



**Universitat de les
Illes Balears**

**ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA
POLIINSATURADOS A TRAVÉS DE LA PLACENTA Y EFECTOS DE LA
SUPLEMENTACIÓN EN MUJERES EMBARAZADAS CON DIABETES
GESTACIONAL**

Autora

Leonor Rivera Soria

(Licenciada en Farmacia, 2004, Universidad de Granada)

Tutora

Isabel Lladó Sampol

Memoria del Trabajo Final de Máster

Máster Universitario en Nutrición y Alimentación Humana

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Junio 2020

Firmas

Autor

Leonor Rivera Soria

Junio 2020

Certificado

Isabel Lladó Sampol

Tutor del Trabajo

Certificado

[Nombre]

Cotutor del Trabajo

Aceptado

[Nombre]

Director del Máster Universitario en Nutrición y Alimentación Humana

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES

1.1. Ingesta dietética de grasa durante el embarazo y la lactancia

1.2. Ingestas lipídicas recomendadas durante el embarazo. Importancia de los ácidos grasos esenciales y sus derivados

1.3. Diabetes gestacional. Transferencia placentaria de ácidos grasos ω -3 en Diabetes Mellitus Gestacional

2. BIBLIOGRAFÍA

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

4. OBJETIVOS

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño del estudio

5.2. Sujetos del estudio

5.3. Recogida de muestras

5.4. Análisis a realizar

5.4.1. Análisis bioquímico

5.4.2. Análisis de ácidos grasos en los lípidos totales del suero y la placenta

5.4.3. Análisis de expresión de MFS2A en placenta mediante Western Blot

5.5. Análisis estadístico

5.6. Limitaciones del estudio

5.7. Tamaño de la muestra

6. CRONOGRAMA

7. CENTRO DE TRABAJO Y EQUIPO INVESTIGADOR

8. PRESUPUESTO

9. ANEXO

1. ANTECEDENTES

1.1 Ingesta dietética de grasa durante el embarazo y la lactancia.

El embarazo es un periodo crítico de cambios fisiológicos tanto para la madre como para el feto. A medida que la gestación avanza, van aumentando las necesidades energéticas y de nutrientes, para poder aportar al feto todos sus requerimientos nutricionales y mantener los de la madre.

El embarazo además es un estado natural de resistencia a la insulina, para garantizar el aporte de glucosa al feto. La diferencia de concentración de glucosa entre la sangre materna y la fetal, que además va aumentando a medida que avanza la gestación, posibilita este transporte de glucosa y otros nutrientes.

Con el fin de mantener un desarrollo adecuado del feto, la madre aportará al feto glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, que son transportados hasta él a través de la placenta. Existe una creciente evidencia de que factores maternos como el índice de masa corporal, ganancia de peso durante el embarazo, estilo de vida (actividad física, tabaco etc.), alteraciones metabólicas maternas, así como posibles alteraciones placentarias, afectan al crecimiento, desarrollo y salud del feto. A pesar de que no todos los mecanismos implicados se conocen con precisión, parece claro que los cambios en el transporte de nutrientes a través de la placenta, están implicados [1].

Se recomienda cubrir el aumento en los requerimientos energéticos durante el embarazo mediante un incremento de la ingesta general sobre una dieta saludable bien planificada. Sin embargo, existe un incremento en las necesidades de ciertos nutrientes esenciales para el correcto desarrollo fetal como el ácido fólico o el yodo que deben ser suplementados. Otro importante requerimiento aumentado durante el embarazo es el de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con insaturación en posición $\Omega 3$ (LC-PUFA n-3), concretamente el ácido docosahexaenoico (DHA) [2].

El crecimiento y desarrollo fetal están directamente relacionados con la capacidad de la placenta para transportar nutrientes a la circulación fetal. La estructura anatómica de la placenta evita el contacto entre la sangre materna y la fetal, por ello son fundamentales los transportadores de proteínas, el mantenimiento de los gradientes electroquímicos y los canales de difusión de nutrientes y desechos en esta interfaz.

El transporte de nutrientes y solutos a través de las diferentes capas de la placenta ocurre mediante diversos procesos que incluyen difusión simple, facilitada, mediada por proteínas, así

como procesos de endo y exocitosis. Pero principalmente ocurre mediante transportadores específicos de los que existen diferentes tipos y subtipos expresados en la placenta [3].

La capacidad de los transportadores placentarios puede variar en número, distribución y actividad influidos por varios factores. Glucosa, aminoácidos, colesterol y ácidos grasos son nutrientes fundamentales para el crecimiento fetal y cada uno atraviesa la placenta a través de transportadores específicos, actuando además la placenta en cierto modo como un “sensor” de nutrientes, constituyendo un mecanismo de control que adecúa el crecimiento fetal a la disponibilidad de nutrientes desde la circulación materna [4].

Los ácidos grasos desempeñan varios papeles fundamentales en el crecimiento fetal, incluyendo el desarrollo del sistema nervioso central y la formación del tejido adiposo, una reserva energética imprescindible para sobrevivir al parto y las primeras horas de vida. En la circulación materna los lípidos circulan en forma de triglicéridos (TG), fosfolípidos y ésteres de colesterol. Los TG no pueden atravesar la membrana placentaria, sino que deben ser degradados por lipasas de la placenta para liberar los ácidos grasos (AGL), los cuales atravesarán la placenta mediante transportadores específicos, normalmente en forma de lisofosfolípidos [5]. Estos transportadores incluyen proteínas transportadoras de AGL (FATP), AGL translocasas (FAT/CD36), proteínas de unión a AGL ancladas a la membrana plasmática (FATBPmp) y proteínas de unión a AG (FATBp). Los transportadores son proteínas integradas en la membrana que se encargan del transporte y son frecuentemente estudiados en tejido placentario porque su expresión se correlaciona con los niveles de DHA en plasma materno, cordón umbilical y fosfolípidos placentarios. La expresión y actividad de estos transportadores está influenciada por la insulina, el IGF1 y la leptina, que son hormonas implicadas en el metabolismo glucídico y por tanto, se ven alteradas en diabetes mellitus [6].

1.2. Ingestas lipídicas recomendadas durante el embarazo. Importancia de los ácidos grasos esenciales y sus derivados.

Durante el embarazo se aumentan progresivamente las necesidades energéticas hasta aproximadamente un incremento de 450 kcal/día. Como se ha mencionado antes, este incremento suele cubrirse fácilmente aumentando la ingesta en una dieta equilibrada, a la que se recomienda añadir suplementos de los micronutrientes citados.

La evidencia disponible ha puesto de manifiesto también el aumento de los requerimientos de determinados ácidos grasos. Los LC-PUFA n-3, concretamente el DHA, se deposita en grandes cantidades en el tejido nervioso durante el desarrollo fetal y la lactancia. Las rutas para

sintetizar el DHA a partir de su precursor, el ácido α -linolénico, son más activas en mujeres que en hombres. Durante el embarazo se produce un aumento del nivel de DHA en sangre materna, tanto los fosfolípidos circulantes como las membranas de los hematíes se enriquecen en DHA durante esta etapa. Este enriquecimiento no se justifica con un aumento en la ingesta, sino que más bien se corresponde con una movilización desde los depósitos adiposos maternos con el fin de aumentar la disponibilidad de DHA para transferirlo al feto, ya que la síntesis a partir de α -linolénico es limitada en la madre y casi ausente en placenta y feto.

Con el fin de cubrir estas necesidades y asegurar que no haya ningún déficit de este nutriente, la suplementación con DHA en el embarazo ha sido evaluada en distintas dosis desde 200 mg hasta 1200 mg de DHA o 1,2 – 1,7 g de LC-PUFA n-3 al día. Según un meta-análisis de estudios randomizados sobre los efectos de esta suplementación en mujeres sanas, se logró prolongar la gestación entre 1 y 6 días, y reducir la incidencia de parto prematuro previo a la semana 34 en un 31% [7]. Además, se ha comprobado que aumentar la ingesta materna de DHA proporciona un mayor aporte al feto que se puede medir en sangre de cordón umbilical. Este aumento ha demostrado en varios estudios que está asociado a beneficios en el desarrollo fetal de la agudeza visual, funciones cognitivas, madurez de los patrones de sueño, actividad motora espontánea y fenotipos inmunitarios [8,9].

Se considera adecuada una ingesta de 200 mg al día de DHA durante el embarazo y la lactancia. Esta cantidad puede obtenerse de fuentes dietéticas incrementando el consumo de pescado azul a 2 raciones a la semana. Sin embargo, este incremento de consumo de pescado azul puede incrementar el riesgo de exposición de madre e hijo a metales pesados como el mercurio que suelen acumularse en este tipo de especies. A pesar de que las cantidades que se pueden acumular no suelen superar el umbral de riesgo, es una práctica cada vez más extendida utilizar suplementos para alcanzar la dosis recomendada [10, 11,12].

1.3. Diabetes gestacional. Transferencia placentaria de ácidos grasos ω -3 en Diabetes Mellitus Gestacional.

La gestación es un estado fisiológico caracterizado por profundos cambios metabólicos dirigidos a posibilitar el desarrollo del feto. Una de estas adaptaciones en el curso natural de la gestación, es un aumento de la resistencia a la insulina progresivo que alcanza su máximo en el tercer trimestre. En respuesta a esto, las células β del páncreas producen mayor cantidad de insulina para evitar la hiperglucemia. La resistencia a la insulina que aparece durante el embarazo de forma fisiológica, puede ser debida, entre muchos factores, a la acción de hormonas como progesterona, lactógeno placentario y cortisol, ya que alteran la capacidad de

la insulina de para ejercer su acción en hígado y músculo esquelético, se postula que es con el fin de garantizar el aporte de glucosa al feto.

A pesar de esta resistencia fisiológica a la acción de la insulina, la diabetes mellitus gestacional (DMG) es una de las patologías más frecuentes en la gestación, afectando hasta el 5% de los embarazos. Se caracteriza por una alteración de la tolerancia a la glucosa que se detecta por primera vez en el embarazo y que se acompaña de una disminución de la secreción de insulina y una menor sensibilidad a la misma [13]. Esta resistencia a la acción de la insulina induce cambios en el metabolismo lipídico en la madre e incluso predisponerla para desarrolla diabetes mellitus tipo II posparto [14].

La DMG produce una serie de efectos a largo plazo que incluyen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas tanto en la madre como en el niño, y además, se asocia con alteraciones en el desarrollo neuronal fetal. Los hijos de madres con DMG padecen un menor desarrollo psicomotor a los 6 meses de edad, comparados con los hijos de madres sanas. Estas alteraciones se han reproducido en varios estudios realizados en diferentes franjas de edad durante la infancia y adolescencia, afectando a diferentes áreas del desarrollo como el lenguaje, la expresión etc. [15-17].

Los efectos negativos observados en el neurodesarrollo de niños nacidos de madres con DMG pueden ser el resultado de una disminución en la transferencia de ácidos grasos ω -3 a través de la placenta, concretamente de DHA. En condiciones normales la sangre de cordón umbilical presenta una concentración en DHA superior a la que hay en la sangre materna, sin embargo en DMG la concentración en cordón umbilical es menor que en la madre.

Wijendran y cols. observaron que en las mujeres con DMG, las membranas de los hematíes de las mujeres con DMG eran más ricas en DHA [18], sin embargo, a pesar de ello, el DHA en la sangre de cordón umbilical en los hijos nacidos de estas mujeres, la concentración de DHA era menor (-37%) que en un embarazo normal. En este estudio, el nivel materno de DHA correlacionaba directamente con el DHA en los eritrocitos fetales en las mujeres sanas, pero esta correlación no se observaba en mujeres con DMG, y además la hemoglobina glicosilada (HbA1C) se correlacionó negativamente con el contenido en DHA en lo eritrocitos fetales. Esto parece indicar que la diabetes gestacional influye negativamente en el transporte de DHA hacia el feto.

Como se ha mencionado antes, en el transporte de ácidos grasos a través de la placenta están implicadas un gran número de proteínas transportadoras: FATP, FATP-CD-36, FABP-pm y FABP [19]. En placentas de embarazos con DMG se ha observado una menor expresión de FATP subtipos 1 y 4 mientras que se encontraban aumentadas las de FATP-CD36 y FATP-6 [20].

Además de estos transportadores clásicos, en los últimos años se ha identificado una proteína denominada MFSD2A (*Major facilitator superfamily domain-containing protein 2A*) como transportador específico de DHA y se ha observado que su expresión está reducida en la placenta de embarazos con DMG. Los niveles de DHA en cordón umbilical están directamente relacionados con la cantidad de MFSD2A sugiriendo un posible mecanismo para la restricción de DHA que sufren los hijos de madres con DMG [21].

La proteína MFSD2A actúa transportando una gran variedad de ligandos, que van desde carbohidratos, aminoácidos, fármacos, aniones orgánicos y fosfolípidos. Este transportador juega un doble papel, por un lado estableciendo la barrera entre la sangre y el sistema nervioso central (BHE) y por otro, se encarga de transportar el DHA hacia ese tejido nervioso [22]. Además de en la BHE, el MFSD2A se encuentra formando parte de la estructura de la placenta y ha sido caracterizado como el principal transportador de DHA hacia la circulación fetal, y de ahí a su sistema nervioso central. En modelos animales carentes de este transportador, la descendencia presenta una severa microcefalia, alteraciones de la visión y el comportamiento y pérdida de masa neuronal en determinadas zonas del cerebro [23]. En humanos se ha observado que individuos homocigotos para mutaciones en el gen que codifica el MFSD2A presentan también severa microcefalia y daños neurológicos y cognitivos [24].

Según lo descrito anteriormente, el DHA es un nutriente crucial en el desarrollo neuronal fetal, de modo que se ha postulado si estos defectos en el desarrollo psicomotor y neurosensorial en los hijos de madres con DMG se correlacionan con las bajas concentraciones de DHA en sangre de cordón umbilical que se han observados en estos niños.

Algunos estudios han investigado los efectos de la suplementación con LC-PUFA n-3 en pacientes con DMG. La suplementación con hasta 800 mg al día no tiene efectos negativos y es capaz de incrementar DHA en sangre materna y la membrana de sus eritrocitos, pero no logró aumentar la concentración de DHA en sangre de cordón umbilical ni en membrana de eritrocitos fetales. Es posible que la DMG afecte negativamente al transporte de DHA por un mecanismo independiente de la concentración de DHA en sangre materna [25,26].

En este estudio queremos comprobar si la DMG altera efectivamente el transporte de DHA hacia el feto y si dicha alteración está relacionada con cambios en la expresión placentaria de MFSD2A. Paralelamente queremos ensayar si una suplementación materna de DHA en dosis elevadas puede inducir la expresión de MFSD2A en placenta y si con ello se logra aumentar el transporte del nutriente al feto.

2. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Brett, K.E., Ferraro, Z.M., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A., Adamo, K.B. Maternal–Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 16153-16185.
- [2] Koletzko, B., Cetin, I., Brenna, J.T. for the Perinatal Lipid Intake Working Group. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. Consensus statement. *British Journal of Nutrition* (2007), 98, 873–877.
- [3] Larque, E.; Ruiz-Palacios, M.; Koletzko, B. Placental regulation of fetal nutrient supply. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2013, 16, 292–297.
- [4] Jansson, T.; Powell, T.L. IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: Does the placenta function as a nutrient sensor?—A review. *Placenta* 2006, 27, S91–S97.
- [5] Duttaroy, A.K. Transport of fatty acids across the human placenta: A review. *Prog. Lipid Res.* 2009, 48, 52–61.
- [6] Larque, E.; Demmelmair, H.; Klingler, M.; de Jonge, S; Bondy, B.; Koletzko, B. Expression pattern of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), FATP-4 and heart-fatty acid binding protein (H-FABP) genes in human term placenta. *Early Hum. Dev.* 2006, 82, 697–701.
- [7] Szajewska H, Horvath A & Koletzko B. Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 83, 1337–1344. 14. Makrides M, Duley L & Olsen SF (2006)
- [8] Cheruku SR, Montgomery-Downs HE, Farkas SL, Thoman EB & Lammi-Keefe CJ (2002) Higher maternal plasma docosahexaenoic acid during pregnancy is associated with more mature neonatal sleep-state patterning. *Am J Clin Nutr* 76, 608–613. 18.
- [9] Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD & Drevon CA (2003) Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children’s IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 111, e39–e44.
- [10] European Food Safety Authority (2007) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food (Request N8 EFSA-Q-2003-030, February 2004). *The EFSA Journal* 34, 1–14.
- [11] Zhang, Z., Fulgoni, V., Kris-Etherton, PM., Mitmesser, S.H. Dietary Intakes of EPA and DHA Omega-3 Fatty Acids Among US Childbearing-Age and Pregnant Women: An Analysis of NHANES 2001-2014. *Nutrients.* 2018 28; 10(4): 416.

- [12] M. Innis, S.M. Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. American Society for Nutrition. *J. Nutr.* 137: 855–859, 2007.
- [13] Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes Care* 30: S105–S111, 2007.
- [14] Rizzo T, Metzger BE, Burns WJ, Burns K. Correlations between antepartum maternal metabolism and intelligence of offspring. *N Engl J Med* 325: 911–916, 1991.
- [15] Zornoza-Moreno, M., Fuentes-Hernandez, S., Carrion, V., Alcantara-Lopez, M.V., Madrid, J.A., Lopez-Soler, C., Sanchez-Solis, M., Larque, E. Is low docosahexaenoic acid associated with disturbed rhythms and neurodevelopment in offsprings of diabetic mothers? *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014, 68, 931–937.
- [16] Ornoy, A.; Wolf, A.; Ratzon, N.; Greenbaum, C.; Dulitzky, M. Neurodevelopmental outcome at early school age of children born to mothers with gestational diabetes. *Arch. Disease Child. Fetal Neonatal Ed.* 1999, 81, F10–F14.
- [17] Dahlquist, G.; Kallen, B. School marks for Swedish children whose mothers had diabetes during pregnancy: A population-based study. *Diabetologia* 2007, 50, 1826–1831.
- [18] Wijendran, V.; Bendel, R.B.; Couch, S.C.; Philipson, E.H.; Cheruku, S.; Lammi-Keefe, C.J. Fetal erythrocyte phospholipid polyunsaturated fatty acids are altered in pregnancy complicated with gestational diabetes mellitus. *Lipids* 2000, 35, 927–931.
- [19] Gil-Sanchez, A.; Koletzko, B.; Larque, E. Current understanding of placental fatty acid transport. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2012, 15, 265–272.
- [20] Segura, M.T.; Demmelmair, H.; Krauss-Etschmann, S.; Nathan, P.; Dehmel, S.; Padilla, M.C.; Rueda, R.; Koletzko, B.; Campoy, C. Maternal BMI and gestational diabetes alter placental lipid transporters and fatty acid composition. *Placenta* 2017: 57, 144–151.
- [21] Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*. 2014 May 22; 509(7501):503-6.
- [22] Prieto-Sanchez, MT., Ruiz-Palacios, M., Blanco-Carnero, J.E., Pagan A., Hellmuth C, Uhl O, Peissner W, Ruiz-Alcaraz, A.J., Parrilla JJ, Koletzko B, Larqué, E. Placental MFSD2a transporter is related to decreased DHA in cord blood of women with treated gestational diabetes. *Clinical Nutrition* 36 (2017) 513e521.
- [23] Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, et al. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*. (2014) 509:503–6. doi: 10.1038/nature13241.

[24] Guemez-Gamboa A, Nguyen LN, Yang H, Zaki MS, Kara M, Ben-Omran T, et al. Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome. *Nat Genet.* (2015) 47:809–13.

[25] Jamilian, M., Samimi, M., Kollahdoz, F., Khalaji, F., Razavi, M., Asemi, Z. Omega-3 fatty acid supplementation affects pregnancy outcomes in gestational diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Matern. -Fetal Neonatal Med.* 2016, 29, 669–675.

[26] Samimi, M., Jamilian, M., Asemi, Z., Esmailzadeh, A. Effects of omega-3 Fatty Acid Supplementation on Insulin Metabolism and Lipid Profiles in Gestational Diabetes: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Nutr.* 2015 Jun; 34(3):388-93.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es necesario conocer si la DMG altera el transporte de DHA hacia el feto y si dicha alteración está relacionada con cambios en la expresión placentaria de su transportador más específico, el MSF2A. Si esto es así, es necesario buscar una alternativa terapéutica para evitar que los hijos de madres diabéticas padezcan el déficit de DHA. Una suplementación lo suficientemente elevada como para inducir cambios en la expresión del transportador es una posible vía para conseguirlo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal.

Evaluar la transferencia placentaria de DHA en pacientes embarazadas y con diabetes gestacional y su posible tratamiento con suplementación.

4.2. Objetivos secundarios.

4.2.1. Determinar si en el mecanismo responsable de la disminución de la transferencia de DHA al feto está implicada una disminución de la expresión del transportador MFS2A.

4.2.2. Determinar si la suplementación reforzada con dosis elevadas de DHA (1200 mg/día) es capaz de corregir el déficit nutricional del feto.

4.2.3. Determinar si se producen cambios en la expresión del transportador MFS2A (inducción) con dicha suplementación.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño del estudio.

Ensayo clínico prospectivo. El proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Investigación Biosanitaria de la Universidad de Murcia Durante 2 años (Mayo 2020 – Mayo 2022) en colaboración con el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

5.2. Sujetos del estudio.

El estudio se llevará a cabo en mujeres embarazadas que se realicen el seguimiento de la gestación en el Servicio de Ginecología y que sean diagnosticadas de diabetes gestacional en la semana 20 según el test de O'Sullivan.

- **Criterios de inclusión:**

1. Edad comprendida entre 18 y 40 años
2. Gestación única
3. No fumadoras
4. Ecografía doppler normal en la semana 20 de gestación

- **Criterios de exclusión:**

1. Pacientes con diabetes pregestacional
2. Pacientes en tratamiento crónico con fármacos
3. Pacientes con suplementación previa al reclutamiento

5.3. Recogida de muestras.

Se reclutarán para el estudio aquellas pacientes que cumplan los criterios anteriormente expuestos de forma no randomizada y consecutiva, según acudan al control de la gestación en el que se realiza el screening de tolerancia a la glucosa (Test O'Sullivan). Para participar deberán firmar un consentimiento informado. El estudio deberá ser aprobado por el Comité de Ética del Hospital y adherido a la última actualización de los principios de la Declaración de Helsinki de la Organización Mundial de la Salud.

Se considera un resultado positivo si transcurrida 1h desde la ingestión de una solución con 50 g de glucosa, la glucemia de la paciente es > 140 mg/dL. Tras este resultado positivo, se realiza

una curva de confirmación en la que se administra una solución oral de 100 g de glucosa y se toman 3 muestras separadas entre sí por espacio de 1h (cuatro muestras en total teniendo en cuenta la glucemia basal en ayunas). Este test se considera positivo si dos o más de los 4 puntos supera los siguientes límites: Basal > 95 mg/dL; 1h > 190 mg/dL; 2h > 165 mg/dL y 3h > 145 mg/dL, de acuerdo con los criterios de *National Diabetes Data Group*. El control metabólico de las pacientes con DMG se realizará en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital de referencia.

Se realizarán medidas antropométricas tanto a la madre como al recién nacido. Se medirá de la madre el peso, la altura, y en el momento del parto, la presión arterial. Se le proporcionará a la madre un cuestionario de hábitos nutricionales, para conocer si existen desviaciones muy pronunciadas y para conocer la frecuencia de consumo de pescado. También se les preguntará por el peso pregestacional y se comparará con el peso en el momento del parto.

En la semana 38 del embarazo se realizará una medida antropométrica del feto mediante scanner de ultrasonido. Los parámetros a determinar son el diámetro biparietal, cefálico, circunferencia abdominal y longitud del fémur. En el momento del nacimiento también se tomaron medidas antropométricas del neonato (longitud, peso, circunferencia abdominal y perímetro craneal).

En el momento del parto se extraerán 10 ml de sangre materna y 2 ml de sangre del cordón umbilical. Se separará el suero mediante centrifugación y se alicuotará y se congelará a -80°C para los diferentes análisis.

La placenta se extraerá tras el parto y se pesará, posteriormente se tomarán muestras del tejido que también serán conservadas a -80°C para su posterior análisis.

5.4. Análisis a realizar.

5.4.1. Análisis bioquímico.

Los parámetros bioquímicos se determinarán en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca, y serán los siguientes:

- Insulina. Mediante electroquimioluminiscencia
- Resistencia a la insulina se calculará mediante el modelo $HOMA_{IR}$ (Glucemia en ayunas x Insulinemia en ayunas/ 22.5)
- Glucosa, colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos se determinarán por espectrofotometría en autoanalizadores modulares Roche Hitachi.

5.4.2. Análisis de ácidos grasos en los lípidos totales del suero y la placenta.

- En la placenta y en los sueros de sangre materna y de sangre de cordón umbilical se determinará la cantidad total de ácidos grasos mediante espectrofotometría y el perfil de estos ácidos tras su completa extracción y separación, será analizado mediante cromatografía de gases.
- Los lisofosfolípidos (fosfolípidos de los que se ha liberado uno de los ácidos grasos, forma principal en la que se transportan a través de la placenta) se determinarán por espectrometría de masas.

5.4.3. Análisis de expresión de MFS2A en placenta mediante Western Blot.

- Se realizará una extracción de proteínas del cual se tomará una cantidad fija (30 µg) para realizar la técnica de western blot.

5.5. Análisis estadístico.

Los resultados se expresarán como media \pm desviación estándar de la media. El tamaño mínimo de la muestra para obtener diferencias significativas debe ser de 20 sujetos por grupo. Las diferencias entre los grupos control, los grupos con DMG y con DMG suplementada serán evaluadas mediante tests ANOVA, seguido de test Bonferroni. Los datos con distribución normal se tratarán según el test Shapiro-Wilk. También se aplicará la correlación de Pearson. Para la aplicación de estos tests estadísticos se utilizará el software SPSS16.0. El nivel de significación estadística se considerará con una $p < 0.05$.

5.6. Limitaciones del estudio.

- Posible dificultad para reclutar pacientes para el estudio, tanto para el grupo que no se va a suplementar, como el que lo hará con la dosis propuesta.
- Posible incumplimiento de la suplementación.
- Posibles desviaciones importantes en el patrón alimentario no declaradas o no detectadas en los cuestionarios periódicos.
- Posible pérdida de pacientes del estudio por parto prematuro.

Interpretación de los datos y elaboración de comunicaciones/conclusiones del estudio

| | JUN | JUL | AGOST | SEPT | OCT | NOV | DIC | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY |
|-------|-----|-----|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AÑO 1 | | | | | | | | | | | | |
| AÑO 2 | | | | | | | | | | | | |

7. CENTRO DE TRABAJO Y EQUIPO INVESTIGADOR

En ensayo se coordinará y gestionará desde el Laboratorio de Investigación biomédica de la universidad de Murcia en colaboración con los servicios de Ginecología y Obstetricia y Análisis Clínicos del Hospital general Universitario Virgen de la Arrixaca, con 863 camas, compuesto por un pabellón general, uno materno-infantil, y otro de consultas de especialidades y que es centro de referencia para el seguimiento de los embarazos de 2/3 de la población de la Región de Murcia.

7.1. Distribución de tareas del equipo investigador.

Investigadora principal: Dra. María Teresa Prieto Sánchez, especialista en Ginecología y Obstetricia y profesora adjunta de la Universidad de Murcia. Se encargará de la coordinación del proyecto, selección y control de las pacientes para el estudio y colaboración en la elaboración de comunicaciones y posterior publicación.

Resto de grupo investigador: Dra. Leonor Rivera Soria, especialista en Análisis Clínicos: responsable de establecer un calendario predeterminado de visitas/pruebas para cada paciente, parámetros nutricionales, determinación de parámetros analíticos por las diferentes técnicas citadas, elaboración del cuaderno de recogida de datos, construcción y desarrollo de la base de datos, análisis estadístico de los datos, interpretación de resultados, y elaboración de comunicaciones y artículos.

8. PRESUPUESTO

8.1. Recursos disponibles sin coste adicional para el proyecto.

- Instalaciones hospitalarias y del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas (LAIB)
- Instrumentación de laboratorio:
 - Laboratorio de Bioquímica Automatizada con analizadores modulares Hitachi (Roche).
 - Laboratorio de investigaciones biomédicas con instrumentos para la realización de western blot (BioRad)
 - Material de laboratorio: Centrífugas, congeladores -20°C y -80°C, tubos de muestra, pipetas, material estéril.
- Consultas del Servicio de Ginecología y Obstetricia
 - Material de consulta: Báscula, tallímetro, cinta métrica, tensiómetro.
 - Ecógrafo y eco-doppler
- Paritorios
- Personal habitual del Servicio de Análisis Clínicos, Ginecología y Obstetricia y técnicos del LAIB.

8.2. Recursos que generan coste a cargo del proyecto.

- Reactivos necesarios para las determinaciones a realizar:
 - Reactivos de bioquímica automatizada ----- 600€
 - Anticuerpo primario para la detección de MFS2A ----- 1200€
 - Anticuerpo secundario ----- 80 €
 - Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases ----- 840 €
 - Análisis de lisofosflípidos por espectrometría de masas ----- 1500€
- Honorarios investigador principal y coordinador ----- 22500 €/año
- Honorarios especialista colaborador en investigación ----- 20800€/año

9. ANEXO

9.1. Modelo de consentimiento informado

Título del estudio: Estudio del transporte de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados a través de la placenta y efectos de la suplementación en mujeres embarazadas con diabetes Gestacional.

Nombre y contacto del Investigador Principal: Dra. María teresa Prieto Sánchez. E-mail: mt.prieto@um.es

Nombre, dirección del Patrocinador: Universidad de Murcia, Avda. Teniente Flomesta 5, 30003 (Murcia).

Sitio donde se realizará el estudio: Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la universidad de Murcia y Hospital general Universitario Virgen de la Arrixaca.

A) Hoja de información:

Le estamos pidiendo que participe de un estudio de investigación porque presenta diabetes mellitus gestacional. Este tipo de estudios se realiza para poder saber más sobre su enfermedad y así poder encontrar mejores tratamientos para paliar el impacto de esta sobre la salud de su bebé.

Su participación es completamente voluntaria; si no desea hacerlo su médico continuará con su atención habitual y su negativa no le traerá ningún inconveniente.

Lea toda la información que se le ofrece en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de tomar una decisión. También lo alentamos a consultarlo con su familia, amigos y médicos de cabecera.

La Dra. Prieto Sánchez será quien dirija el estudio y la Universidad de Murcia (será quien lo financie).

RECUERDE QUE ESTE NO ES UN TRATAMIENTO APROBADO, SINO QUE SE TRATA DE UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

1) ¿Por qué se realiza este estudio?

El propósito de esta investigación es conocer si la suplementación con ácidos grasos esenciales para el desarrollo del sistema nervioso del feto es efectiva para cubrir el déficit que se ha observado en embarazos con diabetes gestacional.

2) ¿Cuántas personas participarán y de dónde se las seleccionará?

Se piensa incluir en el estudio alrededor de 100 personas del Area I del Servicio Murciano de Salud.

3) ¿Qué se sabe de esta droga/este estudio/este aparato?

El ácido graso a suplementar es el ácido docosahexaenóico (DHA), un nutriente importante durante la gestación ya que es depositado en grandes cantidades en el sistema nervioso del feto y es necesario para su correcto desarrollo. Un posible déficit de DHA provocado por la diabetes gestacional puede provocar diferentes carencias a nivel neurológico. En este estudio se pretende ver si una suplementación con dosis elevadas de DHA es eficaz para cubrir este posible déficit, ya que la suplementación a dosis estándar ha fallado.

4) ¿Qué debo hacer si acepto participar?

Si Ud. acepta participar en el estudio, lo primero que debe hacer es firmar este Consentimiento Informado. Luego, se le harán exámenes para ver si presenta todas las condiciones necesarias para ser incluido:

- Preguntas sobre sus antecedentes médicos
- Un examen físico: se le tomará la presión arterial, se lo pesará
- Pruebas de sangre: Glucosa, insulina, perfil lipídico
- Pruebas en sangre de cordón umbilical tras el parto
- Biopsia de placenta tras el parto

Si es incorporado al estudio, Ud. deberá cumplir con las siguientes indicaciones:

- Acudir a sus controles rutinarios del embarazo, en los que se le hará un cuestionario sobre costumbres alimenticias.
- Se le proporcionará el suplemento con un placebo (comprimido sin DHA) para que lo tome diariamente durante la segunda mitad de la gestación.
- No existe evidencia de riesgo para usted o su bebé por la administración de este suplemento.
- Usted no sabrá si toma el suplemento o el placebo.
- Si usted quiere tomar otros suplementos no podrá participar en el estudio.
-

5) ¿Cuánto tiempo deberé permanecer en el estudio?

Desde la mitad de la gestación hasta el parto.

6) ¿Qué harán con mis muestras biológicas (tejido/células/sangre)? ¿Cuánto tiempo las almacenarán? ¿Qué harán con ellas luego de finalizado el estudio?

El almacenamiento de muestras biológicas se autorizará sólo para el objetivo del presente estudio. Cualquier otro uso posterior, salvo que las muestras sean anónimas, requerirá un nuevo Consentimiento Informado por parte del participante.

7) ¿Todos los participantes recibiremos la misma droga/utilizaremos el mismo aparato en estudio? No

Para ensayos clínicos aleatorizados, controlados:

Habitualmente, para ver los efectos de la suplementación en estudio, se utilizan grupos de participantes:

Grupo 1: recibirá 1200 mg de DHA

Grupo 2: recibirá un placebo sin actividad

Se decidirá al azar (como tirando una moneda al aire) a qué grupo pertenecerá usted. Esto se hace para obtener datos confiables de los resultados del estudio. Ni Ud. ni el investigador sabrán a qué grupo fue asignado

El placebo es una sustancia sin efecto específico sobre su enfermedad, se parece a la droga en estudio pero no tiene su efecto. El investigador lo utiliza para poder evaluar con más precisión el resultado de la suplementación en estudio. Ud. Tiene un 50% de probabilidad de estar en la rama con placebo. Si es así, Ud. no tendrá ningún daño por recibir placebo; sin embargo, no tendrá el beneficio potencial que la droga en estudio podría tener.

8) ¿Qué otras opciones tengo para tratar mi enfermedad, si decido no participar en este estudio de investigación?

El tratamiento de la diabetes será controlado por su especialista. El tratamiento del déficit de DHA puede ser sustituido por una dieta rica en este ácido graso, por ejemplo rica en pescado azul, aunque la evidencia disponible no muestra que se alcancen dosis elevadas recurriendo sólo a la dieta.

9) ¿Qué riesgos tendré si participo del estudio?

No se esperan riesgos, ya que se trata de un suplemento nutricional y la sustancia a administrar no ha presentado toxicidad a dosis mayores en estudios previos.

9.a) Riesgos maternos relacionados con los procedimientos del estudio.

No hay exposición a riesgos adicionales a las pruebas rutinarias de control del embarazo

9.b) Riesgos para el feto:

No se esperan riesgos para el feto puesto que lo que se administra es un nutriente en dosis menor a otras que probado no ser tóxicas en estudios anteriores.

10) ¿Qué pasará si sufro algún evento adverso mientras participo en el estudio?

La Universidad de Murcia será responsable de los daños que usted pueda sufrir en su salud como consecuencia de su participación en el estudio. Si durante el transcurso del mismo usted sufre un daño físico, una lesión o una consecuencia en su salud relacionada con el suplemento, se le proveerá toda la asistencia médica inmediata y necesaria para su tratamiento.

Si esto ocurriera, comuníquese de inmediato con el médico del estudio, quien le dirá cómo debe proceder.

La Universidad de Murcia ha contratado un seguro para la cobertura de dichos daños. Con la firma de este consentimiento informado usted no renuncia a los derechos que posee de acuerdo con el Código Civil y las leyes españolas en materia de responsabilidad por daños.

11) ¿Puedo abandonar el estudio en cualquier momento?

Usted es libre de retirar su consentimiento para participar en la investigación en cualquier momento sin que esto lo perjudique en su atención médica posterior; simplemente deberá notificar al investigador de su decisión.

Una vez revocado el consentimiento, no se podrán obtener datos sobre usted y su salud, pero toda la información obtenida con anterioridad sí será utilizada.

Si durante el estudio hay información nueva que pueda ser relevante y pueda provocar que usted desee abandonar el estudio, se le hará saber lo antes posible.

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial como lo exige la Ley. Usted no podrá ser identificado salvo para quienes estén autorizados a acceder a sus datos personales. Para su identificación en el estudio se le asignará un código numérico.

En caso de que los resultados de este estudio sean publicados en revistas médicas o presentados en congresos médicos, su identidad no será revelada.

Las personas autorizadas al acceso a sus datos, serán aquellos que forman parte del estudio, el Investigador Principal y el equipo de investigación tendrán acceso a los resultados de sus estudios, como las pruebas de laboratorio y estudios de imágenes.

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas).

- He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.
- He quedado satisfecha con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.
- Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al médico responsable del estudio.

Firma, aclaración, número de documento del sujeto y fecha.