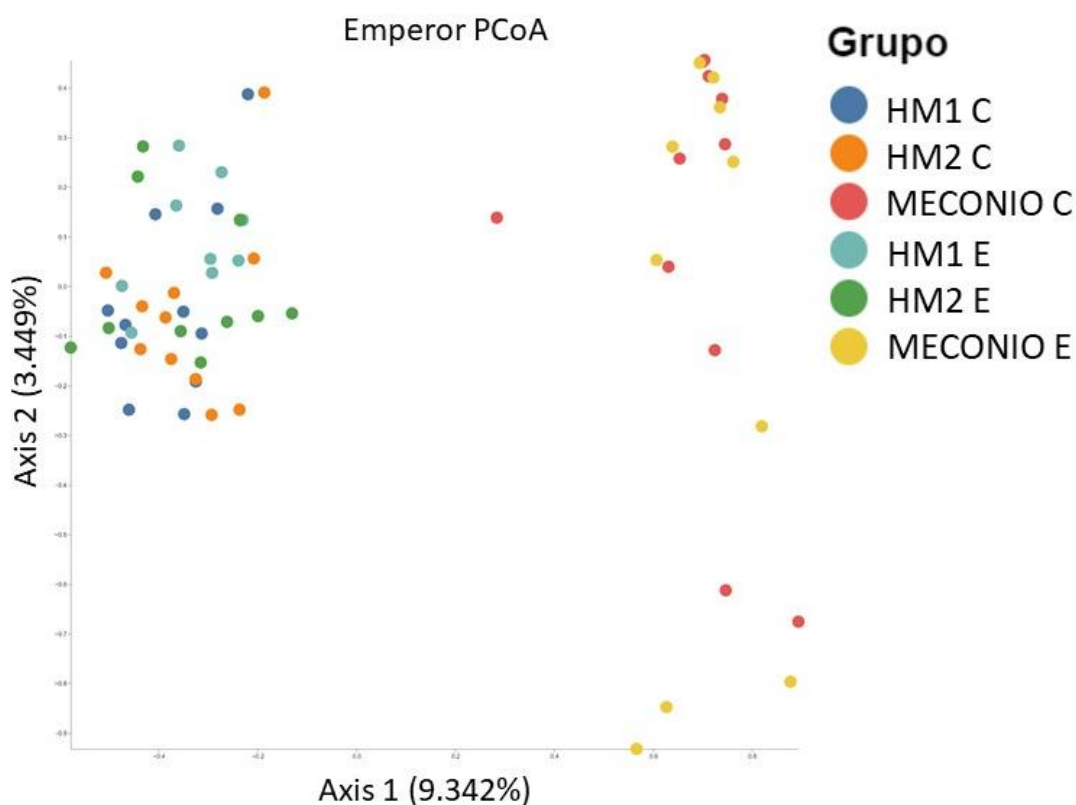


Figura 24. Diversidad beta de la microbiota intestinal entre amos grupos experimentales y los meconios de su descendencia, representada mediante distancia de Jaccard. HM1 C: Heces recogidas durante el embarazo de madres control; HM1 E: Heces recogidas durante el embarazo de madres EMA; HM2 C: Heces recogidas tras el parto de madres control; HM2 E: Heces recogidas tras el parto de madres EMA; MECONIO C: meconio de los niños nacidos de madres control; MECONIOS E: meconios de las madres nacidas de madres EMA.

6.6.1. Análisis de abundancia diferencial

Con el fin de identificar los grupos taxonómicos a nivel de familia y género que mostraban diferencias en la composición bacteriana entre las madres de ambos grupos, tanto durante el embarazo como tras el parto, así como en los meconios de sus hijos, se realizó un análisis de abundancia diferencial para comparar las abundancias relativas entre ellos. Los detalles de todas las familias y grupos secuenciados, sus valores de expresión media, logaritmo de Fold Change y *p-value*, pueden ser consultados en las tablas 2-7 del anexo, que se encuentran disponibles en el siguiente enlace debido a su excesiva extensión: <https://drive.google.com/drive/folders/1AkLjAK1uJVl4Fw3NjLkuk8COeh-vGjDP?usp=sharing>

6.6.1.1. Abundancia diferencial entre ambos grupos de estudio de los taxones procedentes de heces recogidas durante el embarazo

Las familias más abundantes y más relevantes teniendo en cuenta el objetivo que se persigue en esta Tesis Doctoral, se observan en la Figura 25. Las familias *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Atopobiaceae* presentaron una abundancia diferencial mayor en el grupo control en comparación con el grupo EMA ($p < 0.05$).

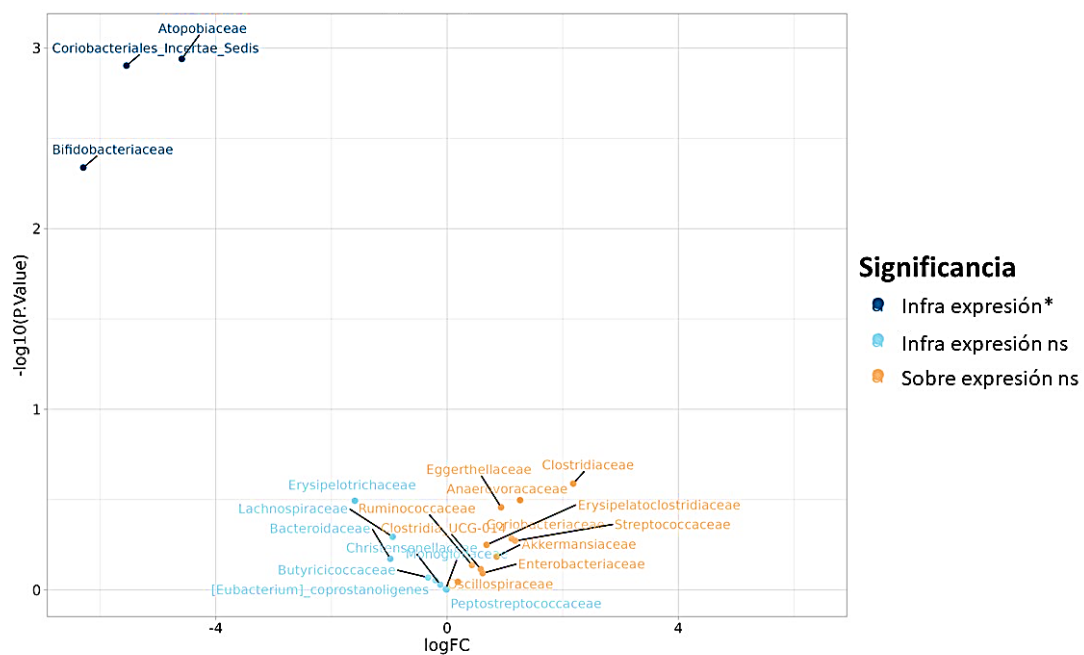


Figura 25. Volcano plot de las 20 familias de bacterias más expresadas y aquellas que presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes durante el embarazo. Representación gráfica en base al logFC: logaritmo de Fold Change; ns: no significativo; * $p < 0.05$.

A nivel de género, la Figura 26 muestra aquellos más abundantes y representativos, siendo los géneros *Bifidobacterium*, *Turicibacter*, *Butyricicoccus*, *Enorma* y dos géneros pertenecientes a la familia de los *Lachnospiraceae* (CAG-56 y NK4A136) más abundantes significativamente en el grupo control con respecto al grupo EMA ($p < 0.05$) y *Catenibacterium* y *Enterorhabdus* más abundantes en el grupo EMA ($p < 0.05$).

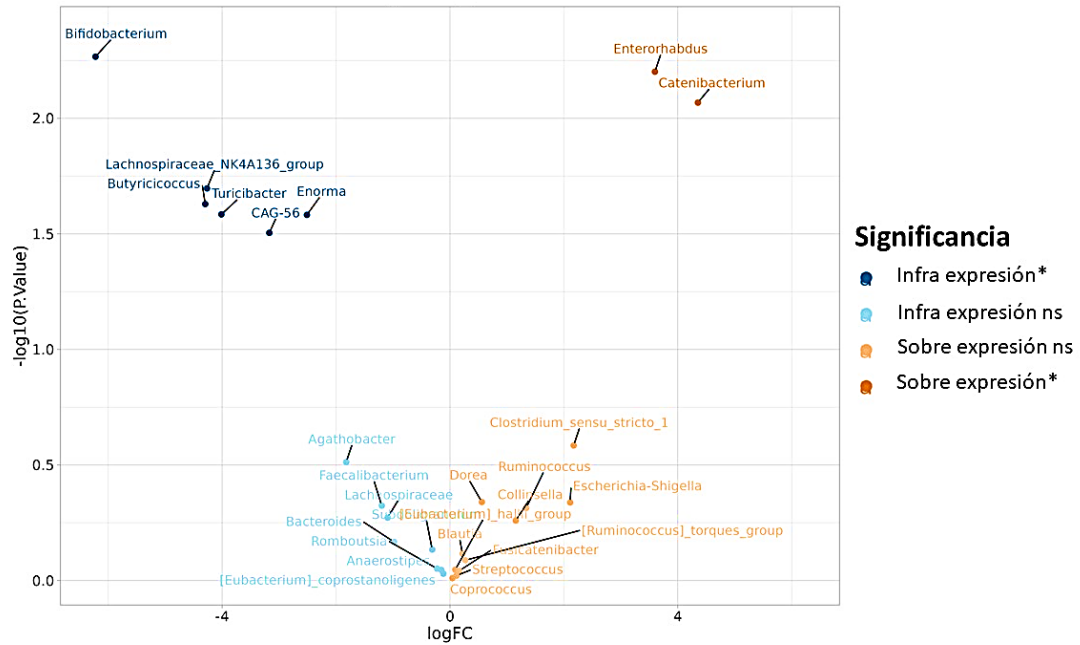


Figura 26. Volcano plot de los 20 géneros de bacterias más expresados y aquellos que presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes durante el embarazo. Representación gráfica en base al logFC: logaritmo de Fold Change; ns: no significativo; * $p < 0.05$.

6.6.1.2. Abundancia diferencial entre ambos grupos de estudio de los taxones procedentes de heces recogidas tras el parto

En la Figura 27 se destacan las familias bacterianas con mayor presencia y relevancia en los grupos estudiados. *Bifidobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Atopobiaceae* mostraron una mayor abundancia relativa en el grupo control en comparación con el grupo EMA ($p < 0,05$), mientras que la familia *Actinomycetaceae* se encontraron significativamente más representadas en el grupo EMA ($p < 0,05$).

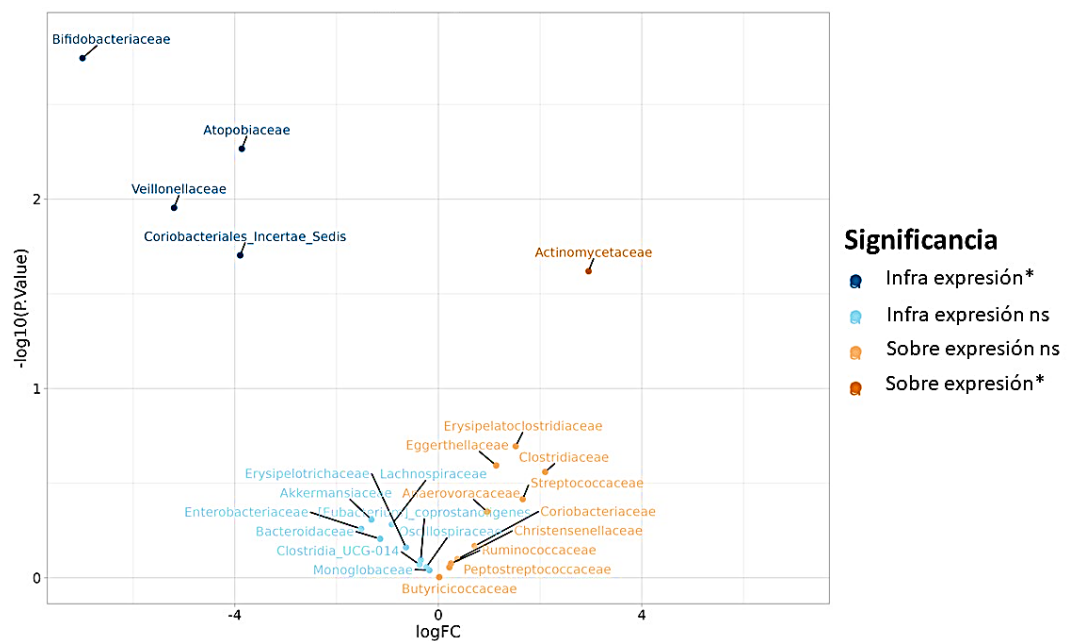


Figura 27. Volcano plot de las 20 familias de bacterias más expresadas y aquellas que, presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes tras el parto. Representación gráfica en base al logFC: logaritmo de Fold Change; ns: no significativo; * $p < 0,05$.

De forma similar, a nivel de género, la Figura 28 resalta los géneros más representativos. Entre ellos, los géneros *Bifidobacterium*, *Butyricicoccus*, *Dialister*, presentaron una abundancia significativamente superior en el grupo control frente al grupo EMA ($p < 0.05$), mientras que *Rothia*, *Catenibacterium*, *Enterorhabdus* y *Actinomyces*, se encontraron en mayor proporción en el grupo EMA ($p < 0.05$).

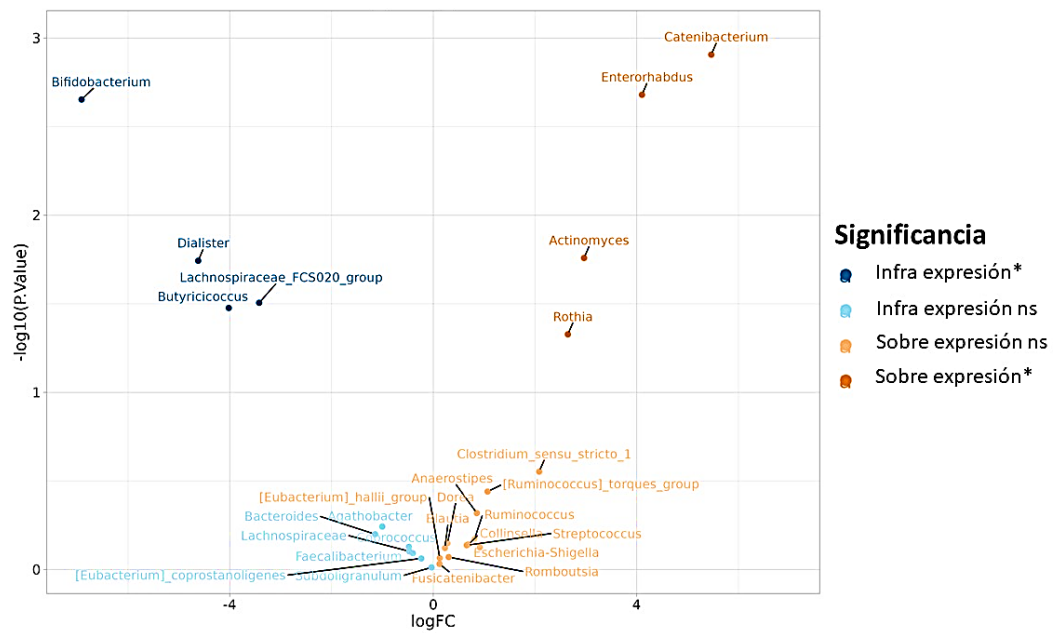


Figura 28. Volcano plot de los 20 géneros de bacterias más expresados y aquellos que, presentaron diferencias significativas en muestras de heces de las gestantes tras el parto. Representación gráfica en base al logFC: logaritmo de Fold Change; ns: no significativo; * $p < 0.05$.

6.6.1.3. Abundancia diferencial entre los taxones procedentes de los meconios de recién nacidos de ambos grupos

La Figura 29 muestra las familias bacterianas predominantes y con diferencias significativas entre los grupos estudiados. De entre todas las familias secuenciadas, *Bifidobacteriaceae*, *Veillonellaceae* y *Atopobiaceae* se encontraron más enriquecidas en el grupo control en comparación con el grupo EMA ($p < 0.05$).

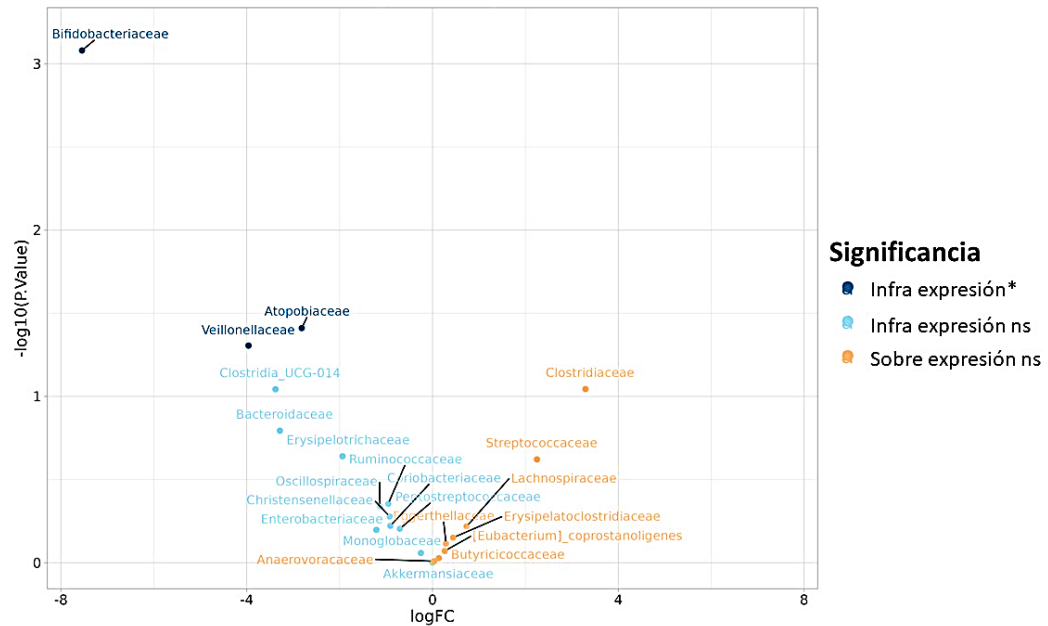


Figura 29. Volcano plot de las 20 familias de bacterias más expresadas y aquellas que, presentaron diferencias significativas en muestras de meconios. Representación gráfica en base al logFC: logaritmo de Fold Change; ns: no significativo; * $p < 0.05$.

En cuanto al nivel de género, se identificaron varios géneros con diferencias notables en su abundancia relativa. *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Colidextribacter*, fueron significativamente más abundantes en el grupo control ($p < 0.05$), mientras que *Clostridium sensu stricto 1*, *Catenibacterium*, *Enterorhabdus* y *Eubacterium brachy* mostraron una mayor presencia en el grupo EMA ($p < 0.05$) (Figura 30).

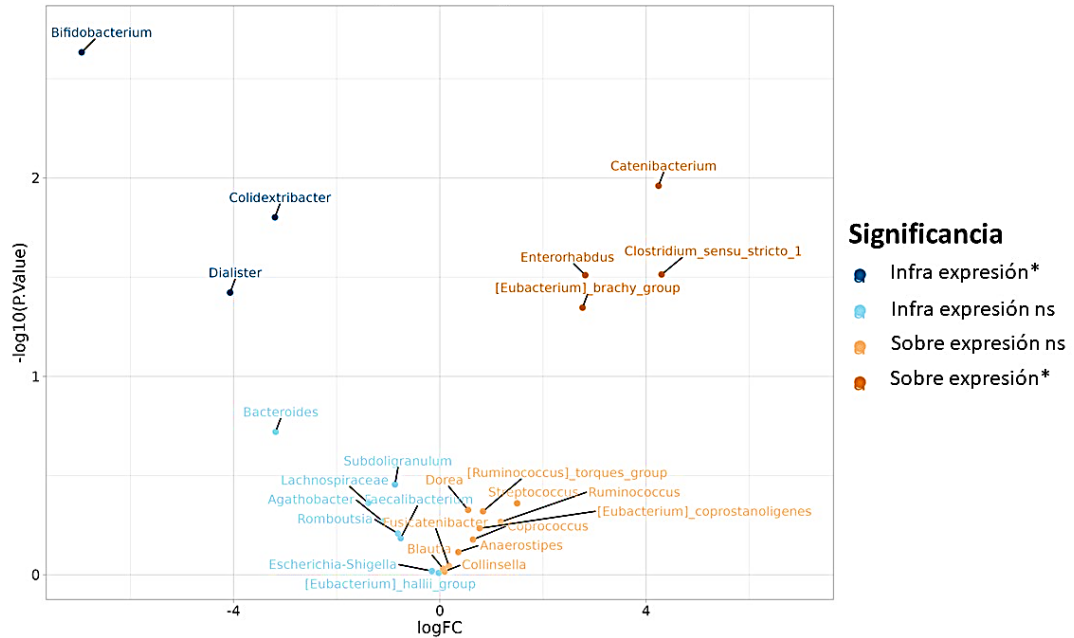


Figure 30. Volcano plot de los 20 géneros de bacterias más expresados y aquellos que, presentaron diferencias significativas en muestras de meconios. Representación gráfica en base al logFC: logaritmo de Fold Change; ns: no significativo; * $p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN

7.1. Hábitos dietéticos

El presente trabajo, hasta nuestro conocimiento, es el primero que revela que las gestantes en general, sin estratificación por edad, tienen patrones dietéticos similares; sin embargo, se profundiza en el análisis de la dieta y se analiza cada nutriente y patrón dietético, se encuentran ciertas diferencias significativas en el consumo de varios nutrientes al separar a las embarazadas en grupos de edad, según lo que la literatura científica considera edad materna avanzada. Este estudio se realizó estimando la ingesta de nutrientes mediante un FFQ validado para la población gestante (230). Estudios previos han investigado la ingesta de nutrientes en mujeres embarazadas y su influencia en los resultados fetales (231, 232); sin embargo, los hábitos dietéticos y cómo pueden influir en la salud materna y neonatal nunca se han estudiado para embarazos de EMA y nulíparas.

En relación al patrón alimentario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos de alimentos ingeridos, tanto las gestantes EMA como las control, lo que podría explicarse porque las dos ciudades estudiadas son mediterráneas y ambos grupos siguieron el patrón típico de una Dieta Mediterránea, caracterizada por ser rica en la ingesta de verduras, cereales integrales, frutos secos, legumbres, pescado y el uso de aceite de oliva como fuente de grasa (233). Con respecto a todos estos grupos de alimentos, algunos de ellos (frutas y cereales, e incluso almidón) desempeñan un papel importante en la modulación de las respuestas glucémicas (234), lo que puede tener efectos sobre algunos indicadores de salud del neonato, como las medidas antropométricas, que se comentarán a continuación.

Con respecto a la ingesta total de energía, aunque se encontró un consumo ligeramente superior de kcal por día en el grupo EMA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Cuando se compararon con las INR españolas para embarazadas, tanto las embarazadas control como EMA, no los alcanzaron, especialmente el grupo control. Este resultado concuerda con otros estudios que revelan que durante el primer trimestre de gestación, las embarazadas alcanzaron la recomendación de ingesta energética, pero la ingesta calórica no se incrementó a lo largo de los trimestres, por lo que no se alcanzaron los requerimientos energéticos recomendados (232, 235). Esto puede explicarse por el aumento transitorio durante las últimas semanas del primer trimestre de embarazo (236). En la presente Tesis Doctoral, los cuestionarios sobre alimentación se respondieron en el segundo trimestre del embarazo, en el que se supone que la ingesta calórica es mayor que en el primer trimestre, y las INR no se alcanzaron en ambos grupos. Un estudio reciente (232) explicó que esto se debe a la preocupación de las madres por el aumento excesivo de peso; por lo tanto, limitan las kilocalorías de su dieta. Sin embargo, esta parece ser una tendencia mundial, ya que, como concluye una

revisión sistemática publicada recientemente, la ingesta calórica de las mujeres embarazadas, estimada mediante FFQ en varios estudios realizados en distintos países, está por debajo de sus necesidades de ingesta diaria (237).

La correcta ingesta de macronutrientes durante el embarazo es necesaria para la formación de nuevos tejidos como la placenta y el feto y, por tanto, para el correcto desarrollo del neonato (238). Los resultados derivados de la presente Tesis Doctoral revelan que los hidratos de carbono son los únicos macronutrientes que no alcanzaron las INR en ambos grupos. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados también en mujeres embarazadas españolas (239, 240); sin embargo, la ingesta media de carbohidratos se encuentra dentro de los niveles recomendados para esta población (237). Al separar por grupos de edad, se observa un consumo de hidratos de carbono ligeramente superior, aunque no estadísticamente significativo, en el grupo EMA. Aunque no se cumplieron las recomendaciones de ingesta diaria, se podría pensar que, si el grupo EMA consume más, podrían tener mejores patrones dietéticos; sin embargo, los hidratos de carbono pueden obtenerse de un número de fuentes diferentes con distintos valores de índice glucémico (IG), que indican distintas respuestas glucémicas inducidas por los hidratos de carbono (241). Así, analizando el consumo de grupos de alimentos, se puede observar que, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, el grupo control consume cantidades ligeramente superiores de cereales y vegetales que el grupo EMA. Este hecho puede explicar el aumento significativo del consumo de fibra en las embarazadas del grupo control respecto a las del grupo EMA, a pesar de que este grupo consumió más frutas, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo. Además, el grupo de control alcanzó las INR correctas para este nutriente. La fibra dietética es un compuesto de carbohidratos de origen vegetal resistente a la digestión por el tracto gastrointestinal y puede dividirse en dos grupos, fibra soluble (frutas, verduras y legumbres) y fibra insoluble (frutos secos y cereales), y es también otro indicador de la dieta mediterránea (233). Existe otro tipo de fibra, conocida como almidón resistente, que procede de las patatas y el arroz cocidos (242). El embarazo puede beneficiarse de las dietas con un IG bajo y ricas en fibra, ya que ayudan a reducir el colesterol sanguíneo, regulan el azúcar en sangre y favorecen la lactancia (105), por lo que este patrón de ingesta de hidratos de carbono puede ayudar a conseguir un peso saludable durante el embarazo y para los neonatos (243). Con respecto a este nutriente, se encontró una correlación negativa entre la ingesta de fibra y el perímetro cefálico, lo que indica que un menor consumo de fibra durante el embarazo aumenta el riesgo de un mayor perímetro cefálico, que está estrechamente correlacionado con el volumen intracraneal y es un predictor del volumen cerebral, demostrándose mediante regresión lineal que el consumo de fibra durante el embarazo puede ser un factor predictivo del perímetro cefálico, con una estimación de -0.037. Esto significa que, en nuestra población de embarazadas del sureste español, cuando se añade una unidad de ingesta de fibra, el perímetro cefálico disminuye en 0,037

cm. Aunque se trata de una estimación bastante baja, puede considerarse de elevada relevancia, ya que, si se extrapola a la población general, se podría decir que con un 95% de probabilidad, los centímetros que disminuirá el perímetro cefálico por cada unidad de aumento de fibra, estará entre -0.07 y -0.008 cm (siendo estos valores el intervalo de confianza de la recta resultante del modelo de regresión para las asociaciones entre la ingesta de nutrientes y las medidas antropométricas neonatales). Cualquier alteración en el tamaño cefálico neonatal en el momento del nacimiento puede indicar diversos grados de disfunción neurológica en la infancia (244). Este hecho puede explicarse por varios mecanismos. En primer lugar, como ya se ha mencionado, el IG y, por tanto, la reducción de los picos glucémicos que el consumo de fibra induce en el metabolismo de la materno, producen a su vez una disminución de la secreción de insulina. Dado que la ingesta de fibra en el grupo EMA es estadísticamente significativamente menor que en el grupo control, la homeostasis glucídica podría verse alterada y, como consecuencia, causar hiperinsulinemia que, en mujeres embarazadas, se asocia con macrosomía fetal, incluyendo un mayor perímetro cefálico (245). Por último, la ingesta de fibra promueve una microbiota intestinal sana, que podría fermentar la fibra y producir AGCC (157). Estos AGCC, al igual que el butirato, aumentan la saciedad, el gasto energético, reducen los niveles de AMPc en los adipocitos, modulan el metabolismo y mejoran la sensibilidad a la insulina (246). Aunque la relación entre la ingesta de fibra y el perímetro cefálico no está totalmente establecida y se necesitan más investigaciones, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral concuerdan con los mostrados por Paknahad y col. en 2019 (247). No solo se ha encontrado esta relación, sino que, además, como se ha indicado anteriormente, la ingesta de fibra en el grupo de EMA es significativamente menor que en el grupo de control. La ingesta de fibra disminuye a lo largo de la vida (248), y teniendo en cuenta todos los problemas que esto puede inducir durante el embarazo, para la salud materno-fetal y las alteraciones metabólicas asociadas, como la obesidad infantil (249), es necesario seguir investigando en este campo, además de revisar las actuales guías nutricionales para la población gestante.

En el presente trabajo, se ha encontrado una mayor ingesta de proteínas en comparación con estudios anteriores (250), y en ambos grupos, el consumo diario fue similar. Sin embargo, es importante tener en cuenta no sólo la cantidad de proteína, sino también la calidad. Cabe destacar que la proteína animal se considera una proteína completa, ya que proporciona los nueve aminoácidos esenciales, mientras que la proteína de los alimentos de origen vegetal (legumbres y frutos secos) se considera «incompleta» porque a menudo carece de uno o más aminoácidos esenciales o tiene proporciones insuficientes de los mismos (251). Además, también es importante señalar que la biodisponibilidad de las proteínas de origen vegetal puede ser menor debido a la presencia de compuestos como los fitatos y los taninos, que pueden interferir en la absorción de determinados aminoácidos (252). En consecuencia, al analizar el consumo de grupos de

alimentos, el grupo control presenta una tendencia a consumir más proteína animal, mientras que las mujeres de EMA consumen más proteína vegetal, con las posibles consecuencias nutricionales que ello puede tener. También se observa, tanto en el grupo control como en el de EMA, que este macronutriente alcanza, e incluso supera, las INR. Dado que las proteínas intervienen en procesos estructurales y funcionales, una ingesta adecuada de las mismas asegurará un correcto suministro para el metabolismo y crecimiento fetal (253), pero en este caso, la ingesta es ligeramente superior en comparación con las INR, y una ingesta elevada de proteínas se ha relacionado con un aumento del peso al nacer (254) pero con efectos modestos, que no se observaron en el presente estudio, ya que todos los recién nacidos estaban dentro de su percentil correspondiente. Aun así, se ha establecido que entre el 10 y el 25% de la ingesta total de energía procedente de proteínas parece ser segura para las mujeres embarazadas (105), y en el presente estudio, la ingesta de ambos grupos se situó en torno al 20% de la energía total. No obstante, debe tenerse en cuenta tanto la cantidad como la calidad de las proteínas que se ingieren.

El último macronutriente analizado fueron los lípidos totales. Tanto en las gestantes del grupo control como en las del grupo EMA, la ingesta de este macronutriente es ligeramente elevada, pero dentro de valores normales y saludables, ya que ambos grupos de estudio cumplen las INR. Otros estudios han encontrado una ingesta del 25-35% de la energía total obtenida de este macronutriente (255), al igual que en el presente estudio, lo que se considera una ingesta adecuada. Al igual que ocurre con la fuente de origen en el consumo de proteínas, es importante conocer el origen de los lípidos consumidos. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, revelan que, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, puede observarse una pequeña tendencia hacia un mayor consumo de colesterol y ácidos grasos saturados (AGS), así como de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), en el grupo de madres ≥ 35 años. Estos ácidos grasos son necesarios para el crecimiento y desarrollo de los tejidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el DHA y el EPA, que son cruciales durante el embarazo para satisfacer las necesidades tanto del feto en desarrollo como de la madre (115). La correcta ingesta de lípidos totales, así como de diferentes ácidos grasos, tiene un papel importante en la salud del recién nacido, ya que un consumo excesivo de ácidos grasos se ha correlacionado con obesidad infantil, resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares (117), y este aspecto, por las razones indicadas anteriormente, debería estudiarse con mayor profundidad en el grupo de madres de EMA.

En cuanto a los micronutrientes, se ha encontrado la ingesta de tres minerales, zinc, cobre y selenio, fue significativamente menor en el grupo EMA y, además, se encontró, en este grupo, muy por debajo de las INR. El zinc es un componente de más de 200 enzimas y de varios nucleótidos, proteínas y hormonas y desempeña un papel muy importante en múltiples procesos fisiológicos (256). Los déficits de zinc contribuyen a millones de muertes maternas e infantiles al

año, la mayoría en países en vías de desarrollo (257). También se han asociado a partos prolongados, neonatos prematuros, restricción del crecimiento fetal y bajo peso al nacer (258). El cobre y el selenio son los siguientes cuya ingesta en el grupo EMA es considerablemente inferior en comparación con el grupo de control, y su consumo no alcanza las INR en las madres mayores. El cobre es un cofactor esencial de enzimas como la citocromo c oxidasa, crucial para el desarrollo cerebral y neurológico, cuya deficiencia puede conducir a un desarrollo incompleto no sólo de las estructuras cerebrales sino también del cerebro (259), así como de las estructuras óseas y los tejidos conectivos al ser vital en la función de la lisil oxidasa, enzima implicada en la formación de colágeno y elastina (260). Por otro lado, el selenio desempeña un papel importante en el desarrollo fetal debido a su función antioxidante, ya que es un componente esencial de las selenoproteínas, como la glutatión peroxidasa (261). Además, el estrés oxidativo derivado de niveles bajos de selenio puede estar relacionado con el crecimiento fetal al restringir el flujo sanguíneo placentario (262). Por lo tanto, una ingesta menor de estos minerales puede desempeñar un papel crucial durante el embarazo y en el desarrollo neonatal.

En cuanto al grupo de vitaminas, el consumo de vitamina B1 (tiamina), vitamina B3 (niacina), vitamina C y folato es estadísticamente diferente entre grupos las embarazadas control y EMA, siendo mayor en el grupo de gestantes menores de 35 años. Además, respecto a las INR, las vitaminas B1, B2 y B3 se encuentran por debajo de los mismos en ambos grupos. En este sentido, diversos estudios han relacionado la deficiencia de vitamina B1 con problemas en el desarrollo cerebral fetal, debido a alteraciones en la síntesis de lípidos y nucleótidos en el cerebro causadas por alteraciones en los sistemas enzimáticos dependientes de tiamina (263). Esta deficiencia contrasta con otros estudios realizados en España, que informan de un consumo similar en mujeres embarazadas pero sin diferenciar por rangos de edad (232). En el caso del ácido fólico, una vitamina hidrosoluble del grupo B, su deficiencia provoca la acumulación de homocisteína, que puede conducir a resultados adversos del embarazo y a problemas relacionados con el crecimiento del tubo neural. Las concentraciones de folato tienden a disminuir durante el embarazo, debido a la demanda fetal junto con una disminución de sus niveles con la edad, debido a factores ya mencionados como los cambios en el sistema gastrointestinal y la capacidad de absorción de vitaminas y minerales (264). Por lo tanto, la suplementación en el período periconcepcional como la posterior a la concepción son esenciales (265); sin embargo, tal como se ha evidenciado en este estudio, la suplementación por sí sola podría no ser suficiente para cubrir los requerimientos, por lo que es importante destacar la necesidad de incrementar el consumo de alimentos ricos en folato especialmente en embarazadas con edad superior o igual a 35 años. Esta estrategia podría contribuir al cumplimiento de las necesidades nutricionales, en combinación con la suplementación, y así prevenir posibles problemas de salud en el recién nacido. En el caso de la vitamina C, el patrón observado es opuesto al descrito previamente para otras vitaminas.

Aunque ambos grupos alcanzaron las INR, el grupo control presentó un consumo significativamente mayor en comparación con el grupo de mujeres con edad materna avanzada. La vitamina C es una vitamina antioxidante cuya función principal es prevenir la aparición del estrés oxidativo (266), el cual se considera un mecanismo común implicado en la fisiopatología de ciertas complicaciones del embarazo, como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), y se ha asociado también a enfermedades no transmisibles en la infancia, como la obesidad y la diabetes tipo 2 (267). Por el contrario, y basándose en este mismo mecanismo, una ingesta excesiva podría alterar la señalización oxidativa normal y reducirla en exceso, lo cual limitaría el crecimiento cerebral óptimo y, por ende, el perímetro cefálico. La evidencia científica respecto a la suplementación con esta vitamina es, por tanto, contradictoria, e incluso se han observado efectos adversos (266). También se observa una asociación negativa entre el perímetro cefálico y la vitamina A. No obstante, en este caso, ambos grupos alcanzaron, e incluso superaron, la ingesta adecuada. La vitamina A es esencial para el desarrollo fetal, ya que regula procesos como la diferenciación celular y el desarrollo de órganos. Sin embargo, un exceso de esta vitamina podría tener efectos teratogénicos, interfiriendo con los procesos morfológicos (268), lo que podría conducir a una disminución del perímetro cefálico.

Otros micronutrientes se encuentran por debajo de las INR establecidos en España para la población gestante en ambos grupos de estudio; sin embargo, su consumo es similar entre ambos. Estos micronutrientes son el hierro, yodo, flúor, vitamina B6 y vitamina D. El hierro, esencial para la producción de mioglobina y hemoglobina, así como para apoyar procesos celulares como el crecimiento, la respiración y el transporte de oxígeno, presenta requerimientos elevados de hasta 27 mg/día debido a la expansión de la masa eritrocitaria materna, el desarrollo fetal y la preparación para la posible pérdida de sangre durante el parto (269). De forma similar, el yodo, crucial para la regulación del metabolismo, el crecimiento y el desarrollo del sistema nervioso a través de las hormonas tiroideas, parece tener demandas aumentadas durante el embarazo debido a los cambios metabólicos y hormonales, aunque sus efectos sobre las medidas antropométricas fetales aún no han sido suficientemente investigados y los resultados al respecto son poco concluyentes. La vitamina D, cuya síntesis se produce principalmente a través de la exposición solar, depende completamente de las reservas maternas y es fundamental para el desarrollo fetal. Su deficiencia se ha asociado con complicaciones como la preeclampsia y el nacimiento de recién nacidos pequeños para la edad gestacional, y algunos estudios han sugerido asociaciones modestas con el peso al nacer y la masa ósea (270, 271). Es destacable que, en la presente Tesis Doctoral, las ingestas dietéticas de vitamina D se encuentran por debajo de los niveles recomendados, lo que refuerza la importancia de la suplementación. No obstante, debe señalarse que muchos de estos micronutrientes son comúnmente suplementados durante el embarazo, aunque esta recomendación depende del criterio del equipo médico que acompaña a la

gestante. Al igual que las guías dietéticas, estas indicaciones no suelen diferenciarse en función de la edad materna, y las dosis se recomiendan por igual para todas las edades. Por tanto, la corrección de las guías dietéticas, junto con estrategias de suplementación más eficaces, podría constituir una política recomendable para favorecer un desarrollo fetal adecuado y prevenir complicaciones durante el embarazo.

Finalmente, se evaluó el contenido de polifenoles en la dieta en ambos grupos de estudio. Según los distintos subgrupos de polifenoles, se observó una considerable variabilidad entre los grupos de estudio. Así, la ingesta dietética de antocianinas, flavonas, flavonoles y hidroxifenilpropanos fue significativamente mayor en el grupo de mujeres con edad materna avanzada en comparación con el grupo control. Los principales efectos beneficiosos atribuidos a su consumo se relacionan con su actividad antioxidante; no obstante, también se han asociado con una reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (272). A pesar de ello, una ingesta elevada de estos compuestos se ha vinculado a distintos problemas durante el parto, como el bajo peso al nacer (273-277), debido a la posible asociación entre el consumo de polifenoles y la constricción del conducto arterioso fetal (275). Más allá del consumo en sí, resulta relevante destacar que las flavonas y los flavonoles forman parte del grupo de los flavonoides, los cuales han sido descritos como inhibidores de la absorción de ciertos micronutrientes como el hierro y el ácido fólico (278), minerales cuya ingesta en esta población de madres de EMA se encuentra notablemente por debajo de las recomendaciones dietéticas. Los estudios en mujeres embarazadas son escasos y muestran resultados controvertidos respecto a los beneficios o posibles efectos adversos de estos compuestos (279). Además, el papel específico de los polifenoles durante el embarazo en mujeres con edad materna avanzada aún no ha sido investigado, por lo que se requieren más estudios en este ámbito.

7.2. Adipoquinas placentarias

La placenta, en su función de órgano endocrino fundamental durante la gestación, regula de manera significativa los cambios hormonales que se producen en la mujer embarazada. Alteraciones en su funcionamiento pueden comprometer el curso normal del embarazo, dando lugar a complicaciones gestacionales y repercusiones adversas tanto para la salud materna como fetal. En la presente Tesis Doctoral, se encontró que la EMA induce una alteración metabólica en las adipoquinas secretadas por la placenta, especialmente cuando la madre da a luz a un neonato varón, destacando que esta disparidad basada en el sexo en embarazos de edad avanzada sería capaz de inducir alteraciones que pueden afectar al desarrollo del feto y, por tanto, condicionar la salud postnatal. Un punto importante a destacar de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es que las muestras de tejido placentario se recogieron en condiciones idénticas de los grupos de estudio, sin diferencias estadísticas entre parto por cesárea y vaginal, características

sociodemográficas y tampoco en las medidas antropométricas de las madres, lo que minimizó estas fuentes de sesgo en la señalización de adipoquinas placentarias.

La placenta es un órgano transitorio situado en la confluencia de la circulación sanguínea materna y fetal, que desempeña una serie de funciones esenciales para el embarazo. El suministro de nutrientes y oxígeno al feto es primordial, junto con la producción de diversas hormonas y factores de crecimiento que pueden influir en la madre, en el feto o en ambos tras su liberación (59). Además, las funciones placentarias podrían regularse a través de mecanismos paracrinós o autocrinos y, en este sentido, las adipoquinas liberadas están implicadas en el control del crecimiento y el desarrollo fetal y placentario.

La EMA influye en la señalización de la insulina debido a alteraciones en la función del trofoblasto, como la disfunción mitocondrial y los elevados niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), que alteran la función placentaria e inducen resistencia a la insulina (280, 281). En la presente Tesis Doctoral, se encontraron importantes diferencias en los niveles de insulina, que aumenta su producción en la placenta de las madres de EMA, y especialmente en las que dieron a luz a un varón. En este sentido, estudios previos llevados a cabo por mi grupo de investigación, han puesto de manifiesto que el sexo del recién nacido afecta al grado de agresión oxidativa sufrida, indicando que las defensas antioxidantes de los neonatos varones son menores que en las niñas durante el parto, lo que conlleva una desventaja para hacer frente al daño oxidativo inducido, mostrando que los niños presentan una menor capacidad antioxidante total que las niñas y una mayor expresión de citoquinas inflamatorias (282), hecho que podría explicar el aumento compensatorio de la producción de insulina, que tiene importantes repercusiones para la madre, el desarrollo del feto y la vida del neonato. Este aumento en la producción de insulina también es responsable de los menores niveles de glucagón encontrados en la placenta de las madres que dieron a luz varones en el grupo EMA en comparación con las del grupo control. Los niveles de resistina fueron inferiores en el grupo de edad materna avanzada en comparación con el grupo de control. Esta adipoquina inhibe la señalización de la insulina y es un importante regulador de la intolerancia a la glucosa (283), lo que revela que si los grupos no se dividen por el sexo del neonato, la homeostasis de la glucosa se conserva en la edad materna avanzada. En la placenta de los fetos masculinos del grupo EMA, se encontraron correlaciones positivas entre y GIP con el peso al nacer y GIP con la circunferencia de la cabeza, lo que puede explicarse porque GIP promueve la neuritogénesis y la extensión de los axones, revelando que la señal de GIP es esencial durante el desarrollo temprano del cerebro (284).

Los niveles de visfatina fueron superiores en los embarazos de edad materna avanzada en comparación con el grupo de control. Estudios anteriores han encontrado (285) que los niveles de visfatina aumentan en el líquido amniótico con el progreso de la gestación y que existe una

relación positiva con la edad gestacional, lo que revela un vínculo entre el estiramiento de las membranas fetales y la expresión y liberación aumentada de visfatina. De acuerdo con esto, podría hipotetizarse que, el aumento de los niveles de visfatina en embarazos de edad materna avanzada, indicaría un estiramiento excesivo del útero y de las membranas fetales, comprometiendo su capacidad para resistir la presión intraamniótica en comparación con embarazos de menor edad. Además, también se ha sugerido que la visfatina durante el embarazo disminuye la contractilidad del miometrio (68), lo que indica que niveles elevados de visfatina en madres embarazadas dificultan la contractilidad uterina, hecho que podría afectar al parto en gestantes de edad materna avanzada. En la placenta de fetos femeninos pertenecientes al grupo EMA, se observó una correlación negativa entre los niveles de visfatina y el perímetro cefálico. En este contexto, estudios previos han sugerido que la visfatina podría funcionar como un marcador predictivo del crecimiento fetal. El IMC materno parece desempeñar un papel modulador en la relación entre los niveles de visfatina y las medidas antropométricas neonatales. En gestantes con un IMC dentro de rangos normales, los niveles de visfatina se correlacionaron positivamente con la talla del recién nacido; sin embargo, en aquellas con un IMC elevado, dicha correlación fue negativa (286). Estos hallazgos sugieren que las condiciones metabólicas intrauterinas asociadas a la edad materna avanzada podrían asemejarse a los resultados observados en un entorno obesogénico, lo que podría repercutir negativamente en el desarrollo cerebral y, específicamente, en el perímetro cefálico del neonato.

Los niveles de leptina fueron menores en el grupo EMA en comparación con el grupo control, y también se observaron niveles más bajos en los embarazos de fetos masculinos dentro del grupo EMA en comparación con los del grupo control. Estudios previos han reportado que, en contextos de edad materna avanzada, puede producirse tanto un aumento significativo en las concentraciones maternas de leptina como una disminución en su expresión placentaria (287), como se observa en la presente Tesis Doctoral. No obstante, nuevamente, las diferencias más marcadas parecen estar asociadas a la gestación de un feto masculino. La mayoría de las investigaciones previas sobre leptina y descendencia se han centrado en los niveles circulantes maternos de leptina, en lugar de en la leptina placentaria, a pesar de que la mayor parte de esta última es secretada hacia el torrente sanguíneo materno (288). No obstante, ambos compartimentos fisiológicos son distintos, y podría no existir una relación directa entre ellos. Un estudio previo (289) también demostró la existencia de dimorfismo sexual en la placenta, aunque centrado en las diferencias asociadas al peso materno y sin considerar la edad materna. En dicho caso, las diferencias fueron atribuidas al índice de masa corporal materno. Sin embargo, en un estudio más reciente, se observaron diferencias en la expresión de citocinas inflamatorias entre placentas masculinas y femeninas, lo que aporta evidencia adicional del dimorfismo sexual en la placenta humana (290). De manera consistente con lo señalado anteriormente (282), los varones

al nacer presentan una mayor expresión de citocinas inflamatorias, lo que podría explicar las diferencias observadas en el presente estudio, incluso en ausencia de diferencias antropométricas. Otro hallazgo relevante es la correlación negativa observada entre los niveles de leptina y el perímetro cefálico en placentas de fetos masculinos del grupo control. El perímetro cefálico se correlaciona con el volumen cerebral y, en consecuencia, la leptina podría desempeñar funciones adicionales importantes durante el desarrollo fetal, más allá de su papel en la regulación de la saciedad a través de la vía hipotalámica en etapas posteriores de la vida (291). Se ha planteado que la leptina también contribuye al crecimiento y la maduración neuronal, lo cual sugiere que podría influir en el desarrollo y crecimiento cerebral fetal humano, además de ser un indicador de adiposidad e índice de masa corporal (292). Estudios previos han reportado correlaciones positivas (293, 294), negativas (295) e incluso la ausencia de correlaciones (296) entre los niveles maternos de leptina y las medidas antropométricas neonatales. Estas observaciones contradictorias podrían deberse a que los niveles de leptina han sido determinados en suero materno o en sangre del cordón umbilical, mientras que la mayor parte de la leptina se produce en la placenta (297), como se midió en la presente Tesis Doctoral. Además, múltiples factores asociados al embarazo pueden influir en los niveles de leptina (298).

Por otro lado, en las placentas de fetos masculinos del grupo control se observó una correlación positiva entre irisina y la longitud neonatal, en concordancia con estudios previos que han evidenciado niveles reducidos de irisina en situaciones de restricción del crecimiento intrauterino, lo que respalda su papel esencial en el desarrollo fetal (299).

Los niveles de PAI-1 fueron inferiores en el grupo EMA en comparación con las mujeres embarazadas más jóvenes. Este hallazgo resulta relevante, ya que el PAI-1 inhibe al activador tisular del plasminógeno y a la uroquinasa, bloqueando así la activación del plasminógeno y la fibrinólisis. Un embarazo exitoso depende de un equilibrio delicado entre la coagulación materna y la fibrinólisis. El embarazo, por sí mismo, representa un estado de hipercoagulabilidad inducido por alteraciones hormonales, con el fin de prevenir hemorragias maternas excesivas durante el parto (300). Además, el PAI-1 inhibe la función de las metaloproteinasas de la matriz extracelular, y se ha demostrado que su disminución o deficiencia congénita conlleva una mayor tendencia al sangrado debido a una fibrinólisis no regulada (301). Por tanto, los niveles reducidos de PAI-1 placentario podrían originar un desequilibrio en los procesos de hemostasia y coagulación, los cuales son fundamentales durante el periodo periparto. De forma interesante, se ha descrito que los niveles de PAI-1 en pacientes con diabetes gestacional son significativamente más bajos que en embarazos normales (302). En este sentido, aunque en la presente Tesis Doctoral no se tuvieron en cuenta casos de diabetes al ser un criterio de exclusión, sí se observó un aumento significativo

de los niveles de insulina, lo que demuestra la relación existente entre la homeostasis de la glucosa y el PAI-1 en embarazos de edad materna avanzada.

7.3. Expresión génica de transportadores de nutrientes placentarios

La expresión génica de los transportadores de nutrientes en la placenta juega un papel fundamental para asegurar que el feto en formación reciba un suministro adecuado de nutrientes esenciales para un crecimiento y desarrollo saludables. La placenta es un órgano transitorio que se forma y conecta al feto en desarrollo con el útero y se expulsa como desecho biológico tras el alumbramiento (303). El transporte de nutrientes a través de la placenta es mediado por una variedad de proteínas transportadoras, cada una con especificidad por diferentes clases de nutrientes, incluidos aminoácidos, glucosa, ácidos grasos y micronutrientes. El sincitiotrofoblasto, la principal célula epitelial de transporte y endocrina de la placenta humana, desempeña un papel fundamental en la determinación del metabolismo fetal, mediado por una multitud de funciones, incluido el transporte de nutrientes (304).

El análisis del tejido placentario reveló patrones diferenciales de expresión de genes clave de transportadores de nutrientes en relación con la edad materna avanzada y el sexo fetal. Mientras que la expresión de DMT1, CD36, FABP3, FABP4, LAT1 y SLC27A1 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de EMA y el grupo control, si se observó una diferencia significativa en la expresión del gen SNAT1, que fue mayor en el grupo control respecto al grupo EMA. SNAT1 es una isoforma del transportador neutral de aminoácidos Na-dependiente, con un papel clave en el transporte de aminoácidos, responsable de la acumulación activa de aminoácidos en la placenta a partir de la sangre materna. Estos aminoácidos son cruciales para la síntesis de proteínas, el crecimiento y el desarrollo general del feto (305). Su reducción en mujeres de EMA podría reflejar una menor eficiencia en el suministro de aminoácidos esenciales al feto, lo cual ha sido relacionado con alteraciones en el crecimiento fetal y en la programación metabólica (306, 307). Varios estudios apoyan la idea de que la edad materna avanzada puede afectar a la función placentaria y al transporte de nutrientes (308). Este patrón puede reflejar una reducida capacidad adaptativa del sincitiotrofoblasto de gestantes mayores, dada su importancia en la captación de nutrientes. Incluso, las investigaciones apuntan a la regulación a la baja de la señalización placentaria mTOR o insulina/IGF-I en los embarazos de EMA, modulando el envejecimiento y reducen el transporte de aminoácidos (303).

Por otro lado, se estudió la expresión génica de estos transportadores diferenciándolos por grupo y por el sexo del feto. Siguiendo con el único transportador que se encontraron diferencias comparando por grupos, en el caso del SNAT1, se encontraron diferencias significativas entre las placentas que albergaron fetos del sexo femenino del grupo control y ambos sexos del grupo EMA, siendo mayor la expresión en las del grupo control en ambos casos.

Primero, se ha evidenciado que la placenta presenta adaptaciones específicas según el sexo en respuesta al entorno materno (309). Estas adaptaciones pueden influir en el transporte de nutrientes y generar diferencias potenciales de crecimiento para los fetos masculinos y femeninos. Diversas teorías evolutivas, basadas en estudios con modelos animales, sugieren que los fetos masculinos son más vulnerables a condiciones maternas adversas. En este contexto, se ha propuesto que las placentas que gestan fetos femeninos son más capaces de adaptarse para mantener un adecuado suministro de nutrientes, lo que podría explicar las diferencias observadas en la expresión génica del transportador y su potencial impacto en el crecimiento (310). Sin embargo, la pérdida de esta ventaja adaptativa en las placentas de mujeres del grupo EMA con fetos femeninos sugiere que dicho beneficio podría estar condicionado por la edad materna. Esto refuerza la hipótesis de que la edad avanzada puede afectar negativamente la capacidad placentaria para transportar aminoácidos, incluso en aquellos casos donde, teóricamente, el sexo fetal podría conferir una ventaja.

CD36 y DMT1, mostraron una expresión significativamente mayor en placentas de niñas del grupo control en comparación con niñas del grupo EMA, y también frente a niños del mismo grupo control. Esto sugiere una doble influencia, tanto del dimorfismo sexual fetal, como de la edad materna. Por un lado, la edad materna avanzada podría condicionar la expresión de estos genes en fetos femeninos. Por otro lado, el sexo femenino en embarazos control podría asociarse a una mayor eficiencia de transporte de lípidos (CD36) y metales divalentes (DMT1). De nuevo, ambos resultados, concuerda con las teorías expuestas previamente (309, 310). Es conocido que el CD36 desempeña un papel crucial en la captación placentaria de ácidos grasos, los cuales son vitales para el crecimiento y desarrollo del feto al actuar como constituyentes fundamentales de las bicapas lipídicas que constituyen las membranas celulares, como almacenamiento de energía y moléculas de señalización, por lo tanto una mayor expresión de este gen en placentas femeninas del grupo control podría indicar una mayor capacidad adaptativa en estos embarazos para optimizar la transferencia lipídica, lo cual es especialmente relevante dado que el cerebro fetal femenino puede presentar tasas de maduración precoz más elevadas, y por ende una mayor demanda de lípidos estructurales. El DMT1 por su parte, es el principal responsable de la captación de hierro a la placenta (90). El hierro es esencial para numerosos procesos biológicos incluyendo el transporte de oxígenos, la síntesis de ADN y diversas funciones enzimáticas. Una mayor expresión de este gen en embarazos femeninos podría sugerir una mayor demanda o una utilización más eficiente del hierro por parte de los fetos femeninos. Esto es relevante en ciertas patologías, como por ejemplo la anemia ferropénica materna, ya que las investigaciones indican que la expresión de DMT1 aumenta en respuesta a esta (311). Esto a su vez, pone de relieve la capacidad de la placenta para adaptarse a las condiciones cambiantes de la madre y priorizar el transporte de hierro al feto, incluso cuando las reservas de hierro maternas están comprometidas.

Además, el metabolismo del hierro y la ferroptosis (una forma de muerte celular relacionada con el hierro) pueden desempeñar papeles diferentes en los embarazos masculinos y femeninos (312).

Asimismo, se detectó una expresión significativamente más alta de FABP4 en placentas de niñas del grupo control frente a niños del mismo grupo y frente a ambos sexos en el grupo EMA. Dado que este transportador participa en la captación y movilización intracelular de ácidos grasos, su perfil de expresión podría estar asociado a un entorno más favorable para el desarrollo fetal femenino en madres jóvenes, en comparación con el ambiente intrauterino metabólicamente más desfavorecido y estresante del grupo EMA (309).

Por otra parte, el LAT1 es un transportador de aminoácidos neutros de cadena larga, también mostró mayor expresión en placentas control de niñas en comparación con niños del mismo grupo control, lo que podría conducir a un mayor aporte de nutrientes específicos esenciales para el desarrollo cerebral y del sistema nervioso, especialmente en el sexo femenino ya que como se describió anteriormente, su sobreexpresión activa además la señalización de la vía mTOR, favoreciendo la transferencia de nutrientes al feto (95). En este sentido, y dado que los cerebros masculino y femenino se desarrollan en periodos y de forma diferente, con vulnerabilidades y necesidades distintas, es plausible que la placenta ajuste el transporte de nutrientes para satisfacer estas necesidades específicas de cada sexo (313).

Finalmente, SLC27A1, implicado en la captación de ácidos grasos de cadena larga, presentó una expresión significativamente elevada en placentas de niñas del grupo control frente al resto de los grupos en consonancia con los hallazgos encontrados para el FABP4, transportador de ácidos grasos (309). Este hallazgo refuerza la idea de una regulación diferencial según el sexo fetal, especialmente en condiciones de menor estrés placentario como en embarazos de mujeres jóvenes.

Además, hay evidencia de que los fetos femeninos priorizan la eficiencia placentaria sobre el crecimiento fetal máximo, a diferencia de los fetos masculinos que tienden a mantener un ritmo de crecimiento más acelerado incluso en condiciones adversas. Esta estrategia de programación placentaria metabólicamente beneficiosa para el sexo femenino podría estar reflejada en una expresión más eficiente de transportadores clave como CD36 y DMT1 en un ambiente materno óptimo, lo que contribuiría a asegurar un desarrollo fetal saludable y estable (314).

En conjunto, los resultados de este estudio, junto con la evidencia científica existente, podrían apuntar a que el sexo fetal constituye un determinante clave en la expresión génica de transportadores placentarios, especialmente en contextos gestacionales y maternos óptimos.

Respalda así la hipótesis de que el sexo fetal femenino podría conferir una ventaja adaptativa en términos de función placentaria, al menos en contextos sin alteraciones maternas como la edad materna avanzada. La mayor expresión de ellos en placentas que han albergado fetos del sexo femenino en comparación con los demás grupos de estudio, puede reflejar una estrategia biológica diferencial, en la que la gestación de un feto femenino, crea una ventaja evolutiva que conduce a la eficiencia funcional de la placenta sobre un crecimiento fetal acelerado. Esta estrategia de programación placentaria, podría conferir una ventaja metabólica al optimizar la captación de nutrientes esenciales y asegurar un desarrollo estable, incluso frente a variaciones moderadas en el entorno materno (314). Sin embargo, esta ventaja parece atenuarse en condiciones menos favorables, como en el caso de la EMA, donde se observa una disminución de la expresión de estos transportadores en fetos femeninos. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la interacción entre el sexo fetal y el ambiente intrauterino influye profundamente en la regulación placentaria y, por ende, en el desarrollo fetal.

7.4. Expresión proteica de transportadores placentarios

Tras analizar los perfiles de expresión génica de diversos transportadores de nutrientes en la placenta y observar diferencias asociadas a la edad materna, resulta fundamental complementar estos hallazgos mediante el estudio de la expresión proteica. Si bien el análisis del ARN mensajero aporta información valiosa sobre la regulación transcripcional, los niveles de ARN no siempre se correlacionan directamente con la cantidad ni la funcionalidad de las proteínas codificadas, debido a la influencia de mecanismos post-transcripcionales, tasas de degradación y modificaciones postraduccionales.

Los resultados obtenidos del estudio de la expresión proteica de transportadores de nutrientes placentarios mostraron que tanto el DMT1 como el SNAT1 fueron significativamente mayores en el grupo EMA que en el grupo control, hallazgos completamente opuestos a los encontrados en la expresión génica de los mismos, ya que SNAT1 fue mayor en el grupo control que en EMA y el DMT1, a pesar de no mostrar diferencias significativas, su tendencia fue también a ser mayor en el grupo control.

Estos resultados, aunque a simple vista puedan parecer controversiales, podrían tener varias explicaciones. La primera la puede encontrarse en la regulación post-transcripcional. La cantidad de ARNm no siempre se traduce directamente en proteína debido a mecanismos que regulan la estabilidad, transporte y disponibilidad del ARNm. Factores como microRNAs (miRNAs) que son pequeñas moléculas de ARN no codificante que pueden unirse al ARNm e inhibir su traducción en proteína (315) o las proteínas de unión a ARNm. Ambos pueden inhibir la traducción del mensaje en el grupo control, pese a su alta abundancia, lo que explicaría una menor producción proteica relativa en ese grupo. Otra posible explicación la podemos encontrar

en la eficiencia traduccional, es decir, la tasa de síntesis proteica por molécula de ARNm. Esta eficiencia puede estar modificada por la epigenética o el reclutamiento de ribosomas o ciertos elementos del ARNm como la secuencias 5' UTR (316). La maquinaria traduccional es muy activa y adaptativa a ambientes de estrés o cambio metabólico en placenta. El siguiente mecanismo que puede explicar estas divergencias en los resultados sería que las proteínas que expresan estos transportadores tengan una vida media más larga en el grupo EMA favoreciendo así su acumulación incluso si son sintetizados a partir de menos ARNm. Este fenómeno podría estar relacionado con alteraciones en la maquinaria de degradación proteica o cambios en el ambiente redox placentario. El estrés oxidativo puede dañar las proteínas, haciéndolas más susceptibles a la degradación, pero también puede perjudicar la función del proteosoma, lo que conduce a la acumulación de proteínas (317). Por último, desde un punto de vista funcional, el aumento de la expresión proteica en el grupo EMA podría representar un mecanismo compensatorio ante un entorno intrauterino adverso, caracterizado por mayor estrés oxidativo, hipoxia o inflamación leve. En este contexto, la placenta podría modular la traducción de ciertos transportadores para garantizar el intercambio adecuado de nutrientes a pesar de los retos que plantea el entorno adverso (309).

Por todo lo anteriormente expuesto, sería normal que la expresión proteica de transportadores de nutrientes se vea aumentada en el grupo EMA frente al control, como marca la tendencia de los resultados observados. En cuanto a SNAT1, su mayor expresión proteica en el grupo EMA podría reflejar una respuesta compensatoria adaptativa a condiciones uterinas menos favorables, como hipoxia o estrés oxidativo leve, frecuentemente asociados con la edad materna avanzada. Este tipo de adaptación busca optimizar el transporte de nutrientes esenciales hacia el feto, asegurando un crecimiento adecuado incluso en condiciones subóptimas (318). Por otro lado, puede ser contraproducente en estados fisiológicos adversos, como en gestaciones con complicaciones como diabetes u obesidad materna, donde citokinas proinflamatorias como IL-6 o TNF- α , son capaces de regular al alza los transportadores de aminoácidos, aumentando así el transporte placentario de nutrientes, contribuyendo al crecimiento excesivo del feto (319). Para DMT1, responsable del transporte de hierro y otros metales divalentes, la mayor expresión proteica en el grupo EMA a puede deberse a una mayor estabilidad de la proteína o a un aumento en su traducción inducido por la demanda fetal de hierro. Esto es especialmente relevante considerando que en embarazos de mayor edad materna puede haber una mayor necesidad de regulación del transporte de hierro para evitar efectos adversos sobre la oxigenación y el desarrollo fetal (320). El DMT1 es vital para el crecimiento fetal, en particular para el desarrollo del cerebro y la hematopoyesis (321). Cualquier alteración de su función puede provocar serias afectaciones para el feto, como retraso del crecimiento intrauterino (322), que se asocia además con diversas patologías relacionadas con el síndrome metabólico a largo plazo (323).

7.5. Microbiota de heces de madres y neonatos

En la presente Tesis Doctoral, se estudia por primera vez, los cambios en las comunidades bacterianas presentes en las heces de mujeres gestantes de ambos grupos de estudio, control y EMA, durante el embarazo, tras el parto, así como la de los meconios de su descendencia. Se ha estudiado su abundancia relativa a nivel de filo, su beta diversidad, así como la abundancia diferencial por pares.

En primer lugar, se debe prestar atención al análisis de diversidad beta mediante el índice de Jaccard, que reveló una clara separación entre las comunidades microbianas de los meconios y las heces maternas, lo cual es consistente con el hecho de que el meconio representa una microbiota más inmadura y fuertemente influenciada por la exposición intrauterina y perinatal (324). Adicionalmente, se observó una ligera separación entre los grupos EMA y control en muestras maternas, lo que podría reflejar la influencia de factores fisiológicos o epigenéticos asociados a la edad materna avanzada (325).

Durante la gestación, los filos predominantes en ambos grupos fueron Firmicutes, Actinobacteriota y Bacteroidota, en concordancia con lo reportado en la literatura científica para microbiotas intestinales humanas sanas en el segundo trimestre de gestación (326). Esta composición refleja un ecosistema microbiano que favorece la homeostasis intestinal y participa activamente en funciones clave como la inmunomodulación y el metabolismo energético (327, 328), procesos de gran relevancia durante la gestación. En cuanto al análisis de abundancia diferencial de las heces en esta etapa del embarazo, se observó que las familias *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Atopobiaceae* se encontraban significativamente más enriquecidas en el grupo control en comparación con el grupo EMA. Estos hallazgos adquieren relevancia por el rol bien documentado de estas familias en la fermentación de oligosacáridos, producción de AGCC y mantenimiento de la integridad epitelial (329, 330). A nivel de género, se observaron mayores proporciones de *Bifidobacterium*, *Turicibacter*, *Butyricoccus*, *Enorma* y miembros de *Lachnospiraceae* en el grupo control, todos ellos asociados con perfiles metabólicos antiinflamatorios y eubióticos. El género *Bifidobacterium* se considera beneficioso para la salud y las capacidades inmunomoduladoras (331). Las bifidobacterias en general, son conocidas por su papel en la fermentación de oligosacáridos y, como se comentó anteriormente, la producción de AGCC, contribuyendo por tanto a la salud intestinal general (329). *Turicibacter* por su parte, presenta propiedades antiinflamatorias, aunque también se le ha relacionado con eventos adversos del sistema inmunitario (332). A los dos últimos géneros se le atribuyen funciones beneficiosas al ser productores de AGCC, en concreto el *Butyricoccus* produce butirato, AGCC que sirve como importante fuente de energía para los colonocitos y el cual tiene

propiedades antiinflamatorias. (333). En contraste, los géneros *Catenibacterium* y *Enterorhabdus* fueron más abundantes en el grupo EMA, siendo este último relacionado con procesos proinflamatorios en modelos experimentales (334) aunque, estos géneros están menos estudiados y sus funciones en la microbiota intestinal no se conocen del todo. La menor presencia de bifidobacterias y bacterias butirato-productoras en gestantes de EMA podría estar condicionada por factores como la dieta, el estado inflamatorio subyacente o una mayor exposición a antibióticos prenatales, todos ellos conocidos moduladores de la microbiota intestinal (335, 336). Esta menor presencia microbiana beneficiosa en el grupo EMA podría estar directamente relacionada con la menor ingesta de fibra dietética observada en estas gestantes, hallazgo reportado previamente en los análisis nutricionales realizados. La fibra, en especial la de tipo prebiótico, aquella definida como almidón resistente, es el principal sustrato fermentable para las bifidobacterias y otros géneros productores de butirato (337), y su consumo adecuado se asocia con un microbioma más diversificado y funcionalmente antiinflamatorio. La depleción de estos géneros en el grupo EMA sugiere un impacto negativo de la dieta baja en fibra sobre la estructura de la microbiota intestinal materna. En este sentido, estudios experimentales recientes han demostrado que ciertas cepas de *Bifidobacterium*, no solo modulan la composición de la microbiota intestinal materna, sino que también promueven la morfogénesis placentaria, mejoran la expresión de transportadores de nutrientes y favorecen el crecimiento fetal en modelos murinos, sugiriendo una acción indirecta de la microbiota sobre el desarrollo fetal a través de la placenta (91). Dichos resultados refuerzan la hipótesis de que una microbiota materna enriquecida en bifidobacterias puede tener efectos beneficiosos sistémicos más allá del tracto intestinal, particularmente relevantes en el contexto del embarazo y el desarrollo fetal.

Paradójicamente, los resultados presentes también mostraron que un mayor perímetro cefálico neonatal se correlacionó significativamente con un menor consumo de fibra en las madres del grupo EMA. Este hallazgo plantea una compleja relación entre la dieta materna, el entorno microbiano intestinal y el desarrollo fetal. Si bien una dieta pobre en fibra puede alterar la composición microbiana, como se observó en EMA, es posible que este mismo entorno favorezca una mayor disponibilidad de otros nutrientes, como la glucosa o ciertos aminoácidos, cuya absorción no compite con la fermentación de fibra y que podrían ser redirigidos al feto en forma de energía disponible para el desarrollo cerebral (338, 339). Además, otro posible mecanismo para explicar estos hallazgos es que, en ausencia de una microbiota rica en AGCC, el metabolismo placentario y fetal priorice otras rutas energéticas o aumente la actividad de transportadores específicos para compensar el déficit microbiano, como se ha observado en la mayor expresión proteica de SNAT1 y DMT1 en placentas EMA. Estos transportadores facilitan la entrada de nutrientes clave como aminoácidos neutros e hierro, que son fundamentales para el desarrollo neurofetal, incluyendo el crecimiento del perímetro cefálico.

Tras el parto, se observó un cambio en la composición microbioana, con una mayor abundancia relativa del filo *Verrucomicrobia* en el grupo EMA, en comparación con *Bacteroidota*, que se mantuvo elevado en el grupo control. Este hallazgo podría estar relacionado con cambios metabólicos o inmunológicos propios del envejecimiento materno, dado que *Verrucomicrobia*, y en particular algunos géneros pertenecientes a este filo como *Akkermansia*, se ha vinculado con el metabolismo de mucinas y con estados inflamatorios de bajo grado (340), aunque por otro lado, también presentan posibles respuestas antiinflamatorias, ya que promueve la integridad de la barrera intestinal. Por ello, sus propiedades y atribuciones causan controversia, necesitando una investigación más exhaustiva para poder comprender las asociaciones de este filo con la salud del hospedador. En cuanto a la abundancia diferencial de las heces tras el parto, el grupo control mantuvo una alta abundancia de *Bifidobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Atopobiaceae*, en línea con una microbiota funcionalmente activa en la fermentación de polisacáridos complejos y mantenimiento de la eubiosis por sus papeles en la fermentación de oligosacáridos y producción de AGCC como se comentaba anteriormente por parte de *Bifidobacteriaceae* (329) y de *Veillonellaceae* (341) y el uso de mucinas por parte de *Coriobacteriaceae* y *Atopobiaceae* (342). En el grupo EMA, la familia *Actinomycetaceae* presentó una mayor representación y esta familia se ha vinculado a estados inflamatorios y desequilibrio metabólico en adultos mayores (343). Se identificaron aumentos en géneros como *Rothia* y *Actinomyces*, algunos de los cuales se han asociado con condiciones inflamatorias y con el metabolismo de compuestos nitrogenados, por lo que puede interpretarse como un indicador de alteraciones inmunometabólicas en este grupo de gestantes. En concreto, Kataoka y col. (344), encontraron que el género *Rothia* podía inducir la producción de TNF- α , sugiriendo un potente papel proinflamatorio, además de haber sido identificado como un marcador de inflamación en diversas patologías sistémicas, incluidas enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y deterioro cognitivo en personas mayores (345). Por su parte, el género *Actinomyces* es conocido por su capacidad para formar biopelículas y persistir en estados de inflamación subclínica (346). Aunque forma parte de la microbiota intestinal normal, su aumento ha sido vinculado con procesos inflamatorios localizados y sistémicos, incluyendo infecciones crónicas, alteraciones en la permeabilidad intestinal, y desequilibrios en la tolerancia inmunitaria (343, 345). En el contexto del embarazo, este tipo de alteraciones podría contribuir a un ambiente intrauterino menos óptimo, con efectos potenciales sobre la programación fetal. Además, la mayor representación de estos géneros en mujeres gestantes con EMA podría estar relacionada con procesos de inmunosenescencia o con una menor eficiencia en la regulación del sistema inmunitario innato y adaptativo, ambos aspectos vinculados al envejecimiento reproductivo (340). Este patrón microbiológico, junto con la menor abundancia de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* o *Butyricoccus* en el grupo EMA, podría reflejar una firma microbiana proinflamatoria, que merece ser tomada en cuenta como posible modulador del entorno placentario y fetal.

En los meconios neonatales, se identificaron Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes como los filos más abundantes en ambos grupos, lo cual concuerda con los patrones de colonización inicial reportados en neonatos a término (347). Los patrones microbianos en el meconio podrían confirmar la transferencia vertical de microorganismos desde la madre, así como la influencia de factores perinatales. En neonatos del grupo control se observó mayor riqueza de las familias *Bifidobacteriaceae*, *Veillonellaceae* y *Atopobiaceae*, y a nivel de género se identificaron mayores niveles de *Bifidobacterium*, *Dialister* y *Colidextribacter*, todos asociados con maduración inmunológica y protección frente a patógenos. En neonatos, el género *Bifidobacterium* se asocia con una mayor respuesta de citoquinas en la infancia. Se sabe que las cepas de *Bifidobacterium* interactúan con las células inmunitarias y modulan las vías inmunitarias (348). Pueden contribuir al desarrollo de una respuesta inmunitaria equilibrada, que es crucial para prevenir alergias y enfermedades autoinmunes. En contraposición, los neonatos del grupo EMA presentaron una mayor abundancia de *Clostridium sensu stricto 1*, *Catenibacterium*, *Enterorhabdus* y *Eubacterium brachy*, géneros que, si bien forman parte de la microbiota intestinal normal, en exceso o en condiciones de disbiosis pueden estar implicados en inflamación intestinal o alteraciones metabólicas (349). Estas diferencias tempranas en la composición microbiana podrían tener repercusiones en la maduración inmunológica, la respuesta a vacunas, el metabolismo y la futura susceptibilidad a enfermedades crónicas (350, 351)

8. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos se han alcanzado las siguientes conclusiones:

Primera conclusion

Las gestantes españolas presentan déficits de nutrientes respecto a las ingestas de nutrientes de referencia para mujeres embarazadas según la AESAN. Especialmente, aquellas de edad materna avanzada, presentan una ingesta insuficiente de varios micronutrientes esenciales y claves para el desarrollo fetal, cuando estos se obtienen únicamente a través de la dieta, a pesar de que mantienen un patrón alimentario similar al del grupo control.

Segunda conclusión

El grupo de edad materna avanzada presenta un menor consumo de fibra, que se correlaciona negativamente con el perímetro cefálico neonatal y tiene grandes implicaciones para el desarrollo neurológico, crecimiento y desarrollo del recién nacido, indicando que es necesario revisar las actuales guías nutricionales para la población gestante e incluir sesgos potenciales como la edad materna.

Tercera conclusión

Existen alteraciones en la señalización metabólica de adipocinas placentarias en gestantes de edad materna avanzada, mostrando un claro dimorfismo sexual fetal. Estas alteraciones, más marcadas en embarazos de fetos masculinos, afectan a los niveles de insulina, leptina, resistina y visfatina, sugiriendo una programación placentaria vinculada a la edad materna y al sexo fetal. Dichos cambios podrían representar mecanismos metabólicos adaptativos, con impacto sobre el crecimiento fetal, perímetro cefálico y la longitud, parámetros clave para el desarrollo neonatal.

Cuarta conclusión

El sexo fetal constituye un determinante relevante en la regulación de la expresión génica de transportadores de nutrientes placentarios, especialmente en madres menores de 34 años. La mayor expresión génica de estos transportadores, observada en placentas de fetos femeninos en el grupo control podría reflejar una estrategia adaptativa que promueve una mejor eficiencia en el transporte de nutrientes a través de la placenta, con un impacto positivo en el desarrollo fetal. Esta ventaja metabólica se atenúa en condiciones de edad materna avanzada, donde se observa una disminución en la expresión génica de dichos transportadores incluso en fetos femeninos. En

contraste, la expresión proteica de DMT1 y SNAT1 sigue un patrón opuesto, que se explica por los mecanismos de regulación post transcripcional que pretende estabilizar proteínas clave, en respuesta a un entorno intrauterino menos favorable donde hay mayor riesgo de hipoxia, estrés oxidativo o inflamación.

Quinta conclusión

Aunque los filos bacterianos predominantes en la microbiota materna son compartidos entre ambos grupos de estudio (Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota), existen variaciones relevantes tanto en la abundancia relativa como en la composición taxonómica específica a nivel de familia y género. La edad materna avanzada se asocia con un perfil de microbiota intestinal de tipo proinflamatorio en comparación con gestantes más jóvenes, patrón que también se refleja en la microbiota de la descendencia. Además, en gestantes de edad materna avanzada, hay una menor presencia de familias y géneros productores de ácidos grasos de cadena corta, lo que favorecería un ambiente metabólico placentario y fetal orientado a aumentar la actividad de transportadores específicos como DMT1 y SNAT1, para compensar el déficit de metabolitos microbianos y favorecer una mayor disponibilidad de nutrientes esenciales para el feto. Por tanto, la edad materna es un factor clave para la conformación de la microbiota materna a lo largo del embarazo y, junto con el ambiente intrauterino durante la gestación, influyen de manera decisiva en la configuración inicial del microbioma intestinal neonatal, con posibles repercusiones para la salud tanto a corto como a largo plazo.

Conclusión general

Los resultados de la presente memoria de Tesis Doctoral resaltan la necesidad de considerar la edad materna en el diseño de guías nutricionales y políticas sanitarias, promoviendo estrategias específicas tales como recomendaciones dietéticas personalizadas y protocolos de suplementación ajustados a las demandas fisiológicas de las mujeres de edad materna avanzada. Esta consideración resulta esencial debido a las repercusiones que la nutrición puede tener tanto de forma directa, a través del transporte placentario de nutrientes, como indirectamente, mediante la modulación de la microbiota intestinal materna y la producción de metabolitos que influyen en el desarrollo fetal. Además, se refuerza la necesidad de una vigilancia endocrino-metabólica más estrecha en embarazos de mujeres de edad materna avanzada, especialmente en gestaciones de fetos masculinos. En este sentido, el sexo fetal femenino mejora la expresión génica de transportadores de nutrientes placentarios, reflejando una ventaja metabólica adaptativa que se atenúa en condiciones de edad materna avanzada, evidenciando que la interacción entre la edad materna, el sexo fetal y el entorno intrauterino modula la programación placentaria y, en consecuencia, el desarrollo fetal.

CONCLUSIONS

After analysing the results obtained, the following conclusions have been reached:

First conclusión

Spanish pregnant women present nutrient deficits with respect to the reference nutrient intakes for pregnant women according to the AESAN. Especially, those of advanced maternal age have an insufficient intake of several essential micronutrients and key for foetal development, when these are obtained only through the diet, although they maintain a similar dietary pattern to the control group.

Second conclusion

The older maternal age group has a lower fibre intake, which correlates negatively with neonatal head circumference and has major implications for neurological development, growth and development of the newborn, indicating that current nutritional guidelines for the pregnant population need to be revised to include potential biases such as maternal age.

Third conclusion

There are alterations in placental adipokine metabolic signalling in pregnant women of advanced maternal age, showing a clear foetal sexual dimorphism. These alterations, more marked in pregnancies with male foetuses, affect insulin, leptin, resistin and visfatin levels, suggesting placental programming linked to maternal age and foetal sex. These changes could represent adaptive metabolic mechanisms, with an impact on foetal growth, head circumference and length, key parameters for neonatal development.

Fourth conclusion

Fetal sex is a relevant determinant in the regulation of placental nutrient transporter gene expression, especially in mothers younger than 34 years. The higher gene expression of these transporters observed in placentas of female foetuses in the control group could reflect an adaptive strategy that promotes a better efficiency in the transport of nutrients across the placenta, with a positive impact on foetal development. This metabolic advantage is attenuated under conditions of advanced maternal age, where decreased gene expression of these transporters is observed even in female foetuses. In contrast, protein expression of DMT1 and SNAT1 follows an opposite

pattern, which is explained by post-transcriptional regulatory mechanisms that aim to stabilise key proteins in response to a less favourable intrauterine environment where there is an increased risk of hypoxia, oxidative stress or inflammation.

Fifth conclusion

Although the predominant bacterial phyla in the maternal microbiota are shared between both study groups (Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota), there are relevant variations in both relative abundance and specific taxonomic composition at the family and genus level. Advanced maternal age is associated with a proinflammatory gut microbiota profile compared to younger pregnant women, a pattern that is also reflected in the microbiota of the offspring. In addition, in older pregnant women, there is a lower presence of short-chain fatty acid-producing families and genera, which would favour a placental and foetal metabolic environment aimed at increasing the activity of specific transporters such as DMT1 and SNAT1, to compensate for the deficit of microbial metabolites and favour a greater availability of essential nutrients for the fetus. Thus, maternal age and the intrauterine environment during gestation have a decisive influence on the initial configuration of the maternal and neonatal gut microbiome, with potential implications for both short- and long-term health.

General conclusion

The results of this dissertation highlight the need to consider maternal age in the design of nutritional guidelines and health policies, promoting specific strategies such as personalised dietary recommendations and supplementation protocols adjusted to the physiological demands of women of advanced maternal age. This consideration is essential due to the repercussions that nutrition can have both directly, through placental transport of nutrients, and indirectly, through the modulation of the maternal intestinal microbiota and the production of metabolites that influence foetal development. In addition, the need for closer endocrine-metabolic surveillance is reinforced in pregnancies of women of advanced maternal age, especially in gestations of male fetuses. In this regard, female foetal sex enhances placental nutrient transporter gene expression, reflecting an adaptive metabolic advantage that is attenuated under conditions of advanced maternal age, demonstrating that the interaction between maternal age, foetal sex and the intrauterine environment modulates placental programming and, consequently, foetal development.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Sizer FS, Webb FS, Whitney EN, Whitney E. Nutrition: Concepts & Controversies: Wadsworth Cengage Learning; 2013.
2. Thompson J, Manore M, Vaughan L. La nutrición en el ciclo vital: embarazo primer año de vida. Nutrición Pearson Education SA San Francisco. 2008:716.
3. Bhattacharjee J, Rolfo A, Barbosa BF, Imakawa K, Ermini L. Editorial: Developmental biology and endocrine research for a successful pregnancy. Frontiers in Endocrinology. 2024;Volume 15 - 2024.
4. Chandra M, Paray AA. Natural Physiological Changes During Pregnancy. The Yale journal of biology and medicine. 2024;97(1):85-92.
5. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy: review articles. Cardiovascular journal of Africa. 2016;27(2):89-94.
6. Norwitz ER, Edusa V, Park JS. Maternal Physiology and Complications of Multiple Pregnancy. Seminars in Perinatology. 2005;29(5):338-48.
7. Grossi E, Parisi F, Duca P, Savasi VM. Maternal estradiol and progesterone concentrations among singleton spontaneous pregnancies during the first trimester. Journal of Endocrinological Investigation. 2019;42(6):633-8.
8. Kalkhoff RK, Kim HJ. The influence of hormonal changes of pregnancy on maternal metabolism. Ciba Foundation symposium. 1978(63):29-56.
9. Blackburn ST. Maternal, fetal, & neonatal physiology: A clinical perspective: Elsevier Health Sciences; 2007.
10. Noyola-Martínez N, Ali H, and Barrera D. Steroid hormones and pregnancy. Gynecological Endocrinology. 2019;35(5):376-84.
11. Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. Frontiers in immunology. 2014;5:196.
12. Wylie L. Essential Anatomy & Physiology in Maternity Care: Elsevier Health Sciences; 2005.
13. Kawaguchi JK, Pickering RK. The Pregnant Athlete, Part 1: Anatomy and Physiology of Pregnancy. Athletic Therapy Today. 2010;15(2).
14. LAIN KY, CATALANO PM. Metabolic Changes in Pregnancy. Clinical Obstetrics and Gynecology. 2007;50(4):938-48.
15. Wang Q, Würtz P, Auro K, Mäkinen V-P, Kangas AJ, Soininen P, et al. Metabolic profiling of pregnancy: cross-sectional and longitudinal evidence. BMC Medicine. 2016;14(1):205.

16. Svensson H, Wetterling L, Bosaeus M, Odén B, Odén A, Jennische E, et al. Body fat mass and the proportion of very large adipocytes in pregnant women are associated with gestational insulin resistance. *International Journal of Obesity*. 2016;40(4):646-53.
17. Vesco KK, Marshall NE, Baetscher E, Leo MC, Rooney W, Francisco M, et al. Changes in Visceral and Ectopic Adipose Tissue Stores Across Pregnancy and Their Relationship to Gestational Weight Gain. *The Journal of nutrition*. 2022;152(4):1130-7.
18. Andersson-Hall U, de Maré H, Askeli F, Börjesson M, Holmäng A. Physical activity during pregnancy and association with changes in fat mass and adipokines in women of normal-weight or with obesity. *Scientific Reports*. 2021;11(1):12549.
19. Rojas-Rodriguez R, Lifshitz LM, Bellve KD, Min SY, Pires J, Leung K, et al. Human adipose tissue expansion in pregnancy is impaired in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2015;58(9):2106-14.
20. Sanabria-Martínez G, Garcia-Hermoso A, Poyatos-Leon R, Gonzalez-Garcia A, Sanchez-Lopez M, Martinez-Vizcaino V. Effects of exercise-based interventions on neonatal outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Health Promotion*. 2016;30(4):214-23.
21. Taranikanti M. Physiological Changes in Cardiovascular System during Normal Pregnancy: A Review. *Indian Journal of Cardiovascular Disease in Women WINCARS*. 2018;03:062-7.
22. Hall ME, George EM, Granger JP. [The heart during pregnancy]. *Revista espanola de cardiologia*. 2011;64(11):1045-50.
23. Hibbard JU, Shroff SG, Cunningham FG. Chapter 14 - Cardiovascular Alterations in Normal and Preeclamptic Pregnancy. In: Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Lindheimer MD, editors. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 291-313.
24. Wilson JH, Facc F. 1 - Physiologic Adaptations to Pregnancy. In: Wilson JH, Schnettler WT, Lubert AM, Girnius A, editors. *Maternal Cardiac Care*. New Delhi: Elsevier; 2023. p. 1-11.
25. Artal R, O'Toole M. Guidelines of the American College of Obstetricians and Gynecologists for exercise during pregnancy and the postpartum period. *British journal of sports medicine*. 2003;37(1):6-12.
26. Tejada Pérez P, Cohen A, Font Arreaza IJ, Bermúdez C, Schuitemaker Requena JB. Modificaciones fisiológicas del embarazo e implicaciones farmacológicas: maternas, fetales y neonatales. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 2007;67(4):246-67.
27. Benli AR, Cetin Benli N, Usta AT, Atakul T, Koroglu M. Effect of maternal age on pregnancy outcome and cesarean delivery rate. *Journal of clinical medicine research*. 2015;7(2):97-102.

28. Figuerêdo ED, Lamy Filho F, Lamy ZC, da Silva AA. Maternal age and adverse perinatal outcomes in a birth cohort (BRISA) from a Northeastern Brazilian city. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*. 2014;36(12):562-8.
29. Ngowa JD, Ngassam AN, Dohbit JS, Nzedjom C, Kasia JM. Pregnancy outcome at advanced maternal age in a group of African women in two teaching Hospitals in Yaounde, Cameroon. *The Pan African medical journal*. 2013;14:134.
30. Klemetti R, Gissler M, Sainio S, Hemminki E. At what age does the risk for adverse maternal and infant outcomes increase? Nationwide register-based study on first births in Finland in 2005-2014. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2016;95(12):1368-75.
31. Tseng K-T, Peng C-C, Chang J-H, Hsu C-H, Lin C-Y, Jim W-T, et al. The impact of advanced maternal age on the outcomes of very low birth weight preterm infants. *Medicine*. 2019;98(5):e14336.
32. Laopaiboon M, Lumbiganon P, Intarut N, Mori R, Ganchimeg T, Vogel JP, et al. Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assessment. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2014;121 Suppl 1:49-56.
33. Simoni MK, Mu L, Collins SC. Women's career priority is associated with attitudes towards family planning and ethical acceptance of reproductive technologies. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2017;32(10):2069-75.
34. Rendtorff R, Hinkson L, Kiver V, Dröge LA, Henrich W. Pregnancies in Women Aged 45 Years and Older - a 10-Year Retrospective Analysis in Berlin. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2017;77(3):268-75.
35. Frick AP. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcomes. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2021;70:92-100.
36. (INE) INdE. Movimiento Natural de la Población / Indicadores Demográficos Básicos. In: INE, editor. 2023.
37. EUROSTAT.
Demography, population stock and balance. Fertility. 2022.
38. Huppertz B, Kingdom J. The Placenta and Fetal Membranes. 2018. p. 18-28.
39. Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Gil S, Tsatsaris V. La placenta humana. *EMC-Ginecología-Obstetricia*. 2015;51(3):1-19.
40. Benirschke K, Kaufmann PDP. *Pathology of the Human Placenta*: Springer New York; 2000.
41. Palomero G, Universidad de Oviedo Servicio de Publicaciones e. *Lecciones de embriología*. Oviedo: Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo; 1998.

42. Simón C. El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009.
43. Pidoux G, Gerbaud P, Cocquebert M, Second N, Badet J, Fournier T, et al. Review: Human trophoblast fusion and differentiation: lessons from trisomy 21 placenta. *Placenta*. 2012;33 Suppl:S81-6.
44. Jouanne M, Oddoux S, Noël A, Voisin-Chiret AS. Nutrient Requirements during Pregnancy and Lactation. *Nutrients*. 2021;13(2):692.
45. Newbern D, Freemark M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2011;18(6):409-16.
46. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes care*. 2007;30 Suppl 2:S112-9.
47. Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F, et al. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors*. 2011;37(6):413-20.
48. Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, et al. Resistin Is Expressed in the Human Placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(3):1394-7.
49. Dawid M, Kurowska P, Pawlicki P, Kotula-Balak M, Milewicz T, Dupont J, et al. Visfatin (NAMPT) expression in human placenta cells in normal and pathological conditions and its hormonal regulation in trophoblast JEG-3 cells. *PloS one*. 2024;19(9):e0310389.
50. Duval F, Dos Santos E, Maury B, Serazin V, Fathallah K, Vialard F, et al. Adiponectin regulates glycogen metabolism at the human fetal–maternal interface. *Journal of molecular endocrinology*. 2018;61(3):139-52.
51. Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 2005;130(5):583-97.
52. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2015;36(7):461-70.
53. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(4):242-58.
54. Zhang Q, Xiao Z, Lee C-L, Duan Y-G, Fan X, Yeung WSB, et al. The Regulatory Roles of Chemerin-Chemokine-Like Receptor 1 Axis in Placental Development and Vascular Remodeling During Early Pregnancy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10.
55. D'Ippolito S, Tersigni C, Scambia G, Di Simone N. Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. *BioFactors*. 2012;38(1):14-23.
56. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction*. 2017;153(3):R97-R108.

57. Rogers BN, Stephens JM, Sones JL. Linking inflammatory adipose tissue to placental abnormalities in obese preeclamptic pregnancies. *Physiological Genomics*. 2022;54(8):319-24.
58. Hufnagel A, Dearden L, Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Programming of cardiometabolic health: the role of maternal and fetal hyperinsulinaemia. *Journal of Endocrinology*. 2022;253(2):R47-R63.
59. Hiden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *Journal of Anatomy*. 2009;215(1):60-8.
60. Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, McDonald TJ, Wu G, Kanai Y, et al. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. *The FASEB Journal*. 2014;28(3):1294-305.
61. Anam AK, Cooke KM, Dratver MB, O'Bryan JV, Perley LE, Guller SM, et al. Insulin increases placental triglyceride as a potential mechanism for fetal adiposity in maternal obesity. *Molecular Metabolism*. 2022;64:101574.
62. Kelly Amy C, Powell Theresa L, Jansson T. Placental function in maternal obesity. *Clinical Science*. 2020;134(8):961-84.
63. Harrison JL, Adam CL, Brown YA, Wallace JM, Aitken RP, Lea RG, et al. An immunohistochemical study of the localization and developmental expression of ghrelin and its functional receptor in the ovine placenta. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2007;5:25.
64. Coria-Caballero V, Jaramillo-Narvaez M-d-l-L, Leon-Verdin MG, Martinez F, Lazo-de-la-Vega-Monroy M-L, Barbosa-Sabanero G. Desacylghrelin modulates GHS-R1 receptor expression and cell differentiation in placental BeWo cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2023;577:112035.
65. González-Domínguez MI, Lazo-de-la-Vega-Monroy M-L, Zaina S, Sabanero M, Daza-Benítez L, Malacara JM, et al. Association of cord blood des-acyl ghrelin with birth weight, and placental GHS-R1 receptor expression in SGA, AGA, and LGA newborns. *Endocrine*. 2016;53(1):182-91.
66. Shen L, Zhu Y, Xiao J, Qian B, Jiang T, Deng J, et al. Relationships between placental adiponectin, leptin, visfatin and resistin and birthweight in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 2020;32(4):402-8.
67. Astern JM, Collier AC, Kendal-Wright CE. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF/NAMPT/Visfatin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) cooperate to increase the permeability of the human placental amnion. *Placenta*. 2013;34(1):42-9.
68. Mumtaz S, AlSaif S, Wray S, Noble K. Inhibitory effect of visfatin and leptin on human and rat myometrial contractility. *Life sciences*. 2015;125:57-62.

69. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*. 1993;133(6):2861-70.
70. Cilvik SN, Wesolowski SR, Anthony RV, Brown LD, Rozance PJ. Late gestation fetal hyperglucagonaemia impairs placental function and results in diminished fetal protein accretion and decreased fetal growth. *The Journal of physiology*. 2021;599(13):3403-27.
71. Kajani S, Laker RC, Ratkova E, Will S, Rhodes CJ. Hepatic glucagon action: beyond glucose mobilization. *Physiological Reviews*. 2024;104(3):1021-60.
72. Charron MJ, Vuguin PM. Lack of glucagon receptor signaling and its implications beyond glucose homeostasis. *The Journal of endocrinology*. 2015;224(3):R123-30.
73. ITO M, SUGAI K, SASAKI J, SUZUKI R, ODAWARA M, TORII M, et al. 1963-LB: Prenatal Treatment of Glucagon-Like Peptide 1 Agonist Mitigates Cognitive Deficits in Offspring of Mothers with Diabetes by Modulating Placental Development Mediated by ADGRL3. *Diabetes*. 2024;73(Supplement_1).
74. Dumolt JH, Rosario FJ, Kramer AC, Horwitz S, Powell TL, Jansson T. Maternal glucagon-like peptide-1 is positively associated with fetal growth in pregnancies complicated with obesity. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2023;137(8):663-78.
75. Moffett RC, Irwin N, Francis JM, Flatt PR. Alterations of glucose-dependent insulintropic polypeptide and expression of genes involved in mammary gland and adipose tissue lipid metabolism during pregnancy and lactation. *PloS one*. 2013;8(11):e78560.
76. Valsamakis G, Margeli A, Vitoratos N, Boutsiadis A, Sakkas EG, Papadimitriou G, et al. The role of maternal gut hormones in normal pregnancy: fasting plasma active glucagon-like peptide 1 level is a negative predictor of fetal abdomen circumference and maternal weight change. *European Journal of Endocrinology*. 2010;162(5):897-903.
77. Ye Y, Vattai A, Zhang X, Zhu J, Thaler CJ, Mahner S, et al. Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(8):1651.
78. Zhao H, Liu J, Yin S, Bao H. PAI-1 promotes human endometrial stromal decidualization via inhibiting VEGFR2/PI3K/AKT signaling pathway mediated F-actin reorganization. *The FASEB Journal*. 2024;38(24):e70233.
79. Seferovic MD, Gupta MB. Increased Umbilical Cord PAI-1 Levels in Placental Insufficiency Are Associated with Fetal Hypoxia and Angiogenesis. *Disease Markers*. 2016;2016(1):7124186.
80. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes*. 2000;49(8):1374-80.

81. Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der Planken M, Ruige JB, Van Gaal LF. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *International journal of obesity* (2005). 2006;30(8):1308-14.
82. Nava-Salazar S, Flores-Pliego A, Pérez-Martínez G, Parra-Hernández S, Vanoye-Carlo A, Ibarguengoitia-Ochoa F, et al. Resistin Modulates Low-Density Lipoprotein Cholesterol Uptake in Human Placental Explants via PCSK9. *Reproductive Sciences*. 2022;29(11):3242-53.
83. Yongming Z, Muxun Z, Wei G, Meixia Y, Keying X, Shiang H, et al. Expression of resistin protein in normal human subcutaneous adipose tissue and pregnant women subcutaneous adipose tissue and placenta. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2006;26(3):288-91.
84. Jiang S, Teague AM, Tryggestad JB, Lyons TJ, Chernaused SD. Fetal circulating human resistin increases in diabetes during pregnancy and impairs placental mitochondrial biogenesis. *Molecular Medicine*. 2020;26(1):76.
85. JIANG S, TEAGUE AM, TRYGGESTAD JB, LYONS T, CHERNAUSEK S. Regulation and Role of Human Resistin in Diabetes during Pregnancy. *Diabetes*. 2018;67(Supplement_1).
86. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, et al. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clinical Endocrinology*. 2007;66(3):447-53.
87. Armistead B, Johnson E, VanderKamp R, Kula-Eversole E, Kadam L, Drewlo S, et al. Placental Regulation of Energy Homeostasis During Human Pregnancy. *Endocrinology*. 2020;161(7).
88. Kohan-Ghadr H-R, Armistead B, Berg M, Drewlo S. Irisin Protects the Human Placenta from Oxidative Stress and Apoptosis via Activation of the Akt Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):11229.
89. Haafiz A, Pan Y-X, Novak D. Placental Amino Acid Transport System A—an Assessment of SNAT1 and SNAT2 Expression in F1 and F2 Placentas in a Rat Model of Gestational Protein *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2010;19.
90. Li Y-Q, Bai B, Cao X-X, Zhang Y-H, Yan H, Zheng Q-Q, et al. Divalent Metal Transporter 1 Expression and Regulation in Human Placenta. *Biological Trace Element Research*. 2012;146(1):6-12.
91. Lopez-Tello J, Schofield Z, Kiu R, Dalby MJ, van Sinderen D, Le Gall G, et al. Maternal gut microbiota *Bifidobacterium* promotes placental morphogenesis, nutrient transport and fetal growth in mice. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2022;79(7):386.
92. Kazantzis M, Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1821(5):852-7.

93. Schroeder M, Fuenzalida B, Yi N, Shahnawaz S, Gertsch J, Pellegata D, et al. LAT1-dependent placental methionine uptake is a key player in fetal programming of metabolic disease. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 2024;153.
94. Singh N, Ecker GF. Insights into the Structure, Function, and Ligand Discovery of the Large Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(5):1278.
95. Rosario Fredrick J, Urschitz J, Powell Theresa L, Brown Thomas L, Jansson T. Overexpression of the LAT1 in primary human trophoblast cells increases the uptake of essential amino acids and activates mTOR signaling. *Clinical Science*. 2023;137(21):1651-64.
96. Walker N, Filis P, Soffientini U, Bellingham M, O'Shaughnessy PJ, Fowler PA. Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences†. *Biology of Reproduction*. 2017;96(4):733-42.
97. Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal–Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(9):16153-85.
98. Borges MH, Pullockaran J, Catalano PM, Baumann MU, Zamudio S, Illsley NP. Human placental GLUT1 glucose transporter expression and the fetal insulin-like growth factor axis in pregnancies complicated by diabetes. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2019;1865(9):2411-9.
99. Mataix Verdú J. Nutrición y alimentación humana. *Nutrición y alimentación humana* 2009. p. 700-.
100. Mandy M, Nyirenda M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *International health*. 2018;10(2):66-70.
101. Tan EK, Tan EL. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2013;27(6):791-802.
102. Calleja CA, Hurtado MMC, Daschner Á, Escámez PSF, Abuín CMF, Pons RMG, et al. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Ingestas Nutricionales de Referencia para la población española. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. 2019(29):43-68.
103. Concina F, Pani P, Carletti C, Rosolen V, Knowles A, Parpinel M, et al. Nutrient Intake during Pregnancy and Adherence to Dietary Recommendations: The Mediterranean PHIME Cohort. *Nutrients*. 2021;13(5).
104. Venn BJ. Macronutrients and Human Health for the 21st Century. *Nutrients*. 2020;12(8).
105. Mousa A, Naqash A, Lim S. Macronutrient and Micronutrient Intake during Pregnancy: An Overview of Recent Evidence. *Nutrients*. 2019;11(2).
106. Quintas Herrero E. Nutrición en gestación y lactancia. *Nutriguía Manual de nutrición clínica en atención primaria* Madrid: Editorial Complutense. 2015:61.

107. Akter S, Akhter H, Chaudhury HS, Rahman MH, Gorski A, Hasan MN, et al. Dietary carbohydrates: Pathogenesis and potential therapeutic targets to obesity-associated metabolic syndrome. *BioFactors*. 2022;48(5):1036-59.
108. Drehmer M, Camey SA, Nunes MA, Duncan BB, Lacerda M, Pinheiro AP, et al. Fibre intake and evolution of BMI: from pre-pregnancy to postpartum. *Public health nutrition*. 2013;16(8):1403-13.
109. Stephens TV, Payne M, Ball RO, Pencharz PB, Elango R. Protein requirements of healthy pregnant women during early and late gestation are higher than current recommendations. *The Journal of nutrition*. 2015;145(1):73-8.
110. Borazjani F, Angali KA, Kulkarni SS. Milk and protein intake by pregnant women affects growth of foetus. *Journal of health, population, and nutrition*. 2013;31(4):435-45.
111. Maslova E, Rytter D, Bech BH, Henriksen TB, Rasmussen MA, Olsen SF, et al. Maternal protein intake during pregnancy and offspring overweight 20 y later. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;100(4):1139-48.
112. Whitney EN, Rolfes SR, Crowe T, Walsh A. *Understanding nutrition*: Cengage AU; 2019.
113. Dubinsky EP, Shaham S, Zelber-Sagi S, Avnon T, Yogev Y, Anbar R. Vegan diet and protein consumption during pregnancy effects neonate weight. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2023;58:457-8.
114. Martínez García RM, Ortega Anta RM, Bregón Fernández F, editors. *Alimentación de la madre durante el embarazo y lactancia: riesgos nutricionales*. *Nutrición y alimentación en promoción de la salud*; 2007: Castilla-La Mancha. Consejería de Sanidad.
115. Middleton P, Gomersall JC, Gould JF, Shepherd E, Olsen SF, Makrides M. Omega-3 fatty acid addition during pregnancy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018;11(11):Cd003402.
116. Candela CG, Kohen VL, Nogueira TL, editors. *Alimentación durante el embarazo. Pautas para conseguir los mejores resultados nutricionales y sanitarios para la madre y el niño*. *Nutrición en población femenina: Desde la infancia a la edad avanzada*; 2007: Ergon.
117. Programmes RCoPoIaDoCSa. *Clinical Practice Guideline: Nutrition During Pregnancy*. In: *Gynaecologists IoOa*, editor. 2019.
118. Emmett R, Akkersdyk S, Yeatman H, Meyer BJ. Expanding Awareness of Docosahexaenoic Acid during Pregnancy. *Nutrients*. 2013;5(4):1098-109.
119. Ballestín SS, Campos MIG, Ballestín JB, Bartolomé MJL. Is supplementation with micronutrients still necessary during pregnancy? A review. *Nutrients*. 2021;13(9):3134.
120. Cetin I, Berti C, Calabrese S. Función de los micronutrientes durante el período periconcepcional. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*. 2010;29(2):67-88.
121. Guillard JC. [What is a vitamin?]. *La Revue du praticien*. 2013;63(8):1060-9.

122. LA LACTANCIA EY. LA NUTRICION DURANTE EL, EMBARAZO Y LA LACTANCIA.
123. Vidaña Rodríguez E. Importancia de la alimentación saludable en el embarazo. 2022.
124. Abbas M, Farhan S, Muhammad AF, Muhammad A, Tabussam T, Shakeel BM, et al. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(8):1689-99.
125. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*. 2000;130(8S Suppl):2073s-85s.
126. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012;27:76-89.
127. Pinto P, Santos CN. Worldwide (poly)phenol intake: assessment methods and identified gaps. *European journal of nutrition*. 2017;56(4):1393-408.
128. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):727-47.
129. Oluwole O, Fernando WB, Lumanlan J, Ademuyiwa O, Jayasena V. Role of phenolic acid, tannins, stilbenes, lignans and flavonoids in human health – a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2022;57(10):6326-35.
130. Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordoñez M, Llorach R, Farran-Codina A, Barupal DK, et al. Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Molecular nutrition & food research*. 2016;60(1):203-11.
131. Navarro-Orcajada S, Conesa I, Vidal-Sánchez FJ, Matencio A, Albaladejo-Maricó L, García-Carmona F, et al. Stilbenes: Characterization, bioactivity, encapsulation and structural modifications. A review of their current limitations and promising approaches. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2023;63(25):7269-87.
132. Tan BKH, Ong KW. Chapter 9 - Influence of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. *Polyphenols in Human Health and Disease*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 95-111.
133. Barros L, Dueñas M, Ferreira ICFR, Baptista P, Santos-Buelga C. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(6):1076-9.
134. Leri M, Scuto M, Ontario ML, Calabrese V, Calabrese EJ, Bucciattini M, et al. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
135. Nacka-Aleksić M, Pirković A, Vilotić A, Bojić-Trbojević Ž, Jovanović Krivokuća M, Giampieri F, et al. The Role of Dietary Polyphenols in Pregnancy and Pregnancy-Related Disorders. *Nutrients*. 2022;14(24):5246.
136. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Gaforio JJ. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants*. 2019;8(5):137.

137. Hinojosa-Nogueira D, Pérez-Burillo S, García-Rincón I, Rufián-Henares JA, Pastoriza S. A useful and simple tool to evaluate and compare the intake of total dietary polyphenols in different populations. *Public health nutrition*. 2021;24(12):3818-24.
138. Chu KO, Wang CC, Chu CY, Chan KP, Rogers MS, Choy KW, et al. Pharmacokinetic studies of green tea catechins in maternal plasma and fetuses in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;95(6):1372-81.
139. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine*. 2004;36(7):838-49.
140. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):673-751.
141. Martel F, Monteiro R, Calhau C. Effect of polyphenols on the intestinal and placental transport of some bioactive compounds. *Nutrition Research Reviews*. 2010;23(1):47-64.
142. Marcin Ożarowski RK, Przemysław Ł. Mikołajczak, Karolina Wielgus, Andrzej Klejewski, Hubert Wolski, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz In vitro and in vivo activities of flavonoids – apigenin, baicalin, chrysin, scutellarin – in regulation of hypertension – a review for their possible effects in pregnancy-induced hypertension. *Herba Polonica*. 2019;65(1):16.
143. Bogacz A, Mikołajczak PŁ, Wolek M, Górská A, Szulc M, Ożarowski M, et al. Combined Effects of Methyldopa and Flavonoids on the Expression of Selected Factors Related to Inflammatory Processes and Vascular Diseases in Human Placenta Cells—An In Vitro Study. *Molecules*. 2021;26(5):1259.
144. Ożarowski M, Karpiński TM, Szulc M, Wielgus K, Kujawski R, Wolski H, et al. Plant Phenolics and Extracts in Animal Models of Preeclampsia and Clinical Trials—Review of Perspectives for Novel Therapies. *Pharmaceuticals*. 2021;14(3):269.
145. Sudharshana Murthy KA, Bhandiwada A, Chandan SL, Gowda SL, Sindhusree G. Evaluation of Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines in Gestational Diabetes Mellitus and Their Correlation with Pregnancy Outcome. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2018;22(1):79-84.
146. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN, et al. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in pharmacology*. 2022;13:806470.
147. Lin H, Li S, Zhang J, Lin S, Tan BK, Hu J. Functional food ingredients for control of gestational diabetes mellitus: a review. *Food Science and Technology*. 2022;42.
148. Cuomo P, Capparelli R, Alifano M, Iannelli A, Iannelli D. Gut Microbiota Host–Gene Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22):13717.

149. Barendregt D, Gacesa R, Plomp N, Calado B, Bourgonje AR, van Heck JIP, et al. P0123 The immune system of patients with immune-mediated diseases perceives dysbiotic intestinal microbial species, and IgG reactivity uncovers shared and non-shared responses across diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2025;19(Supplement_1):i507-i.
150. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
151. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
152. Yuan X, Chen R, Zhang Y, Lin X, Yang X. Gut microbiota: effect of pubertal status. *BMC Microbiology*. 2020;20(1):334.
153. Korpela K, Kallio S, Salonen A, Hero M, Kukkonen AK, Miettinen PJ, et al. Gut microbiota develop towards an adult profile in a sex-specific manner during puberty. *Scientific Reports*. 2021;11(1):23297.
154. Barbara G, Barbaro MR, Fuschi D, Palombo M, Falangone F, Cremon C, et al. Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier. *Frontiers in nutrition*. 2021;Volume 8 - 2021.
155. Paradis T, Bègue H, Basmaciyan L, Dalle F, Bon F. Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):2506.
156. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 2014;14(1):189.
157. Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M, Porcari S, Rinninella E, Kaitsas F, et al. Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*. 2023;15(9).
158. Anderson JW, Baird P, Davis RH, Jr., Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*. 2009;67(4):188-205.
159. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D490-5.
160. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(3):473-93.
161. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2021;19(1):55-71.

162. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:185.
163. Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scaldaferri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and emergency medicine*. 2024;19(2):275-93.
164. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 2016;535(7610):75-84.
165. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of gastroenterology*. 2015;28(2):203-9.
166. Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatric obesity*. 2017;12 Suppl 1(Suppl 1):3-17.
167. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. 2017;7(1):13537.
168. Simpson CA, Diaz-Arteche C, Eliby D, Schwartz OS, Simmons JG, Cowan CSM. The gut microbiota in anxiety and depression - A systematic review. *Clinical psychology review*. 2021;83:101943.
169. Kortenien J, Karlsson L, Aatsinki A. Systematic review: Autism spectrum disorder and the gut microbiota. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2023;148(3):242-54.
170. Younes JA, Lievens E, Hummelen R, van der Westen R, Reid G, Petrova MI. Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship. *Trends in microbiology*. 2018;26(1):16-32.
171. Perez PF, Doré JL, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics*. 2007;119(3):e724-e32.
172. Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1031.
173. Amir M, Brown JA, Rager SL, Sanidad KZ, Ananthanarayanan A, Zeng MY. Maternal Microbiome and Infections in Pregnancy. *Microorganisms*. 2020;8(12).
174. Mesa MD, Loureiro B, Iglesia I, Fernandez Gonzalez S, Llurba Olivé E, García Algar O, et al. The Evolving Microbiome from Pregnancy to Early Infancy: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2020;12(1).
175. Di Simone N, Santamaria Ortiz A, Specchia M, Tersigni C, Villa P, Gasbarrini A, et al. Recent Insights on the Maternal Microbiota: Impact on Pregnancy Outcomes. *Frontiers in immunology*. 2020;11:528202.
176. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. *Trends in microbiology*. 2019;27(2):131-47.

177. Godfrey KM. Maternal regulation of fetal development and health in adult life. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1998;78(2):141-50.
178. Casanello P, Krause BJ, Castro-Rodriguez JA, Uauy R. Programación fetal de enfermedades crónicas: conceptos actuales y epigenética. *Revista chilena de pediatría*. 2015;86:135-7.
179. Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, Oller do Nascimento CM, et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;26(2):99-111.
180. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet (London, England)*. 1993;341(8850):938-41.
181. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet (London, England)*. 1986;1(8489):1077-81.
182. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal of physiology*. 2006;572(Pt 1):25-30.
183. Gabory A, Roseboom TJ, Moore T, Moore LG, Junien C. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biology of sex differences*. 2013;4(1):5.
184. Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Dickinson H, Moritz KM. Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta. *Placenta*. 2017;54:10-6.
185. Matheson H, Veerbeek JH, Charnock-Jones DS, Burton GJ, Yung HW. Morphological and molecular changes in the murine placenta exposed to normobaric hypoxia throughout pregnancy. *The Journal of physiology*. 2016;594(5):1371-88.
186. Ganguly E, Aljunaidy MM, Kirschenman R, Spaans F, Morton JS, Phillips TEJ, et al. Sex-Specific Effects of Nanoparticle-Encapsulated MitoQ (nMitoQ) Delivery to the Placenta in a Rat Model of Fetal Hypoxia. *Frontiers in Physiology*. 2019;10.
187. Osei-Kumah A, Smith R, Jurisica I, Caniggia I, Clifton VL. Sex-specific differences in placental global gene expression in pregnancies complicated by asthma. *Placenta*. 2011;32(8):570-8.
188. Barke TL, Money KM, Du L, Serezani A, Gannon M, Mirnics K, et al. Sex modifies placental gene expression in response to metabolic and inflammatory stress. *Placenta*. 2019;78:1-9.
189. Napso T, Hung Y-P, Davidge ST, Care AS, Sferruzzi-Perri AN. Author Correction: Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific changes in placental phenotype in rats. *Scientific Reports*. 2020;10(1):2871.
190. Chango A, Pogribny IP. Considering Maternal Dietary Modulators for Epigenetic Regulation and Programming of the Fetal Epigenome. *Nutrients*. 2015;7(4):2748-70.

191. Hipwell AE, Fu H, Tung I, Stiller A, Keenan K. Preconception stress exposure from childhood to adolescence and birth outcomes: The impact of stress type, severity and consistency. *Frontiers in Reproductive Health*. 2023;Volume 4 - 2022.
192. Negrato CA, Gomes MB. Low birth weight: causes and consequences. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2013;5(1):49.
193. Marques AH, Bjørke-Monsen A-L, Teixeira AL, Silverman MN. Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology. *Brain Research*. 2015;1617:28-46.
194. Kappen C, Kruger C, MacGowan J, Salbaum JM. Maternal diet modulates placenta growth and gene expression in a mouse model of diabetic pregnancy. *PloS one*. 2012;7(6):e38445.
195. Finlay BB, Pettersson S, Melby MK, Bosch TCG. The Microbiome Mediates Environmental Effects on Aging. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2019;41(10):e1800257.
196. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.
197. Dierikx TH, Visser DH, Benninga MA, van Kaam A, de Boer NKH, de Vries R, et al. The influence of prenatal and intrapartum antibiotics on intestinal microbiota colonisation in infants: A systematic review. *The Journal of infection*. 2020;81(2):190-204.
198. García-Mantrana I, Selma-Royo M, González S, Parra-Llorca A, Martínez-Costa C, Collado MC. Distinct maternal microbiota clusters are associated with diet during pregnancy: impact on neonatal microbiota and infant growth during the first 18 months of life. *Gut microbes*. 2020;11(4):962-78.
199. Wang S, Egan M, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, et al. A good start in life is important—perinatal factors dictate early microbiota development and longer term maturation. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020;44(6):763-81.
200. Wilmanski T, Diener C, Rappaport N, Patwardhan S, Wiedrick J, Lapidus J, et al. Gut microbiome pattern reflects healthy ageing and predicts survival in humans. *Nature Metabolism*. 2021;3(2):274-86.
201. Cooke CM, Davidge ST. Advanced maternal age and the impact on maternal and offspring cardiovascular health. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2019;317(2):H387-h94.
202. Glick I, Kadish E, Rottenstreich M. Management of Pregnancy in Women of Advanced Maternal Age: Improving Outcomes for Mother and Baby. *International journal of women's health*. 2021;13:751-9.
203. Kahveci B, Melekoglu R, Evruke IC, Cetin C. The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies. *BMC pregnancy and childbirth*. 2018;18(1):343.

204. Fuchs F, Monet B, Ducruet T, Chaillet N, Audibert F. Effect of maternal age on the risk of preterm birth: A large cohort study. *PloS one*. 2018;13(1):e0191002.
205. Schummers L, Hutcheon JA, Hacker MR, VanderWeele TJ, Williams PL, McElrath TF, et al. Absolute Risks of Obstetric Outcomes Risks by Maternal Age at First Birth: A Population-based Cohort. *Epidemiology*. 2018;29(3):379-87.
206. Yogev Y, Melamed N, Bardin R, Tenenbaum-Gavish K, Ben-Shitrit G, Ben-Haroush A. Pregnancy outcome at extremely advanced maternal age. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2010;203(6):558.e1-e7.
207. Lao T, Cheng Y. Fetal and maternal complications in macrosomic pregnancies. *Research and Reports in Neonatology*. 2014;4:65.
208. Tzanetakou IP, Mikhailidis DP, Perrea DN. Nutrition During Pregnancy and the Effect of Carbohydrates on the Offspring's Metabolic Profile: In Search of the "Perfect Maternal Diet". *The open cardiovascular medicine journal*. 2011;5:103-9.
209. Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Gimenez-Monzó D, García-de-la-Hera M, Granado F, Young IS, et al. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutrition journal*. 2013;12:26.
210. Atlas Fotográfico ENALIA; Demométrica 2013.
211. Novartis. Tabla de composición de Alimentos. 5th ed2009.
212. AESAN. Ingestas dietéticas de referencia para la población española. Madrid: Ministerio de Consumo. In: Nutrición AEdSAy, editor. 2019.
213. Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2010;2010:bap024.
214. Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordoñez M, Knox C, Llorach R, Eisner R, et al. Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2012;2012:bas031.
215. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'Hiri N, García-Lobato P, et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2013;2013:bat070.
216. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
217. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*. 2006;1(2):581-5.

218. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* (San Diego, Calif). 2001;25(4):402-8.
219. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PloS one*. 2014;9(8):e105592.
220. Lundberg DS, Yourstone S, Mieczkowski P, Jones CD, Dangl JL. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat Methods*. 2013;10(10):999-1002.
221. Terrón-Camero LC, Gordillo-González F, Salas-Espejo E, Andrés-León E. Comparison of metagenomics and metatranscriptomics tools: a guide to making the right choice. *Genes*. 2022;13(12):2280.
222. Andrews S. Babraham Bioinformatics—FastQC. . A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.
223. FastQC. 2015.
224. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-8.
225. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*. 2019;37(8):852-7.
226. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13(7):581-3.
227. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*. 2012;41(D1):D590-D6.
228. Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*. 2013;2(1):16.
229. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature methods*. 2013;10(12):1200-2.
230. Hinojosa-Nogueira D, Romero-Molina D, Giménez-Asensio MJ, Gonzalez-Alzaga B, López-Flores I, Cueva SP, et al. Validity and Reproducibility of a Food Frequency Questionnaire to Assess Nutrients Intake of Pregnant Women in the South-East of Spain. *Nutrients*. 2021;13(9).
231. Misan N, Paczkowska K, Szmyt M, Kapska K, Tomczak L, Bręborowicz GH, et al. Nutritional behavior in pregnancy. *Ginekologia polska*. 2019;90(9):527-33.
232. Aparicio E, Jardí C, Bedmar C, Pallejà M, Basora J, Arija V, et al. Nutrient Intake during Pregnancy and Post-Partum: ECLIPSES Study. *Nutrients*. 2020;12(5).

233. Serra-Majem L, Tomaino L, Dernini S, Berry EM, Lairon D, Ngo de la Cruz J, et al. Updating the Mediterranean Diet Pyramid towards Sustainability: Focus on Environmental Concerns. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(23).
234. Demangeat A, Hornero-Ramirez H, Meynier A, Sanoner P, Atkinson FS, Nazare JA, et al. Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response. *Nutrients*. 2023;15(20).
235. Savard C, Lemieux S, Weisnagel SJ, Fontaine-Bisson B, Gagnon C, Robitaille J, et al. Trimester-Specific Dietary Intakes in a Sample of French-Canadian Pregnant Women in Comparison with National Nutritional Guidelines. *Nutrients*. 2018;10(6).
236. Williamson CS. Nutrition in pregnancy. *Nutrition Bulletin*. 2006;31(1):28-59.
237. Khammarnia M, Ansari-Moghaddam A, Kakhki FG, Clark CCT, Barahouei FB. Maternal macronutrient and energy intake during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 2024;24(1):478.
238. Taylor RM, Blumfield ML, Ashton LM, Hure AJ, Smith R, Buckley N, et al. Macronutrient Intake in Pregnancy and Child Cognitive and Behavioural Outcomes. *Children* (Basel, Switzerland). 2021;8(5).
239. Rodríguez-Bernal CL, Ramón R, Quiles J, Murcia M, Navarrete-Muñoz EM, Vioque J, et al. Dietary intake in pregnant women in a Spanish Mediterranean area: as good as it is supposed to be? *Public health nutrition*. 2013;16(8):1379-89.
240. Irlés Rocamora JA, Iglesias Bravo EM, Avilés Mejías S, Bernal López E, de Valle Galindo PB, Moriones López L, et al. [Nutritional value of the diet in healthy pregnant women. Results of a nutrition survey of pregnant women]. *Nutr Hosp*. 2003;18(5):248-52.
241. Brouns F, Bjorck I, Frayn KN, Gibbs AL, Lang V, Slama G, et al. Glycaemic index methodology. *Nutr Res Rev*. 2005;18(1):145-71.
242. Qiu C, Coughlin KB, Frederick IO, Sorensen TK, Williams MA. Dietary fiber intake in early pregnancy and risk of subsequent preeclampsia. *American journal of hypertension*. 2008;21(8):903-9.
243. Clapp JF, 3rd. Maternal carbohydrate intake and pregnancy outcome. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2002;61(1):45-50.
244. Vizcarra B MD, Tovar M, Hernández A, García de Yégüez M, Hernández-Rojas PE. Relación entre el estadonutricional materno y el perímetro cefálico del recién nacido. *JONNPR*. 2019;4(5):869-86.
245. Parlee SD, MacDougald OA. Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: the Trojan horse of developmental plasticity. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(3):495-506.
246. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* (Bethesda, Md). 2016;31(4):283-93.

247. Paknahad Z, Fallah A, Moravejolahkami AR. Maternal Dietary Patterns and Their Association with Pregnancy Outcomes. *Clinical nutrition research*. 2019;8(1):64-73.
248. Fatima I, Gamage I, De Almeida RJR, Cabandugama P, Kamath G. Current Understanding of Dietary Fiber and Its Role in Chronic Diseases. *Missouri medicine*. 2023;120(5):381-8.
249. Sparano S, Ahrens W, De Henauw S, Marild S, Molnar D, Moreno LA, et al. Being macrosomic at birth is an independent predictor of overweight in children: results from the IDEFICS study. *Maternal and child health journal*. 2013;17(8):1373-81.
250. Lee SE, Talegawkar SA, Merialdi M, Caulfield LE. Dietary intakes of women during pregnancy in low- and middle-income countries. *Public health nutrition*. 2013;16(8):1340-53.
251. Board. IoMUFaN. Dietary Reference Intakes: A Risk Assessment Model for Establishing Upper Intake Levels for Nutrients. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45189/>]
252. Popova A, Mihaylova D. Antinutrients in Plant-based Foods: A Review. *The Open Biotechnology Journal*. 2019;13:68-76.
253. Elango R, Ball RO. Protein and Amino Acid Requirements during Pregnancy. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2016;7(4):839s-44s.
254. Cucó G, Arija V, Iranzo R, Vilà J, Prieto MT, Fernández-Ballart J. Association of maternal protein intake before conception and throughout pregnancy with birth weight. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2006;85(4):413-21.
255. Saunders CM, Reh binder EM, Carlsen KCL, Gudbrandsgard M, Carlsen KH, Haugen G, et al. Food and nutrient intake and adherence to dietary recommendations during pregnancy: a Nordic mother-child population-based cohort. *Food & nutrition research*. 2019;63.
256. Mendes Garrido Abregú F, Caniffi C, Arranz CT, Tomat AL. Impact of Zinc Deficiency During Prenatal and/or Postnatal Life on Cardiovascular and Metabolic Diseases: Experimental and Clinical Evidence. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2022;13(3):833-45.
257. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9608):243-60.
258. Ota E, Hori H, Mori R, Tobe-Gai R, Farrar D. Antenatal dietary education and supplementation to increase energy and protein intake. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015(6):Cd000032.
259. Prohaska JR. Impact of copper deficiency in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1314:1-5.
260. Arredondo M, Núñez MT. Iron and copper metabolism. *Molecular aspects of medicine*. 2005;26(4-5):313-27.

261. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet* (London, England). 2012;379(9822):1256-68.
262. Hofstee P, Bartho LA, McKeating DR, Radenkovic F, McEnroe G, Fisher JJ, et al. Maternal selenium deficiency during pregnancy in mice increases thyroid hormone concentrations, alters placental function and reduces fetal growth. *The Journal of physiology*. 2019;597(23):5597-617.
263. Dias FM, Silva DM, Doyle FC, Ribeiro AM. The connection between maternal thiamine shortcoming and offspring cognitive damage and poverty perpetuation in underprivileged communities across the world. *Medical hypotheses*. 2013;80(1):13-6.
264. Morris MS, Picciano MF, Jacques PF, Selhub J. Plasma pyridoxal 5'-phosphate in the US population: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(5):1446-54.
265. Quinn M, Halsey J, Sherliker P, Pan H, Chen Z, Bennett DA, et al. Global heterogeneity in folic acid fortification policies and implications for prevention of neural tube defects and stroke: a systematic review. *EClinicalMedicine*. 2024;67:102366.
266. Rumbold A, Ota E, Hori H, Miyazaki C, Crowther CA. Vitamin E supplementation in pregnancy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015;2015(9):Cd004069.
267. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *British medical bulletin*. 2001;60:5-20.
268. Penniston KL, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A1234. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(2):191-201.
269. Milman N. Iron and pregnancy - A delicate balance. *Annals of hematology*. 2006;85:559-65.
270. De-Regil LM, Palacios C, Ansary A, Kulier R, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;2(2):Cd008873.
271. Harvey NC, Holroyd C, Ntani G, Javaid K, Cooper P, Moon R, et al. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. *Health technology assessment (Winchester, England)*. 2014;18(45):1-190.
272. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Masella R. Management of reproduction and pregnancy complications in maternal obesity: which role for dietary polyphenols? *Biofactors*. 2014;40(1):79-102.
273. Ono K, Nitta A, Tanaka S, Shiraishi M, Mizutani A, Matsubara T. A Case of Premature Constriction of the Ductus Arteriosus in an Infant Caused by Intake of Rooibos Tea during Pregnancy. *Dokkyo Medical Journal*. 2022;1:72-5.
274. Sinha M, Sachan DK, Bhattacharya R, Singh P, Parthasarathi R. ToxDP2 Database: Toxicity prediction of dietary polyphenols. *Food chemistry*. 2022;370:131350.

275. Zielinsky P, Piccoli AL, Jr., Vian I, Zílio AM, Naujorks AA, Nicoloso LH, et al. Maternal restriction of polyphenols and fetal ductal dynamics in normal pregnancy: an open clinical trial. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2013;101(3):217-25.
276. Costa V, Carriço A, Valente F. Constricción prematura del ductus arterioso: consecuencias del consumo excesivo de té negro y de hierbas. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2013;56(3):144-6.
277. Finn-Sell SL, Cottrell EC, Greenwood SL, Dilworth MR, Cowley EJ, Sibley CP, et al. Pomegranate Juice Supplementation Alters Utero-Placental Vascular Function and Fetal Growth in the eNOS(-/-) Mouse Model of Fetal Growth Restriction. *Front Physiol*. 2018;9:1145.
278. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in nutrition*. 2018;5:87.
279. Hinojosa-Nogueira D, Romero-Molina D, González-Alzaga B, Giménez-Asensio MJ, Hernandez AF, Navajas-Porras B, et al. Evaluation of Polyphenol Intake in Pregnant Women from South-Eastern Spain and the Effect on Anthropometric Measures at Birth and Gestational Age. *Nutrients*. 2024;16(18):3096.
280. Zhang JJ, Liu X, Chen L, Zhang S, Zhang X, Hao C, et al. Advanced maternal age alters expression of maternal effect genes that are essential for human oocyte quality. *Aging*. 2020;12(4):3950-61.
281. Kobayashi H, Yoshimoto C, Matsubara S, Shigetomi H, Imanaka S. Altered Energy Metabolism, Mitochondrial Dysfunction, and Redox Imbalance Influencing Reproductive Performance in Granulosa Cells and Oocyte During Aging. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2024;31(4):906-16.
282. Diaz-Castro J, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Kajarabille N, de Paco C, Garrido-Sanchez M, et al. Gender specific differences in oxidative stress and inflammatory signaling in healthy term neonates and their mothers. *Pediatric research*. 2016;80(4):595-601.
283. Luo R, Li X, Jiang R, Gao X, Lü Z, Hua W. Serum concentrations of resistin and adiponectin and their relationship to insulin resistance in subjects with impaired glucose tolerance. *The Journal of international medical research*. 2012;40(2):621-30.
284. Teng L, Guan T, Guo B, Ma C, Lin G, Wu R, et al. GIP-GIPR promotes neurite outgrowth of cortical neurons in Akt dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications*. 2021;534:121-7.
285. Pavlová T, Novák J, Bienertová-Vašků J. The role of visfatin (PBEF/Nampt) in pregnancy complications. *Journal of reproductive immunology*. 2015;112:102-10.
286. Mashhad Taraqi AS, Tehranian N, Roudbaneh SP, Esmaeilzadeh MS, Kazemnejad A, Aghoozi MF, et al. Visfatin as a predictor for growth of fetus and infant. *Turkish journal of obstetrics and gynecology*. 2018;15(2):80-6.

287. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod.* 2006;74(2):218-29.
288. Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum WF, Schneider H, Fusch C. Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000;85(11):4298-301.
289. Walker SP, Ugoni AM, Lim R, Lappas M. Inverse relationship between gestational weight gain and glucose uptake in human placenta from female fetuses. *Pediatric obesity.* 2014;9(3):e73-6.
290. Allbrand M, Eklund D, Cao Y, Nilsson K, Lodefalk M. Gene expression of leptin, leptin receptor isoforms and inflammatory cytokines in placentas of obese women - Associations to birth weight and fetal sex. *Placenta.* 2022;117:64-71.
291. Catena A, Martínez-Zaldívar C, Diaz-Piedra C, Torres-Espínola FJ, Brandi P, Pérez-García M, et al. On the relationship between head circumference, brain size, prenatal long-chain PUFA/5-methyltetrahydrofolate supplementation and cognitive abilities during childhood. *British Journal of Nutrition.* 2017;122(s1):S40-S8.
292. Gohlke BC, Huber A, Bartmann P, Fimmers R, Hecher K, Bouret SG, et al. Cord blood leptin and IGF-I in relation to birth weight differences and head circumference in monozygotic twins. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM.* 2006;19(1):3-9.
293. Chiesa C, Osborn JF, Haass C, Natale F, Spinelli M, Scapillati E, et al. Ghrelin, leptin, IGF-1, IGFBP-3, and insulin concentrations at birth: is there a relationship with fetal growth and neonatal anthropometry? *Clinical chemistry.* 2008;54(3):550-8.
294. Shroff MR, Holzman C, Tian Y, Evans RW, Sikorskii A. Mid-pregnancy maternal leptin levels, birthweight for gestational age and preterm delivery. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78(4):607-13.
295. Mise H, Yura S, Itoh H, Nuamah MA, Takemura M, Sagawa N, et al. The relationship between maternal plasma leptin levels and fetal growth restriction. *Endocrine journal.* 2007;54(6):945-51.
296. Horosz E, Bomba-Opon DA, Szymanska M, Wielgos M. Third trimester plasma adiponectin and leptin in gestational diabetes and normal pregnancies. *Diabetes research and clinical practice.* 2011;93(3):350-6.
297. Henson MC, Castracane VD. Leptin in Pregnancy. *Biology of Reproduction.* 2000;63(5):1219-28.
298. Nuamah MA, Yura S, Sagawa N, Itoh H, Mise H, Korita D, et al. Significant Increase in Maternal Plasma Leptin Concentration in Induced Delivery: A Possible Contribution of Pro-inflammatory Cytokines to Placental Leptin Secretion. *Endocrine journal.* 2004;51(2):177-87.
299. Erol Koc EM, Çelik HK, Sahin D. Maternal irisin level in last trimester isolated intrauterine growth-restriction. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official*

journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet. 2022;35(14):2635-41.

300. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(1):8-15.

301. Batiha GE, Al-Kuraishy HM, Al-Maiahy TJ, Al-Buhadily AK, Saad HM, Al-Gareeb AI, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 and gestational diabetes: the causal relationship. *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):127.

302. McManus R, Summers K, de Vrijer B, Cohen N, Thompson A, Giroux I. Maternal, umbilical arterial and umbilical venous 25-hydroxyvitamin D and adipocytokine concentrations in pregnancies with and without gestational diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;80(5):635-41.

303. Staud F, Karahoda R. Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2018;105:35-40.

304. Lager S, Powell TL. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *Journal of Pregnancy*. 2012;2012(1):179827.

305. Novak D, Lehman M, Bernstein H, Beveridge M, Cramer S. SNAT Expression in Rat Placenta. *Placenta*. 2006;27(4):510-6.

306. Brugger BA, Neuper L, Guettler J, Forstner D, Wernitznig S, Kummer D, et al. Fluid shear stress induces a shift from glycolytic to amino acid pathway in human trophoblasts. *Cell & Bioscience*. 2023;13(1):163.

307. García-Contreras C, Madsen O, Groenen MAM, López-García A, Vázquez-Gómez M, Astiz S, et al. Impact of genotype, body weight and sex on the prenatal muscle transcriptome of Iberian pigs. *PloS one*. 2020;15(1):e0227861.

308. Lean SC, Heazell AEP, Dilworth MR, Mills TA, Jones RL. Placental Dysfunction Underlies Increased Risk of Fetal Growth Restriction and Stillbirth in Advanced Maternal Age Women. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9677.

309. Siragher E, Sferruzzi-Perri AN. Placental hypoxia: What have we learnt from small animal models? *Placenta*. 2021;113:29-47.

310. Wilson RL, Stephens KK, Lampe K, Jones HN. Sexual dimorphisms in brain gene expression in the growth-restricted guinea pig can be modulated with intra-placental therapy. *Pediatric research*. 2021;89(7):1673-80.

311. Venkata Surekha M, Thathapudi S, Shravanthi G, Putcha UK, Mudili SP, Gummadi S, et al. RETRACTED ARTICLE: Expression of iron transport protein Divalent metal transporter 1 (DMT1) increases in response to maternal iron deficiency anemia in near term to term placenta. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2022;35(6):1045-53.

312. Zhang Y, Lu Y, Jin L. Iron Metabolism and Ferroptosis in Physiological and Pathological Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(16):9395.

313. Meakin AS, Cuffe JSM, Darby JRT, Morrison JL, Clifton VL. Let's Talk about Placental Sex, Baby: Understanding Mechanisms That Drive Female- and Male-Specific Fetal Growth and Developmental Outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):6386.
314. Gheorghe CP, Goyal R, Holweger JD, Longo LD. Placental gene expression responses to maternal protein restriction in the mouse. *Placenta*. 2009;30(5):411-7.
315. Jin M, Xu Q, Li J, Xu S, Tang C. Micro-RNAs in Human Placenta: Tiny Molecules, Immense Power. *Molecules*. 2022;27(18):5943.
316. Gingold H, Pilpel Y. Determinants of translation efficiency and accuracy. *Molecular Systems Biology*. 2011;7(1):481.
317. Wu F, Tian F-J, Lin Y. Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. *BioMed research international*. 2015;2015(1):293271.
318. Colson A, Sonveaux P, Debiève F, Sferruzzi-Perri AN. Adaptations of the human placenta to hypoxia: opportunities for interventions in fetal growth restriction. *Human Reproduction Update*. 2020;27(3):531-69.
319. Jones HN, Jansson T, Powell TL. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297(5):C1228-35.
320. Qian Z-M, Mei Wu X, Fan M, Yang L, Du F, Yung W-H, et al. Divalent metal transporter 1 is a hypoxia-inducible gene. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(6):1596-603.
321. Shvartsman M, Bilican S, Lancrin C. Iron deficiency disrupts embryonic haematopoiesis but not the endothelial to haematopoietic transition. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6414.
322. Iolascon A, De Falco L. Mutations in the Gene Encoding DMT1: Clinical Presentation and Treatment. *Seminars in Hematology*. 2009;46(4):358-70.
323. Cleal JK, Lewis RM. Chapter 22 - The Placenta and Developmental Origins of Health and Disease. In: Rosenfeld CS, editor. *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease*. Boston: Academic Press; 2016. p. 439-61.
324. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V. Intestinal Microbial Ecology in Premature Infants Assessed with Non-Culture-Based Techniques. *The Journal of Pediatrics*. 2010;156(1):20-5.
325. Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2018;6(2):133-48.
326. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012;150(3):470-80.
327. Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, Park HT, Ghim J, Kwon Y, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Experimental & molecular medicine*. 2018;50(2):e450.

328. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(29):8787-803.
329. Luo Y, Xiao Y, Zhao J, Zhang H, Chen W, Zhai Q. The role of mucin and oligosaccharides via cross-feeding activities by *Bifidobacterium*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;167:1329-37.
330. Zhang D, Jian Y-P, Zhang Y-N, Li Y, Gu L-T, Sun H-H, et al. Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Communication and Signaling*. 2023;21(1):212.
331. Ma B, Gavzy SJ, Saxena V, Song Y, Piao W, Lwin HW, et al. Strain-specific alterations in gut microbiome and host immune responses elicited by tolerogenic *Bifidobacterium pseudolongum*. *Scientific Reports*. 2023;13(1):1023.
332. Hamada K, Isobe J, Hattori K, Hosonuma M, Baba Y, Murayama M, et al. *Turicibacter* and *Acidaminococcus* predict immune-related adverse events and efficacy of immune checkpoint inhibitor. *Frontiers in immunology*. 2023;Volume 14 - 2023.
333. Chriett S, Dąbek A, Wojtala M, Vidal H, Balcerczyk A, Pirola L. Prominent action of butyrate over β -hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Scientific Reports*. 2019;9(1):742.
334. Brandtzaeg P. Neonatal adaptation of the immune system. *Retrovirology*. 2008;5(1):L6.
335. Zhai S, Qin S, Li L, Zhu L, Zou Z, Wang L. Dietary butyrate suppresses inflammation through modulating gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *FEMS Microbiology Letters*. 2019;366(13).
336. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(8):469-82.
337. DeMartino P, Cockburn DW. Resistant starch: impact on the gut microbiome and health. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;61:66-71.
338. Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2009;14(2):66-71.
339. Hay Jr WW. Nutritional requirements of the very preterm infant. *Acta Paediatrica*. 2005;94(s449):37-46.
340. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microbial pathogenesis*. 2017;106:171-81.
341. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2017;24(7):660-72.
342. Watanabe Y, Takeuchi N, Yang J, Obana N, Morinaga K, Kusada H, et al. Complete Genome Sequence of *Atopobiaceae* Bacterium Strain P1, Isolated from Mouse Feces. *Microbiology Resource Announcements*. 2021;10(28):10.1128/mra.00627-21.

343. Li J, Li Y, Zhou Y, Wang C, Wu B, Wan J. Actinomyces and Alimentary Tract Diseases: A Review of Its Biological Functions and Pathology. *BioMed research international*. 2018;2018:3820215.
344. Kataoka H, Taniguchi M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Kuwata H. *Rothia dentocariosa* induces TNF- α production in a TLR2-dependent manner. *Pathogens and Disease*. 2014;71(1):65-8.
345. Fatahi-Bafghi M. Characterization of the *Rothia* spp. and their role in human clinical infections. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021;93:104877.
346. Nair PNR, Brundin M, Sundqvist G, Sjögren U. Building biofilms in vital host tissues: a survival strategy of *Actinomyces radicidentis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2008;106(4):595-603.
347. Anand N, Gorantla VR, Chidambaram SB. The Role of Gut Dysbiosis in the Pathophysiology of Neuropsychiatric Disorders. *Cells*. 2023;12(1):54.
348. Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System. *Frontiers in microbiology*. 2017;Volume 8 - 2017.
349. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*. 2014;16(7):1024-33.
350. Hong SH. Influence of Microbiota on Vaccine Effectiveness: "Is the Microbiota the Key to Vaccine-induced Responses?". *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2023;61(5):483-94.
351. Liu Y, Lau HC, Yu J. Microbial metabolites in colorectal tumorigenesis and cancer therapy. *Gut microbes*. 2023;15(1):2203968.

ANEXO 1

Tabla 1. Correlaciones entre la ingesta de nutrientes y las medidas antropométricas del recién nacido.

	Talla (cm) (r)	p-value	Peso (g) (r)	p-value	Perímetro cefálico (cm) (r)	p-value
Energía total (kcal)	-0.04	0.8	-0.1	0.6	-0.34	0.07
Proteína (g/día)	0.01	0.9	-0.11	0.57	-0.3	0.12
Carbohidratos (g/día)	-0.06	0.75	-0.09	0.62	-0.33	0.08
Fibra total (g/día)	-0.13	0.48	-0.04	0.85	-0.41*	0.03
Lípidos totales (g/día)	-0.09	0.63	-0.09	0.65	-0.15	0.46
AGS (g/día)	0.09	0.64	-0.15	0.44	-0.33	0.09
AGMI (g/día)	-0.07	0.72	-0.06	0.75	-0.31	0.1
AGPI (g/día)	0.04	0.83	-0.03	0.87	-0.15	0.44
Colesterol (mg/día)	-0.01	0.94	-0.13	0.5	-0.36	0.05
Sodio (mg/día)	0.02	0.92	0.08	0.68	-0.16	0.4
Potasio (mg/día)	0.05	0.79	0.01	0.95	-0.22	0.25
Calcio (mg/día)	0.15	0.43	0.21	0.27	0.06	0.74
Magnesio (mg/día)	0.04	0.81	0.06	0.77	-0.14	0.47
Hierro (mg/día)	0.03	0.89	0.02	0.89	-0.17	0.39
Zinc (mg/día)	0.17	0.36	0.21	0.26	-0.12	0.55
Fósforo (mg/día)	0.15	0.4	0.03	0.86	-0.13	0.49
Yodo (µg/día)	0.09	0.65	-0.25	0.19	0.27	0.12
Flúor (µg/día)	-0.22	0.24	-0.19	0.32	0	0.98
Cobre (µg/día)	-0.12	0.53	0.13	0.48	-0.28	0.15
Selenio (µg/día)	-0.01	0.96	0.09	0.64	-0.18	0.36
Vit. A (µeq/día)	0.09	0.62	-0.25	0.18	-0.38*	0.04

Vit. C (mg/día)	-0.13	0.49	-0.11	0.57	-0.36	0.06
Vit. E (µeq/día)	-0.22	0.25	-0.3	0.11	-0.41*	0.02
Vit. D (µg/día)	0.28	0.14	-0.04	0.83	-0.03	0.86
Vit. B1 (mg/día)	0.1	0.61	-0.03	0.86	-0.26	0.18
Vit. B2 (mg/día)	-0.01	0.95	0	0.98	-0.01	0.94
Vit B3 (mg/día)	0.01	0.95	-0.06	0.77	-0.15	0.44
Vit. B6 (mg/día)	0.01	0.95	-0.17	0.37	-0.34	0.08
Vit. B12 (µg/día)	0.26	0.17	-0.04	0.83	0.01	0.94
Ácido fólico (µg/día)	0.01	0.96	-0.04	0.81	-0.36	0.06

Los datos muestran los coeficientes y los valores p de las correlaciones de Spearman realizadas entre la ingesta de nutrientes durante el embarazo por parte de las madres y las características antropométricas del recién nacido, medidas en el día del parto (*p<0,05).