



**UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGÍA REGENERATIVA Y NUEVAS TERAPIAS**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE microRNAs, ADIPOQUINAS Y CITOQUINAS
CIRCULANTES EN LA DIABETES GESTACIONAL Y SU MODIFICACIÓN CON
DIETA MEDITERRÁNEA A LOS DOS -TRES AÑOS POSTPARTO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Autor:

Johanna Josefina Valerio Deogracia

DIRECTOR: Alfonso L. Calle Pascual

CODIRECTORA: Ana Barabash Bustelo

CODIRECTORA: Nuria García de la Torre Lobo

Madrid, 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento de esta tesis, al Prof. Alfonso L. Calle P, la Dra. Nuria García de la Torre Lobo y la Dra. Ana Barabash, por la oportunidad de trabajar en este hermoso proyecto, por el apoyo y la enseñanza diaria. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al laboratorio.

A mi Tutora de tesis, la Dra. María Rosario Baquero Artiga, por su disposición.

A la Dra. Elena Bordiú, muchas gracias por tus enseñanzas profesionales, tu buena disposición y paciencia. Gracias por los gratos momentos en los cafecitos.

A la Dra. Carla Assaf Balut, gracias por el cariño mostrado en tu trabajo, por la buena disposición y por ser tan profesional.

Al Dr. José Antonio Cabranes, por su apoyo y por transmitir tanta pasión y rigor en cuanto al trabajo y la investigación.

A mis compañeras del laboratorio: María Ortiz, Laura del valle, Angelica Larrad, Verónica Melero, Dra. Macarena Torrego, por el apoyo, amabilidad y buen compañerismo en todo momento.

A todo el equipo del servicio de Endocrinología y Nutrición.

A las enfermeras del laboratorio de pruebas funcionales, Victoria Sáez de Parpayuelo.

A las doctoras Gema Hernández, Pilar Matías por su buen trabajo y cariño en el día a día.

A mi Madre María Deogracia por tu gran apoyo en cada momento de mi vida, por la enseñanza de la honestidad, respeto y el trabajo duro. Por darme tanto sin tener nada muchas gracias por ser una madre ejemplar.

A mis hermanas. Yosep María y Leidy María, por ser tan buenas hermanas y amigas. Por el apoyo incondicional, las risas y canciones que alegran el alma.

A mi cuñado Devon por su apoyo.

A mi esposo Alejandro por el apoyo, cariño y paciencia en este camino.

A mis hijas Rut y Paula por cambiar mi vida llenándome de tanto amor y hacerme querer ser mejor persona cada día.

A mi Sobrina Genesis por tu cariño, y esa sonrisa llena de ternura y amor.

A la familia Del Barrio Puerta en especial a mis Suegros Javier y Rosa por abrirme las puertas de su hogar con tanto cariño y tratarme como a una hija.

A la familia del Barrio Yesa: Marisa, Maripi, Begoña y David, Fernando y Rosaura, Ángel Luis, gracias por el apoyo, el cariño y acompañarme en este proyecto con los buenos momentos y comiditas ricas.

ÍNDICE

Contenido

1	Introducción.....	14
1.1	Definición de Diabetes Mellitus Gestacional	15
1.2	Prevalencia de la Diabetes Mellitus Gestacional	20
1.3	Factores de riesgo de Diabetes Mellitus Gestacional	21
1.4	Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Gestacional.....	21
1.4.1	Papel de la placenta.....	21
1.4.2	Resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus Gestacional	24
1.4.3	Leptina y Diabetes Mellitus Gestacional.....	26
1.4.4	Adiponectina y Diabetes Mellitus Gestacional	30
1.4.5	Citoquinas y Diabetes Mellitus Gestacional: TNF alfa e Interleuquina 6. ..	34
1.5	microRNAs y Diabetes Mellitus Gestacional.....	36
1.5.1	miR-29a-3p.....	40
1.5.2	miR-222-3p.....	42
1.5.3	miR-132-3p.....	44
1.5.4	miR-103a-3p.....	44
1.6	Dieta Mediterránea y DMG.....	45
1.6.1	Aceite Oliva Virgen Extra.....	46
1.6.2	Pistachos	47
2	Hipótesis y objetivos	49
2.1	Hipótesis:	50
2.2	Objetivos	50
2.2.1	Objetivo general:	50
2.2.2	Objetivos específicos:	50
3	Metodología.....	52
3.1	Ámbito y Diseño del estudio.....	53
3.2	Tamaño Muestral	53
3.3	Sujetos	54
3.4	Intervención	56
3.5	Variables.....	58
3.5.1	Datos Demográficos.....	58
3.5.2	Datos clínicos.....	59
3.5.3	Evaluación del estilo de vida	59
3.5.4	Recogida de muestras y mediciones bioquímicas.....	60
3.5.5	Análisis de adipocinas, citoquinas e insulina:	61
3.5.6	Aislamiento y análisis de miRNAs:.....	62
3.6	Análisis estadístico.....	67
4	Resultados.....	69
4.1	Análisis descriptivo y comparaciones entre las variables sociodemográficas, clínicas y bioquímicas entre grupos en la visita-1	70
	(8-12 SG)	70

4.2	Modificaciones en las puntuaciones de estilo de vida a lo largo de las tres visitas	73
4.3	Comparaciones clínicas y bioquímicas entre de DMG y TNG, según pertenezcan al grupo control o de intervención, en las visitas 2 (62) y 3 (2-3 años PP)	74
4.4	Correlaciones.....	90
5	Discusión.....	92
5.1	Limitaciones y fortalezas.....	104
6	Conclusiones	106
	Referencias Bibliográficas	109
	Anexos	126

ABREVIATURAS

Adipo Q	Adiponectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGO2	Argonauta 2
AMPK	Activador proteína kinasa
ARN	Ácido ribonucleico
AOVE	Aceite oliva virgen Extra
APO	Apolipoproteína A1 ò B
CAV-1	Caveolina 1
CHr	Cromosoma
Ct	Ciclos de umbral
DietMed	Dieta Mediterránea
DMT2	Diabetes Mellitus TIPO2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
ERα	Receptor de Estrógeno Alfa
GC	Grupo control
GI	Grupo intervención
GLUT4	Transportador de glucosa 4
Grb2	Growth factor receptor- bound protein
GSK3	Proteína cinasa de la glucógeno sintetasa 3
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HAP	Hiperglicemia y resultados adversos del embarazo
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMA	Evaluación del modelo homeostático
HPL	Hormona de lactógeno placentario

IADPSG	Asociación de diabetes y grupo de estudio de embarazo
IGF1	Factor de crecimiento a la insulina -1
IMC	Índice de masa corporal
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
INSR	Receptor de insulina
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
Kda	Kilodalton
Mct1	Monocarboxilato-1
miRNA	Ácido ribonucleico pequeño
miR	Ácido ribonucleico pequeño
MS2	Fago de Escherichia virus MS2
mTOR	Mammalia Target of Rapamycin
MPFU	Unidad materno fetal de la placentaria
MUFA	Ácido graso monoinsaturado
Nt	Nucleótidos
NTR	Receptor transportador nuclear
PCR	Reacción en cadenas de la polimerasa
PDK	Piruvato deshidrogenasa quinasa
PGH	Hormona de crecimiento placentario
PIH	Hipertensión inducida
PI3K	Proteína 1 dependiente fosfoinositida 3 quinasa
PkC	Proteína quinasa C
PKB	Proteína quinasa B
POLII	Polimerasa II
PPAR-α	Receptor alfa del proliferador de peroxisomas
PP	Postparto
PTOG	Prueba tolerancia oral a la glucosa
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RaTNGP	Complejo Ran unida a GTP
RI	Resistencia a la insulina
RISC	Complejo de silenciarían del ácido ribonucleico
RTPCR	Retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa
SFRP4	Proteína 4 relacionada al frizzled
SG	Semana de Gestación
SOS	Son of seevenless
TNG	Tolerancia normal a la glucosa
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
Tyr	Tirosina quinasa
URT	Región no traducida
XPO5	Exportina 5

Resumen

Se ha demostrado que una intervención basada en una DietMed (Dieta Mediterránea) suplementada con aceite de oliva virgen extra (AOVE) y frutos secos reduce la incidencia de la DMG (Diabetes Mellitus Gestacional). Existe un interés creciente por encontrar nuevos marcadores con potencial utilidad diagnóstica y terapéutica en la DMG. Entre estos marcadores se encuentran los microRNAs (miRNAs), los biomarcadores inflamatorios y las adipoquinas. Se ha descrito que algunos miRNAs participan en el control glucémico regulando la expresión de genes como el INIG1 o el transportador de glucosa 4 (GLUT4) entre otros. La relevancia de la expresión de miRNAs durante la gestación y su modulación a través de la dieta es primordial ya que la dieta puede provocar variaciones en la programación epigenética, activando o silenciando la expresión de los genes. Aunque esto es así, los datos sobre la expresión de miRNAs y su relación con la DMG y la dieta son escasos y controvertidos.

El objetivo de este estudio fue investigar si existe un perfil en suero de adipoquinas (Adiponectina, Leptina), citoquinas (tumor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6)) y miRNAs circulantes (miR-222-3p, miR-103a-3p, miR-29a-3, miR-132-3p) relacionado con la aparición de DMG y con la regulación de la glucosa a los 2-3 años post parto y si este perfil puede modificarse mediante una intervención nutricional basada en la dieta mediterránea.

Metodología

Se utilizaron muestras de suero de 313 gestantes del estudio de prevención de la diabetes gestacional llevado a cabo en el Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico San Carlos. Se compararon, 77 con DMG frente a 236 con tolerancia normal a la glucosa

(TNG), 141 del grupo de control (GC, MedDiet restringiendo el consumo de grasa dietética incluyendo AOVE y frutos secos durante el embarazo) frente a 172 del grupo de intervención (GI, MedDiet suplementada con aceite de oliva virgen extra (AOVE) y pistachos durante el embarazo) en la visita-1 (8-12 SG), visita-2 (24-28 SG) y visita-3 (2-3 años PP). La expresión de miRNA se determinó mediante el sistema Exiqon miRCURY LNA RT-PCR. La leptina, la adiponectina, la IL-6 y el TNF- α se midieron mediante inmunoensayos Milliplex® en Luminex 200 y la insulina mediante RIA.

Resultados

Las mujeres con DMG frente a TNG tenían niveles significativamente más altos de leptina [mediana (Q1-Q3)] [14,6 (9,2-19,4) vs 9,6 (6,0-15,1) ng/mL; $p < 0,05$]] y de insulina [11,4 (8,6-16,5) vs 9,4 (7,0-12,8) μ UI/mL; $p < 0,001$]], y menores adiponectina [12,9 (9,8-17,2) vs 17,0 (13,3-22,4) μ g/mL; $p < 0,05$]], en la visita-2. Estos hallazgos persistieron en la visita -3, junto con una sobreexpresión del miR-222-3p [1,45 (0,76-2,21) vs 0,99 (0,21-1,70); $p < 0,05$]] y niveles superiores de IL-6 y TNF- α . Al comparar el GI con el GC se observaron menores niveles de insulina, HOMA-IR e IL-6 en la visita 2 y 3 y de leptina sólo en la visita-2. También se observó una sobreexpresión de miR-222-3p y miR-103a-3p en el GI en la visita 2 y 3. La expresión de miR-222-3p y miR- 103a-3p se correlacionó con los niveles de insulina, HOMA-IR, IL-6 y TNF- α en la visita-2 (todos $p < 0,05$). Las diferencias encontradas en el GI parecen ser a expensas del efecto de la intervención en el grupo TNG. Estos datos respaldan la asociación de leptina, adiponectina e insulina/HOMA-IR con DMG, así como la asociación de insulina / HOMA-IR e IL-6 y la expresión de miR-222-3p y miR-103a-3p con una intervención nutricional basada en la DietMed.

Summary

An intervention based on a Mediterranean Diet (DietMed) supplemented with extra virgin olive oil and nuts has been shown to reduce the incidence of DMG. There is increasing interest in understanding the pathophysiology of GDM, to find biochemical markers with potential diagnostic and therapeutic utility. These markers include miRNAs, inflammatory biomarkers and adipokines. The role of miRNA expression during gestation and its modulation by diet may play a pivotal role in the onset of GDM and glucose regulation as diet may cause variations in epigenetic programming. However, data on miRNA expression and its relationship with GDM and diet are scarce and controversial.

The aim of this study was to investigate whether there is a serum profile of adipokines (Adiponectin, Leptin), cytokines (factor necrosis tumour (TNF- α), interleukin 6 (IL-6)) and circulating miRNAs (miR-222-3p, miR-103a-3p, miR-29a-3, miR-132-3p) related to GDM onset and to glucose regulation at 2-3 years postpartum and whether this profile can be modified by a nutritional intervention based on the Mediterranean diet.

Methods

313 pregnant women, 77 with GDM vs 236 with normal glucose tolerance (NGT), 141 from Control Group (CG, MedDiet restricting the consumption of dietary fat including EVOO and nuts during pregnancy) vs 172 from Intervention Group (IG, MedDiet supplemented with extra virgin olive oil (EVOO) and pistachios during pregnancy) were compared at visit 1 (8-12 GW), visit 2 (24-28 GW) and visit 3 (2-3 years PD). Expression of miRNAs was determined by Exiqon miRCURY LNA RT-PCR system. Leptin, adiponectin, IL-6 and TNF- α , were measured by Milliplex® immunoassays on Luminex 200 and insulin by RIA.

Results

Women with GDM vs. NTG had significantly higher leptin median (Q1-Q3) levels [14.6 (9.2-19.4) vs. 9.6 (6.0-15.1) ng/mL; $p<.055$] and insulin levels [11.4 (8.6-16.5) vs 9.4 (7.0-12.8) μ UI/mL; $p<0.001$] and lower adiponectin [12.9 (9.8-17.2) vs. 17.0 (13.3-22.4) μ g/mL; <0.001], at visit 2. These findings persisted in visit 3, with overexpression of miR-222-3p [1.45 (0.76-2.21) vs. 0.99 (0.21-1.70); $p<0.05$] and higher levels of IL-6 and TNF- α . When the IG was compared with the CG, lower levels of insulin, HOMA-IR, IL-6 levels at visit 2 and 3, and leptin levels only at visit 2 were observed. An overexpression of miR-222-3p and miR-103a-3p were also observed in IG at visit 2 and 3. The miR-222-3p and miR103a 3p expression correlated with insulin levels, HOMA-IR, IL-6 and TNF- α at visit 2, (all $p<0.05$). The differences found in the IG appear to be at the expense of the intervention effect in the TNG group. These data support the association of leptin, adiponectin and insulin/HOMA-IR with GDM, as well as the association of insulin/HOMA-IR and IL-6 and miR-222-3p and miR-103a-3p expression with a MedDiet-based nutritional intervention

1 Introducción

1.1 Definición de Diabetes Mellitus Gestacional

La DMG se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa, que se desarrolla y se diagnóstica por primera vez durante la gestación (1). En la mayoría de los casos, esta hiperglucemia es el resultado de una tolerancia alterada a la glucosa, debido a una disfunción de las células β pancreáticas, en un contexto de resistencia crónica a la insulina (2, 3).

Durante el embarazo normal, se produce un estado transitorio y fisiológico de disminución de la sensibilidad a la insulina. Estos cambios en la resistencia a la insulina se producen para facilitar la disponibilidad y el transporte de la glucosa a través de la placenta y así garantizar el crecimiento y el desarrollo normal del feto. La transferencia de glucosa a través de la placenta asegura un suministro adecuado de carbohidratos para el feto y estimula la secreción de la insulina pancreática fetal, que a su vez activa el anabolismo fetal, promoviendo así su crecimiento. Entre otros mecanismos, la resistencia a la insulina (RI) se debe principalmente a la secreción placentaria de hormonas diabetogénicas, como la hormona de crecimiento placentaria (PGH) y el lactógeno placentario (HPL), el aumento de los niveles de estrógeno, progesterona y cortisol sérico, y otros factores como las citoquinas y adipoquinas, que pueden interferir en la vía de señalización de la insulina y provocar una RI durante el embarazo normal. La placenta, por tanto, es un órgano crucial para sostener la vida intrauterina. Sus funciones no son sólo nutricionales y endocrinas sino también inmunológicas (4).

En mujeres con factores de riesgo, como el sobrepeso pregestacional y la obesidad, o con antecedentes personales o familiares de DMG, o en los casos de edad materna avanzada, el embarazo condiciona una RI más pronunciada, especialmente durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, lo que conduce al desarrollo de DMG como consecuencia del fracaso en los mecanismos compensatorios para mantener la estabilidad materno-fetal.

El grado de hiperglucemia que define la DMG está continuamente en revisión. El establecimiento de unos criterios diagnósticos claros de DMG, así como el grado de hiperglucemia que la define, ha sido y es objeto de un amplio debate y está continuamente en revisión (4-7). Sin embargo, cada vez son mayores y más claros los criterios que permiten delimitar la condición de DMG. Por una parte, la definición de DMG como “cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o detectada por primera vez durante el embarazo” excluye a las mujeres con diabetes pregestacional, esto es, aquellas con diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros tipos de diabetes, como la diabetes relacionada con la fibrosis quística, la diabetes inducida por esteroides o medicación y la diabetes monogénica. Por otra parte, la hiperglucemia durante el embarazo se subclasifica actualmente en 2 categorías distintas, la DMG “verdadera” y la llamada “diabetes que se pone de manifiesto durante el embarazo”(8) o como se denomina más recientemente la “diabetes mellitus en el embarazo ”(9)

La diabetes en el embarazo fue descrita por primera vez en 1824. Los primeros criterios diagnósticos de DMG se publicaron en 1964 por O'Sullivan y Mahan y casi simultáneamente por la *Organización Mundial de la Salud (OMS)*. Estos se definieron basándose en la realización de una prueba de sobrecarga oral de glucosa, en el segundo o tercer trimestre del embarazo, utilizando 100 g de glucosa y extracción en 3 horas, para determinar los niveles de glucosa en sangre total. El fin era identificar a las mujeres con alto riesgo de desarrollar diabetes en el futuro. Se definió como DMG cuando los valores de glucosa en sangre venosa total eran superiores a 2 desviaciones estándar por encima de los valores medios de glucosa para el embarazo (10, 11). Unos años más tarde, O 'Sullivan et al. recomendaron utilizar una estrategia de diagnóstico de DMG en dos pasos. Se realizaba una prueba de cribado inicial, consistente en determinar la glucemia una hora después de la ingestión oral de 50 g de glucosa. Esta prueba se utilizaba para determinar si se debía realizar posteriormente una PTOG de 100g y 3 horas para diagnosticar la DMG. En su análisis, encontraron que el umbral de cribado mayor a 143 mg/dL tenía una sensibilidad del 79 % y una especificidad del 87 % para la detección de mujeres con DMG posteriormente. La prueba de screening de 50 g tenía

varias ventajas, entre ellas que puede realizarse independientemente de la hora de la última comida o del momento del día, y que entre el 70 % y el 80 % de las mujeres embarazadas no requerirían otras pruebas confirmatorias en ayunas (12).

En 1979, el Grupo Nacional de Información en Diabetes (*National Diabetes Data Group -NDDG* por sus siglas en inglés) publicó la conversión numérica de los criterios originales de O'Sullivan y Mahan para valores de glucemia venosa total y glucemia plasmática, añadiendo un 15 % a cada valor de la glucosa en sangre total (13).

Este enfoque diagnóstico para la DMG sugerido por O'Sullivan et al. se utilizó hasta que, en 1982, Carpenter y Coustan adaptaron esos puntos de corte a los métodos modernos de medición de glucosa y los aplicaron a la definición moderna de diabetes gestacional, como aquella intolerancia a la glucosa que “se establece o se reconoce por primera vez” durante el embarazo (14). También aconsejaron reducir el umbral de glucosa de la prueba de screening a 135 mg/dL, ya que por debajo de ese umbral existía una fuerte correlación con una PTGO de 100 g - 3 horas normal.

A partir de 2003, la *American Diabetes Association* (ADA) recomendó utilizar para el diagnóstico de DMG, una PTGO de 1 sólo paso, de 75 g y 2 horas de extracción, derivada de los umbrales de glucosa en ayunas, de 1 y 2 horas modificados de Carpenter y Coustan para la PTGO de 100 g y 3 horas (15). Se consideró que este procedimiento, aunque estaba menos validado, era más rentable que el PTOG de 100 g y 3 horas.

La evolución de los criterios de diagnóstico de la DMG evidencia la falta de consenso histórico para el diagnóstico de la DMG. Con el tiempo, el objetivo del diagnóstico de DMG pasa de definir umbrales de glucosa predictores de complicaciones maternas futuras, como es el desarrollo de diabetes, a evitar las complicaciones perinatales.

En 2008 se publicaron los resultados del estudio “*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy*” (16) (16) realizado sobre más de 25.000 mujeres embarazadas. En este amplio estudio internacional, prospectivo y observacional se evaluó la relación entre los

niveles de glucosa en la PTOG con sobrecarga de 75 g y tras 2 horas, realizada entre las 24 y las 32 semanas y la aparición de complicaciones obstétricas y neonatales. Los resultados mostraron una relación lineal continua entre los niveles de glucosa plasmática y la presencia de complicaciones materno-fetales, como peso al nacer >percentil 90 para la edad gestacional, parto por cesárea, hipoglucemia neonatal, péptido C en sangre del cordón umbilical >percentil 90, preeclampsia, parto prematuro, parto distócico, hiperbilirrubinemia e ingreso en cuidados intensivos neonatales, de tal modo que aquellas que tuvieron niveles por debajo de los niveles que definen diabetes fuera del embarazo, presentaban menor complicaciones materno-fetales y obstétricas, sin embargo no se encontraron umbrales específicos de glucosa a partir de los cuales aumentarían las complicaciones obstétricas y neonatales significativamente (16).

Basándose en estos resultados y en otros ensayos, y a pesar de que no se indicara un umbral claro de glucosa en el estudio HAPO, el consenso del *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group* (IADPSG) propuso unos puntos de corte para la PTOG, que eran los valores medios de glucosa que se asociaban a una odds ratio ajustada de 1,75 de presentar resultados perinatales adversos (peso al nacer >90º percentil, nivel de péptido C en el cordón umbilical >90º percentil y porcentaje de grasa corporal neonatal >90º percentil y establece también que sólo se requiere un valor elevado de glucosa en un solo tiempo de la PTOG para el diagnóstico de DMG (8).

Después de HAPO, existen diferentes estrategias de cribado y pruebas para el diagnóstico de la DMG a nivel internacional. El IADPSG y la OMS recomiendan la realización de pruebas universales a todas las mujeres embarazadas de entre 24 y 28 semanas de gestación con la SOG de 75 g y 2 horas. Estas recomendaciones han sido ampliamente respaldadas por varias organizaciones, entre ellas la *ADA, the Endocrine Society, the International Federation of Gynecology and Obstetrics, the Australian Diabetes in Pregnancy Association, Japan Diabetes Society, Ministry of Health of China, and the European Board of Gynecology and Obstetrics*.

Como ha quedado reflejado, los criterios actuales están implementados para definir DMG en el segundo y tercer trimestre del embarazo. Actualmente sigue sin estar claro qué criterios diagnósticos deben utilizarse para definir la DMG en las primeras semanas del embarazo, y si debe utilizarse un cribado universal o selectivo para detectar la DMG antes de las 24 semanas. El aumento de la edad materna en el embarazo, la actual epidemia de obesidad y diabetes ha provocado un aumento de la diabetes de tipo 2 en las mujeres en edad fértil, con un incremento del número de mujeres embarazadas con diabetes de tipo 2 sin diagnosticar. Por un lado, es razonable realizar pruebas a las mujeres con factores de riesgo de diabetes tipo 2 en su visita prenatal, utilizando criterios de diagnóstico estándar, para ser clasificadas como diabéticas pregestacionales y así promover cambios en su estilo de vida para reducir el riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2, y quizás DMG. Por otro lado, el tratamiento de la hiperglucemia leve al principio del embarazo sigue siendo controvertido debido a la falta de estudios que apoyen cualquier beneficio del tratamiento de la DMG antes de las 24 semanas de embarazo.

De forma práctica se resume que el diagnóstico de la DMG puede realizarse siguiendo una de las dos estrategias siguientes: una prueba de un paso, con 75 g de glucosa o una prueba de dos pasos, consistente en una prueba de detección de 50 g (sin necesidad de ayuno) seguida de una PTGO de 100 g para los que den positivo. Por otra parte, la obtención de muestra de sangre tras la sobrecarga puede obtenerse al cabo de 1, 2 o 3 horas, el umbral de glucosa para considerar alterada la prueba, En la tabla I se refleja la descripción de estas pruebas. En la actualidad la mayoría de las sociedades recomiendan realizar la estrategia de un solo paso siguiendo las recomendaciones de la IADPSG. El esquema de la realización de la prueba se muestra en la [Figura 1](#).

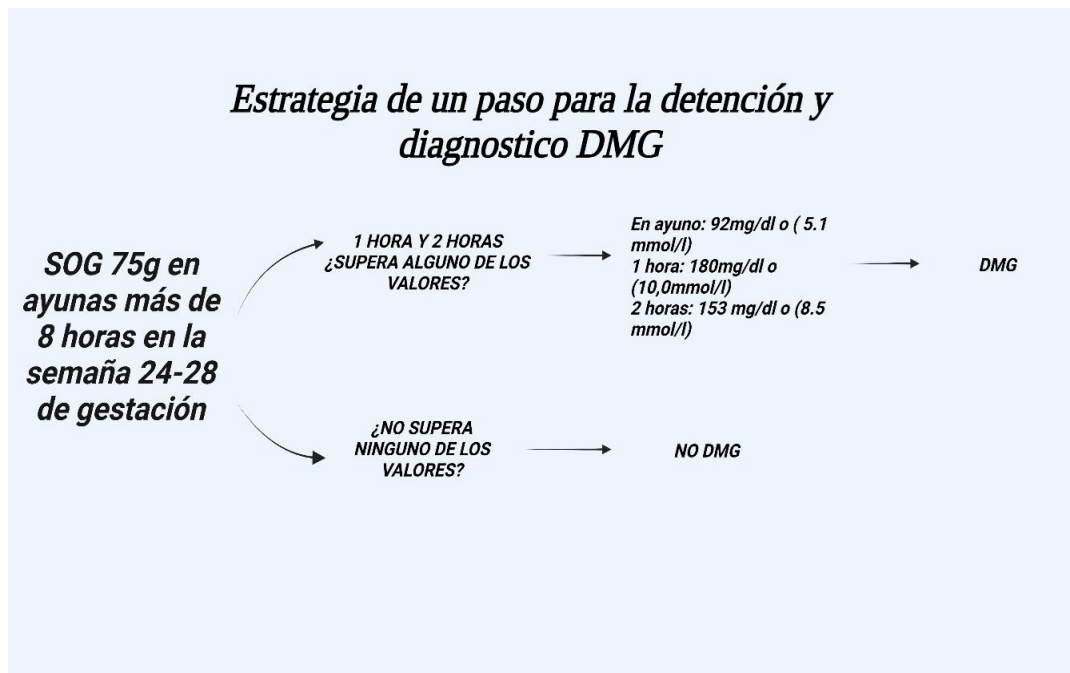


Figura 1. RECOMENDACIONES DE LA IADPSG PARA LA DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DMG (17)

1.2 Prevalencia de la Diabetes Mellitus Gestacional

La DMG es una de las complicaciones médicas que se presenta con más frecuencia en el embarazo. Su prevalencia oscila entre el 2 % y el 25 % y varía dependiendo de la población y de los criterios de detección y diagnósticos utilizados. Así, en una revisión sistemática de 2012 se indicó que la prevalencia mundial de DMG, según los criterios de la OMS, oscilaba del 2 % al 24,5 %, para los criterios de Carpenter y Coustan del 3,6 % al 38 %, del 1,4 al 50 % para los criterios de la NDDG y del 2 % al 19 % para los criterios de la IADPSG (18).

Independientemente de los criterios diagnósticos específicos o de la población, la prevalencia de la DMG sigue aumentando a nivel internacional. Actualmente se considera un problema epidemiológico, ya que en los últimos 15 o 20 años su incidencia está en constante aumento de manera similar a la epidemia en curso de la obesidad y la DMT2 en mujeres de edad fértil (19, 20) En 2019, la *Federación Internacional de Diabetes* (FID) calculó que 1 de cada 6 nacidos vivos en el mundo sufrió una complicación

relacionada con la DMG (21), por lo que uno de los grandes objetivos en este campo se centra en diseñar e implementar estrategias para prevenir esta condición (22).

1.3 Factores de riesgo de Diabetes Mellitus Gestacional

Se han descrito diferentes tipos de factores de riesgo modificables y no modificables para desarrollar DMG:

1- Factores de riesgo no modificables, como la edad, los antecedentes familiares de DMT2 y la DMG previa. El antecedente de DMG en un embarazo anterior es el factor de riesgo más importante para la DMG, con tasas de recurrencia de hasta el 84 %. El riesgo de recurrencia varía en función de la etnia (23).

2- Factores de riesgo modificables, como son el sobrepeso, la mala alimentación y la inactividad física previa. El sobrepeso y la obesidad antes del embarazo son los factores de riesgo modificables para DMG más importantes. El riesgo de DMG se incrementa casi 3 veces en las mujeres con IMC de 30-34, 99 kg/m² y 4 veces en las mujeres con IMC >35, en comparación con las mujeres con un IMC < 30 kg/m² (5, 24).

Esto implica que para un mejor manejo de la DMG se requiere un enfoque multidisciplinario que incluya la prevención de la obesidad, intervención nutricional, actividad física y cambios en el estilo de vida antes y durante el embarazo (22, 25).

1.4 Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Gestacional

1.4.1 Papel de la placenta

La placenta es un órgano complejo que desempeña una serie de funciones pleiotrópicas durante el crecimiento fetal. Es un órgano transitorio, situado entre la madre y el feto, que sostiene la vida intrauterina y que tiene como objetivo mantener la viabilidad del

feto durante todo el embarazo hasta el parto. Su formación empieza a las pocas semanas de embarazo y tiene una funcionalidad endocrina, paracrina y autocrina.

La placenta separa la circulación materna de la fetal. El sincitiotrofoblasto expone la placenta a la circulación materna y el endotelio está en contacto con la sangre fetal. Por su disposición la placenta está expuesta a la influencia de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y otros factores presentes en ambas circulaciones. A su vez, puede producir moléculas que afecten a la madre y al feto de forma independiente. Por tanto, es un órgano donde se produce el intercambio de nutrientes, de oxígeno y de diferentes metabolitos y hormonas necesarios para un buen desarrollo fetal (25-27), por lo que el mantenimiento de su morfología es crucial para que el embarazo llegue a buen término.

La DMG está asociada a una mayor incidencia de lesiones estructurales, morfológicas y funcionales en la placenta materna. Es común encontrar una disminución en la proliferación del trofoblasto, depósitos de glucógeno y mayor número de nudos sincitiales. A nivel vascular se ha descrito una alteración en la maduración de las vellosidades, aumento de la angiogénesis, una alta tasa de vasculogénesis con capilares inmaduros engrosados y signos de hipoperfusión placentaria. También se ha descrito un aumento de la necrosis fibrinoide e isquemia. Estas modificaciones pueden dar lugar a una reducción en el tamaño placentario y a cambios funcionales en este órgano, limitando así el bienestar del feto en desarrollo (26-28).

Se ha visto que estas alteraciones aumentan el riesgo de complicaciones a corto plazo en la madre, como la hipertensión inducida por el embarazo, la preeclampsia, los partos instrumentales y las cesáreas (29) y en los hijos, causa de aparición de complicaciones a corto y a largo plazo. Entre las primeras se encuentran el crecimiento intrauterino retardado, el sufrimiento fetal, la muerte intrauterina y los traumatismos obstétricos. Entre los segundos, el mayor riesgo de obesidad y/o intolerancia glucídica en la pubertad (30, 31). También, se ha comprobado, que a largo plazo pueden desarrollar DM2, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (32, 33).

Aunque hasta la fecha se han descrito diferentes mecanismos fisiopatológicos en la DMG, en la últimas se ha demostrado que varias citoadipoquinas están implicadas en las alteraciones metabólicas que subyacen a la DMG. La placenta funciona como un órgano inmuno-endocrino necesario para responder a un entorno hiperglucémico sintetizando diversas citoquinas, adipoquinas y hormonas (34). La alteración metabólica materna anormal estimula a las células del tejido adiposo y la placenta, aumentando la producción de citoquinas inflamatorias, cuya expresión es mínima en un embarazo normal. Se ha sugerido que la placenta en la DMG, mediante la formación de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α y la modulación de adipoquinas, puede ser responsable de modificaciones en los receptores de insulina. Asimismo, el entorno fetal también se modifica en la DMG favoreciendo el aumento de los niveles de insulina, leptina y otras citoquinas (35-37).

La [Figura 2](#) muestra un esquema de las modificaciones de la placenta por la DMG. Según avanza el embarazo se produce un incremento de las citoquinas y adipoquinas que favorecen la resistencia a la insulina, que a su vez favorecen de nuevo el incremento de las citoquinas y adipoquinas, creándose así un círculo vicioso.

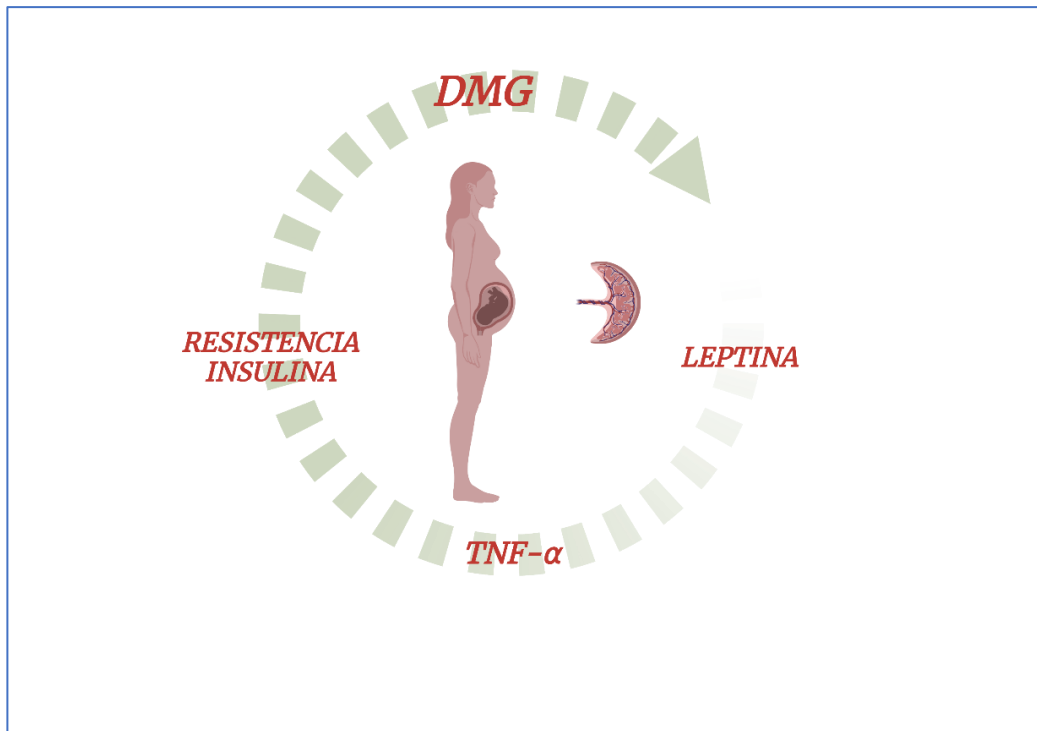


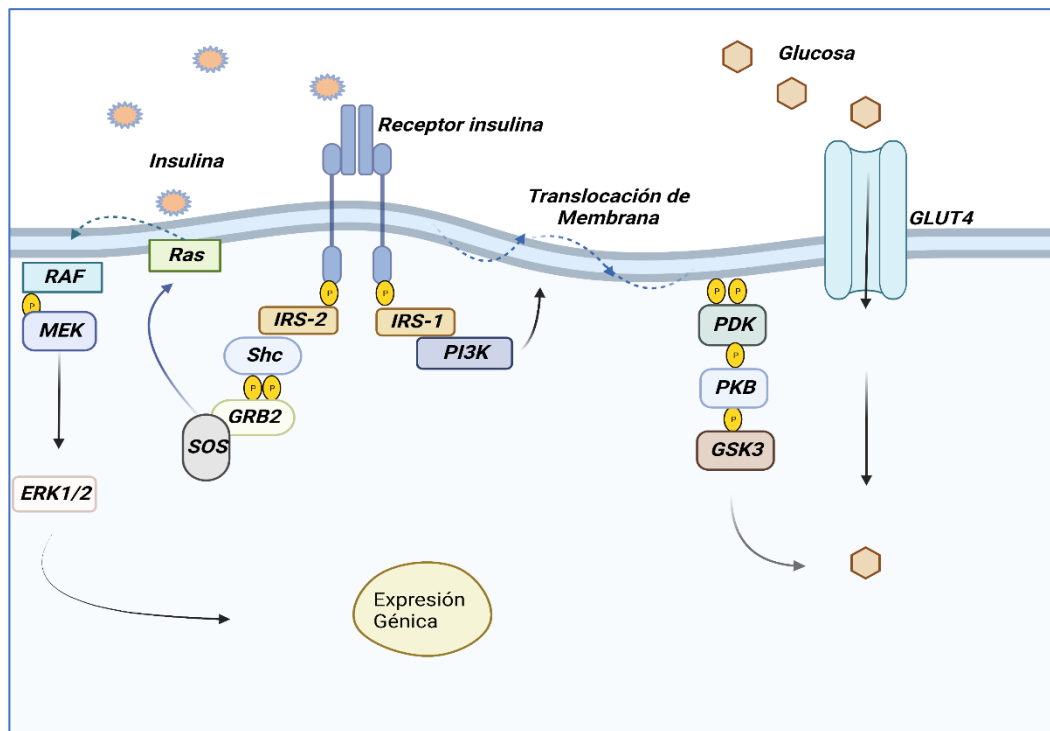
FIGURA 2. FISIOPATOLOGÍA DE LA DMG EN LA PLACENTA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

1.4.2 Resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus Gestacional

La insulina es una hormona peptídica, formada por 51 aminoácidos que regula la homeostasis de la glucosa. Cuando ocurre algún fallo en el acoplamiento de la insulina con su receptor o en los eventos intracelulares y se produce una acumulación de insulina y glucosa a nivel plasmático, se conoce como resistencia a la insulina (38). Esta incapacidad de la insulina para metabolizar la glucosa ocurre principalmente en diferentes tejidos como el tejido adiposo, el tejido muscular y el hígado. La resistencia a la insulina puede ser consecuencia de la presencia de anticuerpos antiinsulina, por alteraciones o disrupción de los receptores de membrana celular, por alteración en la cascada de señalización de la insulina, que impide el traslado del GLUT4, o como ocurre en la DMG, por alteración del IRS-1 (39-41).

El receptor de insulina (INSR) pertenece a la familia de receptores de superficie celular que poseen actividad tirosina quinasa intrínseca (RTK), entre los que se encuentran el

receptor del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1R) y el receptor relacionado con el INSR (IRR). Está formado por dos subunidades α , situadas en la superficie de la membrana celular, en donde se acopla la insulina, y por dos subunidades β transmembrana, con un dominio en el citosol celular (42). La unión de la insulina plasmática con el receptor de insulina (INSR) inicia una compleja cascada de señalización que desencadena efectos metabólicos y mitogénicos. Tras la activación, el receptor estimula la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS) IRS-1 y 2. La IRS-1, recluta y activa a la proteína 1 fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y ésta, al autofosforilarse provoca la translocación de membrana y desencadena una corriente de uniones de diferentes proteínas que se autofosforilarán, en cadena como el PDK, la PKB y el GSK3, lo que provoca la activación del transportador de la GLUT4. que se transloca hasta la membrana, para luego salir a la superficie y favorecer la entrada de la glucosa plasmática. La IRS-2, activa diferentes proteínas en cascada que inician la ruta de otras proteínas ligadas, en las que intervienen Grb2 y SOS. Estas actúan sobre la proteína Ras/Raf/MeK1 y Mek2/ERK1 y así la insulina puede regular la expresión génica en la célula (43, 44). Esta regulación de forma negativa acelera procesos inflamatorios y metabólicos que aumentan los riesgos cardio metabólicos materno-fetales. En la [Figura 3](#) se muestra un esquema con las dos corrientes de la vía de señalización de la insulina a nivel celular.



ADAPTADO DE LEHNIGER ET AL. (45)

FIGURA 3. SEÑALIZACIÓN DE LA CASCADA DE INSULINA EN CÉLULAS PANCREÁTICAS, HÍGADO Y MÚSCULO ESQUELÉTICO. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

1.4.3 Leptina y Diabetes Mellitus Gestacional

La leptina es una hormona peptídica, con un peso molecular de unos 16 kilo dalton (kda), que está localizada en el gen LEP situado en el cromosoma 7q32.1 (46, 47). Su función principal es la de regular el peso corporal y el metabolismo a nivel central en el cerebro. La leptina se produce en el tejido adiposo y actúa como una señal aferente en un circuito de retroalimentación negativa para el control homeostático de la masa grasa, regulando la ingesta de alimentos y el gasto energético. En los individuos de peso normal, el cerebro responde al aumento de los niveles de leptina en plasma reduciendo la ingesta de alimentos y aumentando el gasto energético. Los receptores de leptina y leptina se expresan en gran medida en el área preóptica, en el núcleo arqueado del hipotálamo y

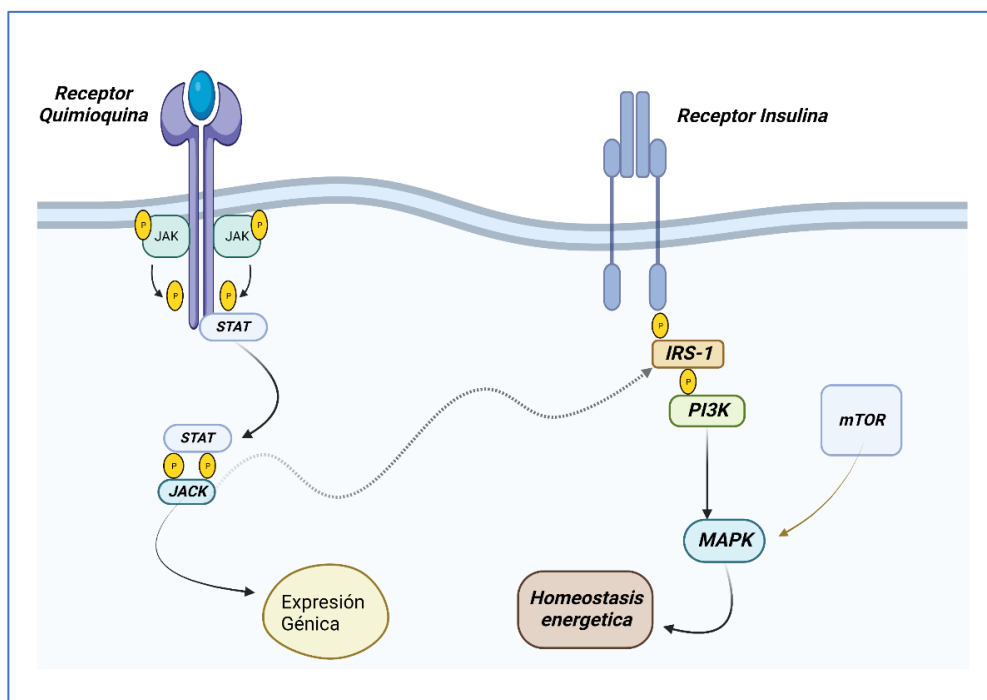
en el hipotálamo lateral, ventromedial y dorsomedial. Allí regula la homeostasis energética y la función neuroendocrina, entre otras funciones. Las mutaciones en los genes que codifican para leptina LEP o su receptor LEPR provoca obesidad mórbida y otras enfermedades metabólicas graves (48). La leptina tiene como principal función la homeostasis energética, disminuyendo la ingesta de energía y aumentando el gasto energético (49). De tal forma cuando los niveles plasmáticos son elevados y persistentes hablamos de resistencia a la leptina. Lo que implica una disminución de la saciedad o una disminución del gasto calórico lo que puede conllevar a sobrepeso, obesidad, enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos (50).

Otra de las funciones de la leptina es su papel regulador sobre la interacción entre el metabolismo energético y el sistema inmunitario, actuando como una adipocina proinflamatoria. A su vez, varios mediadores inflamatorios producidos por las células inflamatorias también regulan la expresión de la leptina y promueven el desarrollo de un estado de inflamación crónica (51).

La leptina tiene también un papel regulador de la homeostasis de la glucosa, inhibiendo la secreción de insulina. Por otra parte, estudios epidemiológicos y en animales indican que la resistencia a la leptina y la alteración de la señalización de la leptina influyen en la resistencia a la insulina en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, en el contexto regulador del estado inflamatorio. Por lo tanto, las acciones proinflamatorias de la leptina también podrían tener implicaciones significativas en la patogénesis de la DMG.

Una de las causas de resistencia a la leptina reside en la alteración de su receptor. Este receptor se activa por la leptina extra plasmática en el hipocampo y se encuentra asociado a las tirosinas quinasa 2 (JAK2) transmembrana (52, 53). El JAK2 se dimeriza cuando el receptor de leptina entra en contacto con la leptina plasmática y se estimula la transactivación y fosforilación en el citosol celular. JAK2 reconoce el dominio del activador de proteína de transcripción (STAT) que formará la unión STAT/JAK. Esta unión provoca una regulación de diversos genes implicados en la regulación de la

homeostasis energética y del apetito. La leptina, como la insulina, aumenta los niveles de señalización fosforilados por la asociación entre la cascada del JAK2-STAT y la cascada de insulina en la unión de la proteína activadora de mitógeno quinasa (MAPK) y PI3K en el núcleo arqueado (54). Se ha demostrado en diferentes estudios que este proceso ocurre cuando al iniciarse la señalización en la vía de leptina, se activan procesos regulatorios del peso corporal y de la homeostasis energética donde el JAK2 también puede activar de forma secundaria, la IRS-1 y este silenciará el PI3K que provocará inactivación de la cascada de insulina y además una alteración en el mecanismo del mammalian target of rapamycin (mTOR) actuando sobre el crecimiento celular además de la regulación metabólica intracelular. Además, puede estar implicado en el control de la transcripción de los miRNAs. Por lo que, se confirmaría que niveles elevados de leptina se asocian a mayores posibilidades de resistencia de insulina representado en la [Figura 4](#) (55, 56).



ADAPTADO DE FEDUCHINI ET AL. (57)

FIGURA 4. ASOCIACIÓN NEGATIVA DE LA SEÑALIZACIÓN DE LEPTINA CON LA CASCADE DE INSULINA.
IMÁGENES CREADAS EN BIORENDER.

Durante la gestación la leptina también es sintetizada por la placenta siendo esta clave para el desarrollo fetal (58). Se sabe que, durante el embarazo, existe una expresión de leptina por parte de las células trofoblásticas de la placenta. Los niveles de leptina se elevan hasta alcanzar niveles 2 a 3 veces mayores en el embarazo que fuera del mismo. Las concentraciones plasmáticas comienzan a elevarse al inicio de este, alcanzando su punto máximo en el segundo trimestre, con un pico alrededor de las 28 semanas de gestación, y permanecen elevados hasta el parto. Este significativo aumento de las concentraciones de leptina al principio del embarazo, antes de la ganancia de peso corporal propia de la gestación, sugiere que son otros factores, además del aumento de la adiposidad, los que intervienen en una mayor concentración de leptina materna (59).

Se ha demostrado que la secreción de leptina durante el embarazo está asociada a la tolerancia a la glucosa durante este periodo. Existe una correlación positiva significativa entre la leptina materna y los niveles de insulina en ayunas y el índice HOMA (60).

Existen datos contradictorios sobre el papel de la leptina en la DMG y es un campo de investigación de creciente interés. Diversos estudios han demostrado que en la DMG las concentraciones séricas de leptina son mayores que en las mujeres con intolerancia a la glucosa o sin DMG. Se ha demostrado también que cada aumento de 10 ng/ml en la concentración de leptina al principio del embarazo se asocia con un aumento del 20 % en el riesgo de DMG. Los estudios de cohortes publicados son contradictorios. Algunos han demostrado que las concentraciones de leptina son más elevadas en las mujeres con DMG en el primer y segundo trimestre del embarazo, incluso al inicio del tercer trimestre, pero no al final (61-65), excepto en un trabajo que también encuentra elevada la leptina antes del parto (66). Otros estudios no han encontrado una asociación entre los niveles de leptina y el riesgo de DMG (67). En algunos casos se ha publicado que las concentraciones de leptina estaban asociadas al IMC, pero no a DMG y en otros casos no estaban asociadas a riesgo de DMG en mujeres con IMC al inicio del embarazo menor a 35 kg/m² (68, 69). Las concentraciones parecen estar influidas también por la etnia (63).

Algunos autores han descrito que este aumento es paralelo a la presencia de concentraciones bajas de receptor soluble de leptina (sOB-R, en inglés soluble leptin receptor) como correspondería a una situación de resistencia a la leptina. También se ha demostrado que este aumento de los niveles de la leptina en DMG estaba correlacionados positivamente con los marcadores del metabolismo de la glucosa y la inflamación, como HOMA-IR, insulina, péptido C, hsCRP, reforzando la relación fisiopatológica en DMG entre estas vías (61).

1.4.4 Adiponectina y Diabetes Mellitus Gestacional

La adiponectina, Adipo Q o también llamada apM1, es una proteína de 244 aminoácidos con un peso molecular de 32 kda secretada principalmente por el tejido adiposo blanco, aunque otros tejidos también la producen, como el tejido adiposo pardo y otros (70). Es sintetizada por el adipocito y se distribuye en la circulación en cuatro formas: trímeros, hexámeros, multímeros de alto peso molecular y en una forma globular. Tiene tres receptores: AdipoR1, un receptor de alta afinidad para la adiponectina globular y baja afinidad para la proteína completa, con expresión ubicua, aunque más abundante en el músculo esquelético; AdipoR2, que reconoce principalmente la forma completa y se expresa predominantemente en el hígado; y la T-cadherina, que actúa como receptor de las formas hexaméricas y multiméricas. La adiponectina tiene efectos a nivel del tejido adiposo, donde participa en la diferenciación de los adipocitos. Diferentes estudios han confirmado que participa en la diferenciación celular de los pre - adipocitos (3T3-L1), adipocitos y así juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad (71). También en tejido adiposo disminuye la inflamación y los efectos lipotóxicos por la acumulación de lípidos. En el hígado, suprime la gluconeogénesis disminuyendo los niveles de glucosa sérica. Todo ello hace que, en humanos, unos niveles circulantes bajos de adiponectina se asocien con aumento del peso, obesidad y síndrome metabólico.

En músculo esquelético, estudios en animales de experimentación han demostrado que la adiponectina promueve la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4), la utilización de la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos.

Estudios recientes realizados en ratas y en humanos, han confirmado que la adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias y antidiabéticas, que podrían aliviar o reducir la resistencia a la insulina en el hígado y el músculo, por acción de la AMPK y por el PPAR- α . El PPAR- α es una metaloproteína que es capaz de aumentar la biodisponibilidad del IGF-1. Se ha visto que regula la glucosa por su intervención en la vía de señalización de insulina y regulación en el metabolismo, así como causar la disminución del estrés oxidativo antidiabéticas (72-77).

La mayoría de los estudios indican que los niveles circulantes de adiponectina disminuyen a medida que avanza el embarazo y aumenta la RI (78). En poblaciones de gestantes se observó que la adiponectina se encontraba reducida en aquellas mujeres que desarrollaron DMG y que esto podría deberse a una asociación con la sensibilidad de la insulina por alteración de la cascada de insulina en aquellas mujeres que presentaron un mayor IMC e inflamación subclínica y aterogénicos (79), por lo que se ha hipotetizado que esta desregulación entre adiponectina y el receptor de insulina podría estar asociada al síndrome metabólico, a la DMG y a la obesidad.

Existen dos receptores de adiponectina, Adipo R1 y Adipo R2. Son proteínas integrales de membrana con siete dominios transmembrana, su N-terminal dentro de la célula y el C-terminal orientado hacia el exterior, una topología opuesta a la de todos los receptores acoplados a proteínas G conocidos, que activan cascadas de señalización intracelular que conducen a una disminución de la glucosa en el músculo y en el hígado (80). El receptor Adipo R1 se encuentra de forma más abundante en las membranas celulares tanto del hígado como de las células del músculo esquelético. La AdipoR2 se encuentra exclusivamente en la membrana celular hepática. Ambos receptores al unirse a la adiponectina interactúan aumentando la actividad de la AMPK, provocando una mejora drástica en la captación de glucosa en sangre, en el metabolismo de la gluconeogénesis en el hígado y en la oxidación de los ácidos grasos a nivel de los músculos (81, 82). En la [Figura 5](#) se muestra la disposición de uno de los receptores de

adiponectina con la AMPK en la señalización de insulina y alteración de la regulación génica.

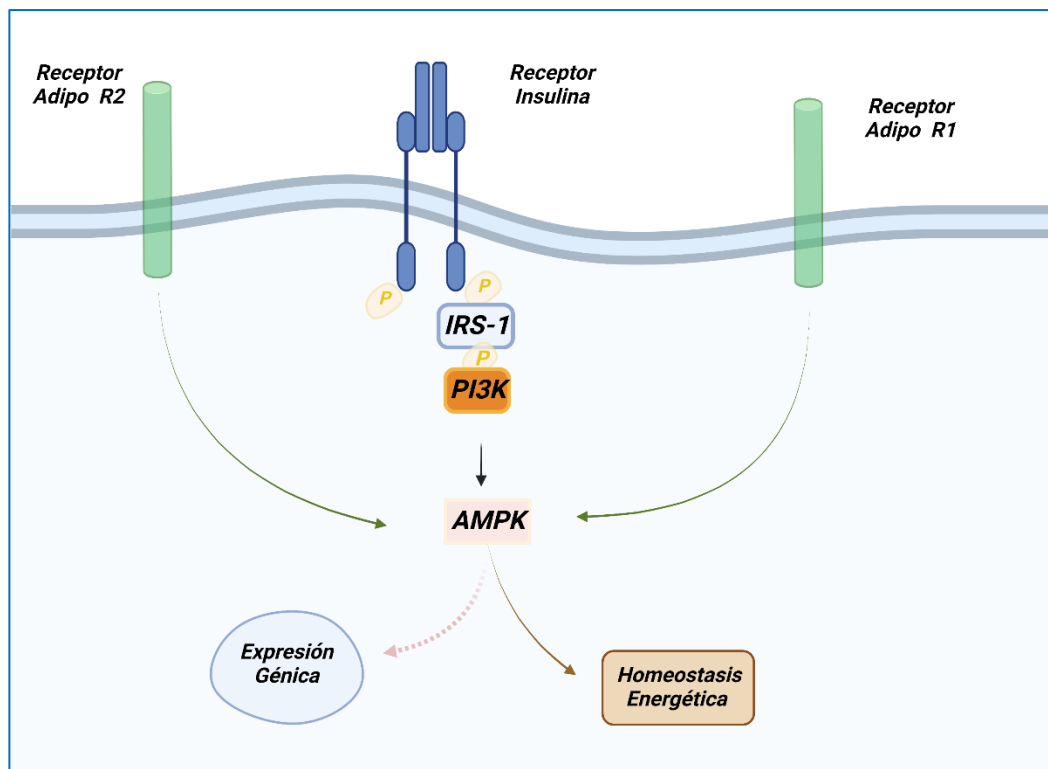


FIGURA 5. INTERACCIÓN DE LA ADIPONECTINA EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN A LA INSULINA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

En DMG prácticamente todos los estudios coinciden en confirmar que existe una disminución de los niveles circulantes de adiponectina. La mayoría de los estudios tanto de cohortes como caso-control demuestran que sus niveles disminuyen en el primer y segundo trimestre (63, 67-69, 83-85), incluso también en el tercer trimestre temprano, pero no al final del tercer trimestre (64). A diferencia de lo que ocurre con la leptina, los niveles de adiponectina en DMG se encuentran descendidos incluso con independencia de la etnia y del IMC, aunque la diferencia fue más pronunciada en las mujeres con IMC < 35 kg/m² (63, 68).

Francis et al. describieron que, a lo largo del embarazo, desde la 10-14 semana de gestación (SG) hasta la 15-26 SG, las concentraciones de adiponectina de 10-14 a 15-26 fueron significativamente diferentes entre los casos de DMG en comparación con los controles sin DMG. Además, los niveles de adiponectina en la 10-14 SG estaban inversamente relacionados con el riesgo de DMG y estaban correlacionados negativamente con el metabolismo de la glucosa y marcadores cardiometabólicos, como la glucosa, HOMA-IR, Insulina, HDL colesterol y triglicéridos que se obtuvieron más tarde entre la 15 y 26 SG (61). La utilidad de la determinación de adiponectina o de la relación la relación ficolin-3/adiponectina en la 16-18 SG como buenos predictores de desarrollo posterior de DMG ya se había descrito previamente (85, 86).

Se ha descrito también una correlación negativa de la adiponectina en la visita del primer trimestre con el valor de tensión sistólica, colesterol total y triglicéridos en la SG 24-28 (62). Algunos autores han explorado si los niveles de adiponectina en esas mismas semanas de gestación, podría ser un buen biomarcador clínico para predecir un posterior parto pretérmino en DMG, pero no se ha demostrado (84).

1.4.5 Citoquinas y Diabetes Mellitus Gestacional: TNF alfa e Interleuquina 6.

El TNF- α , es una citoquina proinflamatoria homotrimérica de 17 kda que tiene efectos pleiotrópicos en varios tipos de células. Es secretada principalmente por células inmunitarias, como macrófagos activados, células T y células Natural Killer; sin embargo, numerosos tipos de células y tejidos del organismo pueden producirlo, como el tejido adiposo. El TNF- α se une a sus receptores, principalmente el TNFR1 y el TNFR2, y transmite señales moleculares para realizar sus funciones biológicas, como la inflamación, necrosis, apoptosis y muerte celular. El TNFR1 se expresa en todos los tejidos humanos y es el principal receptor de señalización del TNF- α , mientras que el TNFR2 se expresa generalmente en las células inmunitarias para realizar respuestas biológicas específicas (87).

TNF- α desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina al reducir el de la insulina (GLUT4), localizado en los adipocitos, el esqueleto y los músculos a través de la inducción de la fosforilación en serina del IRS-1. Mediante la fosforilación de serina del IRS-1 actúa como un inhibidor de la actividad quinasa del receptor de insulina y la señalización incluyendo la activación del PI3K y favoreciendo la resistencia a la insulina (88, 89). TNF- α reduce la expresión de la GLUT4 en músculo esquelético, cardíaco y en los adipocitos por participación del ROS y alterando la transcripción (90). Además, estimula la formación de lipólisis en los adipocitos e induce hiperlipidemia. En diferentes estudios se ha observado una asociación entre resistencia a la insulina, el IMC y las concentraciones de TNF- α . (91-93).

Estudios recientes demuestran que la DMG puede provocar aumento de TNF- α cuando la placenta toma la función de formación de esta citoquina (94).

Los estudios de cohortes y caso control que han estudiado los niveles de TNF- α durante el embarazo en mujeres con y sin DMG son contradictorios. En algunos trabajos de cohortes no se encontraron diferencias entre ambos grupos, ni en el primer ni en el segundo trimestre de gestación y tampoco en estudios caso-control (95), pero en otros

estudios sí (96). Al-Musharaf et al. observaron mediante un análisis de regresión logística ajustada por edad y el IMC que los niveles de TNF- α en la semana 8 a 12 de gestación podrían predecir el desarrollo de DMG, sin embargo, la significación se perdía cuando otras variables maternas, como la paridad, la historia familiar de diabetes y otros factores de estilo de vida de la madre se añadían al ajuste (62). Un estudio de cohortes demostró que las concentraciones de esta citoquina son mayores en el tercer trimestre en la DMG en comparación con el embarazo de mujeres con tolerancia normal a la glucosa. En dos estudios caso-control se ha descrito que los niveles de TNF- α al final del embarazo eran más altos en las mujeres con DMG que en los controles (64). Además, los niveles de TNF- α en DMG se han asociado inversamente con el HOMA- β y positivamente con la glucosa en ayunas (62).

Friedman et al han señalado que los mecanismos que subyacen a la resistencia crónica a la insulina en las mujeres con DMG pueden ser consecuencia de un aumento de la inflamación que afecta a la cascada de señalización de la RI y el IRS-1 en el músculo esquelético. Los autores investigaron la progresión de la resistencia a la insulina en mujeres obesas con DMG durante el final del embarazo y un año después del parto en biopsias de músculo esquelético. La glucosa en ayunas y TNF- α en plasma se mantuvieron más altos 1 año después del parto en las mujeres con DMG en relación con las que las TNG. El ARNm del TNF- α del músculo esquelético se elevó entre cinco y seis veces en las mujeres con DMG y siguió siendo más alto un año después del parto y se correlacionó con los niveles de IRS-1 marcados (41).

La Interleuquina-6, es una citoquina proinflamatoria involucrada en la diferenciación celular, apoptosis y proliferación. Es codificada por el gen 7p21, posee una alta homología con la secuencia murina, pertenece a la familia que incluye IL-6, IL-11, oncostatina M, factor inhibidor de la leucemia, factor neurotrófico ciliar y cardiotrofina-1. Además usa los receptores gp130, también llamados IL-6R β o CD130 (97). La formación del complejo hexamérico IL-6/IL6R/gp130 inicia la actividad de las dos vías de señalización del JAK-STAT y el de la proteína quinasa activadora de mitógeno (98).

Los receptores de membrana plasmáticas LIF y receptor OSM ejercen una señal capaz de activar también la tirosina quinasa JAK, para traducir la regulación de transcripción (99). Estudios en animales reportaron su relación con la vía de señalización de insulina por interferencias negativas que terminaban en procesos inflamatorios en los pacientes con sobrepeso y DMT2 (100).

Existen muy pocos trabajos publicados que estudien el papel de la interleuquina 6 en la DMG. Sin embargo, una revisión sistemática reciente demostró que los niveles séricos de IL-6 eran significativamente más altos en las mujeres con DMG que en las TNG y se sugirió que la IL-6 podía utilizarse como marcador de predicción de diabetes gestacional. Una de las limitaciones de esta revisión fue la heterogeneidad de los criterios de diagnóstico para la DMG y de los diferentes ensayos comerciales que se emplearon para medir los niveles de IL-6 en suero. Por último, debido a los múltiples estudios con diferentes etnias, resultó difícil controlar el efecto de esta variable. Hay pocos estudios de cohortes, tres no observaron una diferencia en el primer, segundo y tercer trimestre en los niveles de IL-6 entre DMG y TNG, pero uno de ellos sí. Entre ellos hubo discrepancias en los criterios diagnósticos (62, 85, 101).

1.5 microRNAs y Diabetes Mellitus Gestacional

Los miRNAs son una clase de moléculas de ARN pequeños que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los miRNAs son reguladores autocrinos y endocrinos de la expresión génica. Actualmente el genoma humano contiene 2654 secuencias maduras de miRNAs documentados. Una de las características interesantes de los miRNAs es que pueden ser vertidos a la circulación y actuar en sus células diana a distancia. Los miRNAs son ARNs no codificantes, pequeños y monocatenarios, que pueden presentar una longitud aproximada entre 18 a 25 nucleótidos (nt). Pueden estar codificados por regiones intrónicas de transcritos codificantes o no codificantes o, con menor frecuencia, por regiones axónicas. Los miRNAs actúan emparejándose con su secuencia de ARNm diana (102, 103). Un solo miRNA es capaz de regular múltiples y

diferentes ARNm diana, así como varios ARNm son capaces de regular diferentes miRNAs (104). Los miRNAs se forman en el núcleo de las células a partir del ADN, la ARN polimerasa II (ARN POL II) o la polimerasa III (ARN POL III), que transcriben una de sus hebras formando un transcripto largo o (pri-miRNA) que tiene una longitud aproximada de 60 a 100 nt, con una horquilla en la región 5', un tallo y una cola de poli (A) ubicado en la región 3'. Este se verá recortado en precursores de bucle de tallo de ~70 nt convirtiéndolo en (pre-miRNA), por la ARNasa Drosha (105-107).

La maduración de los miRNAs, se llevan a cabo por medio de dos vías:

- 1- Interacción de la enzima ARNasa III Dicer y silenciamiento por el complejo inducido al ARNm (108).
- 2- Otra vía más corta por el cual algunos miRNAs se unen directamente a la proteína Argonauta 2 (AGO2) y se saltan la escisión de la RNAasa Dicer y el complejo RISC, para regular células hemolíticas (109, 110).

Lo más relevante de los miRNAs es su interacción a nivel molecular, siendo capaces de actuar en diferentes células dianas a nivel del ARNm, y su capacidad para regular simultáneamente las proteínas que forman parte de las múltiples vías de señalización celular.

La biogénesis de los miRNAs puede ser por una vía canónica y otra no canónica. Cuando se habla de la vía canónica se refiere al proceso que se inicia en el núcleo celular, por acción de la enzima Drosha y su pareja de unión el DGCR8 corta el dúplex pri-miRNA en la base donde se encuentra la horquilla, esto dará como resultado la formación de pre-miRNA, para ser transportado por Exportin-5 (XPO5) (111). Diferentes estudios han descrito que la XPO5 precisa de la unión del receptor de transporte nuclear (108) para hacerlo de manera eficiente y con una mayor afinidad al complejo Ran unida GTP (RaTNGP). Esto sirve para que los pre-miRNAs al unirse a la XPO5, puedan pasar a través de poros establecidos en el núcleo hacia el citoplasma. Una vez establecida ésta unión entre XPO5, NTR y RaTNGP los pre-miRNAs deberán de competir entre sí para ser exportados (112). En el citoplasma la enzima Dicer volverá a actuar sobre al pre-miRNA

transformándolo en un miRNA con una longitud aproximada entre 18-22 nt (113). Este miRNA presenta dos hebras, que para su maduración pasará por el complejo RISC, que es una nucleasa multicompetente específica de la secuencia de flujo, toma una de las hebras guías para degradar la expresión del ARNm y terminará provocando el silenciamiento de este miRNA (114). Los futuros miRNAs ya silenciados pasarán a ser guía o moldes de los futuros miRNAs que viajarán extracelularmente unidos a la proteína AGO2, a sus diferentes células dianas, para regular la expresión genética a distancia (115). Se hipotetiza que la proteína AGO2, impide la degradación circulatoria de los miRNAs circulantes y libres para que puedan llegar a regular la expresión génica en sus diferentes células diana. Esta proteína tiene un papel muy relevante. Por ejemplo, en estudios sobre el metabolismo de la glucosa y obesidad, estudios recientes confirman que la AGO2 de las células hepáticas es un componente esencial del complejo de silenciamiento en la biogénesis de los miRNAs que son patológicos. (109, 110, 116). El esquema de biogénesis de miRNAs por vía canónica se muestra en la [Figura 6](#).

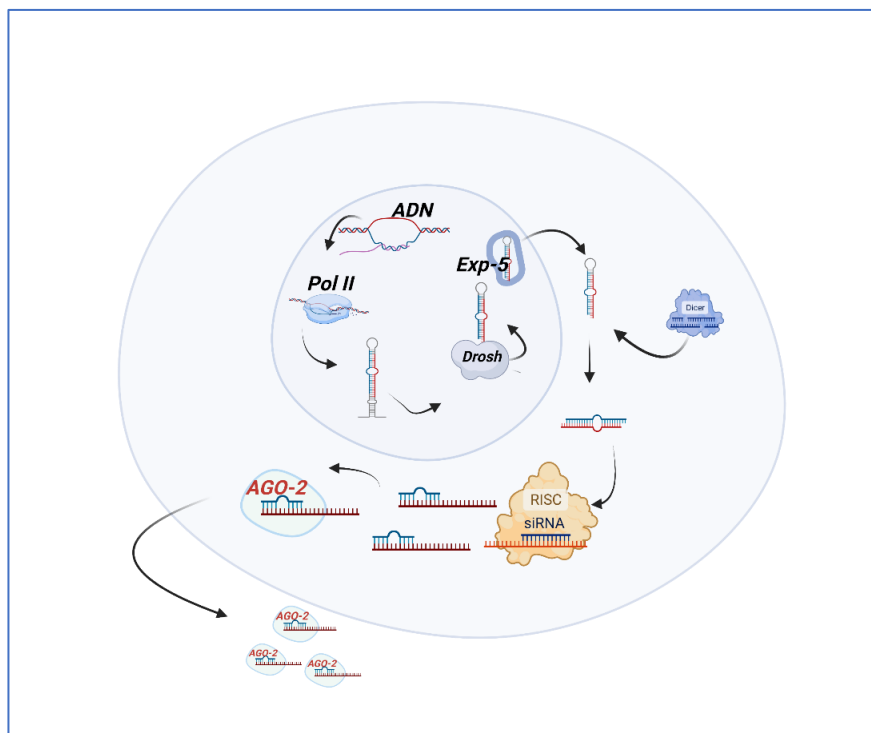


FIGURA 6. BIOGÉNESIS DE LOS MIRNAS CIRCULANTES LIBRES POR LA VÍA CANÓNICA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

Existen algunos miRNAs que se saltan la vía canónica como se mencionó anteriormente y no necesitan pasar por el proceso de escisión de la enzima ARNasa III Dicer y el silenciamiento del complejo RISC para su maduración. Estos miRNAs, una vez formados en el núcleo celular y haber pasado por la escisión de la enzima Drosha quedan con una longitud mucho más corta que los demás miRNAs y se cree que es uno de los motivos por el cual van directamente a unirse a la AGO2 para regular células dianas, además existe evidencia acumulada de que son más abundantes en eritrocitos. Ejemplo de estos miRNAs son el miR-451 y el miR-23a-3p, que intervienen en la eritropoyesis (102, 117). El esquema de biogénesis de miRNAs por vía no canónica se muestra en la [Figura 7](#).

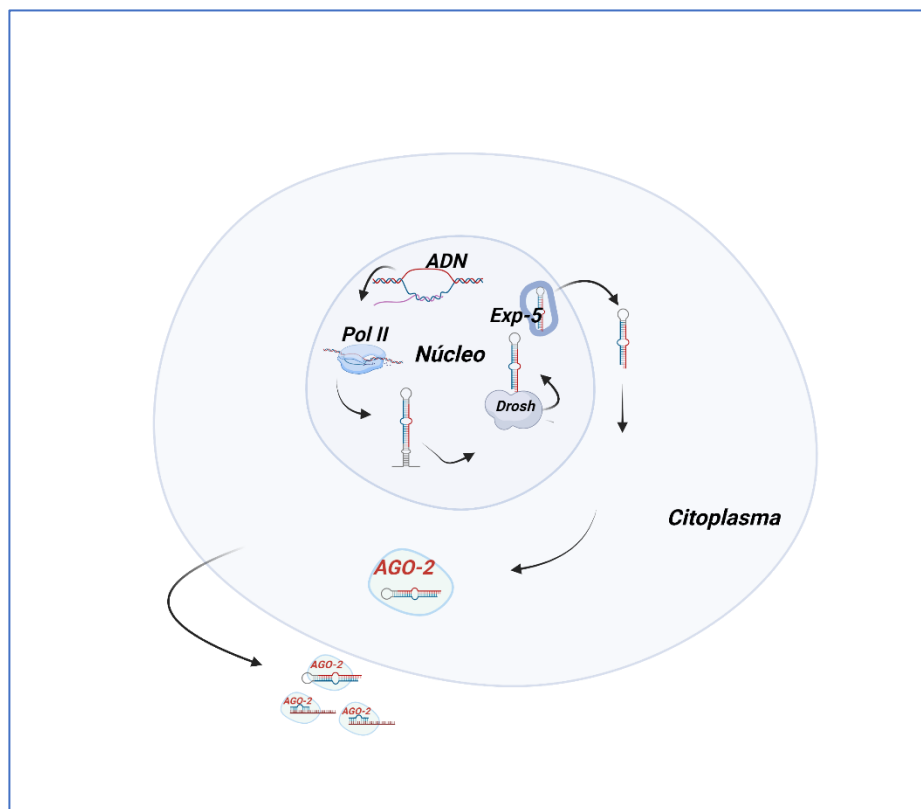


FIGURA 7. BIOGÉNESIS DE LOS MIRNAS CIRCULANTES LIBRES POR LA VÍA NO CANÓNICA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

Existe evidencia confirmada que los miRNAs son bastantes estables en los fluidos, lo que facilita su análisis. Además, cada vez se demuestra que son más específicos para algunas

enfermedades (118). Algunos miRNAs circulantes libres en suero han sido relacionados con el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, parece ser que el miR-29a-3p es un regulador negativo de la glucosa sérica. Su disminución en suero incrementa la expresión de la carboxil kinasa (PKC2) lo cual permite el aumento de la glucosa, por lo que este miRNA podría ser un regulador negativo de la glucosa en suero de mujeres gestantes (119). Al parecer otros miRNAs participan en la señalización de la insulina (miR-144, miR-146a, miR-150, miR-182, miR-30d y miR-320). Por todo ello, existen cada vez más evidencias de que los miRNAs están involucrados en la patogénesis de la diabetes y en las enfermedades metabólicas.

Los miRNAs son importantes reguladores del metabolismo y el desarrollo durante el embarazo, y se ha demostrado que desempeñan un papel en el desarrollo de la DMG. La placenta desempeña un papel importante en la adaptación metabólica de la madre al embarazo, y se cree que la expresión diferencial de los miRNAs de la placenta subyace en parte a estos cambios fisiológicos. Se ha descrito que más de 600 miRNAs se expresan en la placenta. Los miRNAs placentarios se liberan en la circulación materna y pueden ser detectados y ser útiles como biomarcadores de DMG. En el caso de la DMG, distintos miRNAs se expresan de forma diferente en las células β pancreáticas, tejidos hepáticos, muscular y el tejido adiposo de distintos modelos animales con DMG como los miR-146a, miR-21, miR-29a-3p, miR-222-3p y miR-375 (120). En humanos son muy escasos los trabajos publicados. Se ha descrito que las concentraciones en suero de los miRNAs miR-132-3p, miR-29a-3p y miR-222-3p, fueron significativamente diferentes entre la semana entre las mujeres que más tarde desarrollaban DMG y las que no, pero hay muy pocas evidencias al respecto. Las características de estos miRNAs se exponen a continuación.

1.5.1 miR-29a-3p

El miR-29a-3p (miRbase: acceso MIMAT0000086, ID hsa-miR-29a-3p) se encuentra entre los miRNAs más abundantes a nivel circulatorio y en el hígado y páncreas tanto de humanos como de ratones (115). Zhao y col, relacionan por primera vez la expresión de

miR-29a-3p circulantes en mujeres con DMG. Encontraron en una población de mujeres gestantes chinas que el miR-29a-3p estaba infraexpresado en mujeres con DMG en comparación con controles. Pfeiffer et al. observaron lo mismo en suero de mujeres sudafricanas (119, 121, 122). Sin embargo, Wander et al. no observaron diferencias en la expresión de miR-29a-3p plasmático en mujeres caucásicas con DMG en comparación con los controles (118). Curiosamente, en estudios realizados en la población caucásicas se observaron un aumento de la expresión del miR-29a-3p sólo en aquellas mujeres que presentaron DMG y fetos masculinos (123). Las diferencias en los estudios podrían justificarse por las diferencias en su etnia, en la metodología de detección, el tipo de muestras biológicas utilizadas o el control de normalización elegido. Estos autores también observaron que la disminución de su expresión en suero incrementa la expresión de la PCK2. Esta enzima regula la gluconeogénesis por factores de transcripción que regulan el RNAm. Estudios experimentales muestran como la PCK2 está relacionada con la proteína regulada de los esteroides (SREBP) por acción del gen 1 inducido de insulina (Insig1) (119), lo que permite el aumento de la glucosa en suero de mujeres gestantes al expresarse de forma anormal en adipocitos 3T3-L1 desempeñando un papel importante en la enfermedad metabólica de las mujeres embarazadas con DMG (124-126). Estudios experimentales en ratas observaron que el miR-29a-3p regula directamente la secreción de insulina a través de la Stx-1, que a su vez regula la síntesis proteica, regulando los canales iónicos y sinápticos en la membrana plasmática, que podría estar implicado en la exocitosis de la insulina así como también en el silenciamiento del Mct-1 (127). La sobreexpresión de miR-29a-3p en las células β pancreáticas provoca la regulación al alza tanto del PPAR α , NrF2 y AMPK y además aumentando los niveles de ARNm (128, 129). Hoy por hoy hay muchos estudios experimentales en animales de experimentación que evalúan los mecanismos fisiológicos de la familia de los miR-29a-3p que confirman su presencia aumentada en hígado y páncreas y que podrían apoyar tener una mayor participación en la ruta de la insulina, aunque todavía son contradictorios. El esquema de actuación de miR-29a-3p se muestra en la [Figura 8](#).

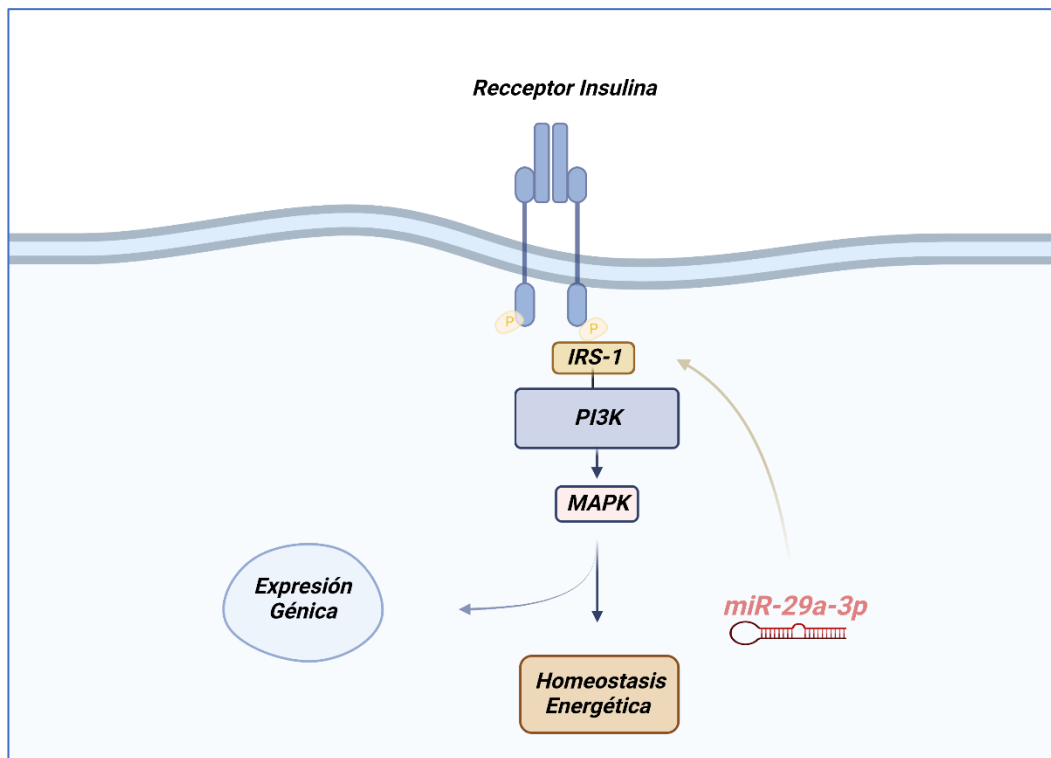


FIGURA 8. SILENCIAMIENTO DEL MIR-29A-3P Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA POR SILENCIAMIENTO DE LA MAPK QUE AFECTARÁ LA EXPRESIÓN GÉNICA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

1.5.2 miR-222-3p

El miR-222-3p (miRbase: acceso MIMAT0000279, ID hsa-miR-222-3p) se expresa en hígado, tejido adiposo y músculos esquelético. Su regulación se ha asociado con una disminución en la expresión del IRS-1. Ono et al. confirmaron que el mecanismo por el cual el miR-222-3p regula la expresión de la IRS-1 es a través de la resistencia a insulina en las células hepáticas y del tejido graso (130). En sujetos con DMG se analizó la expresión de miRNAs en el tejido omental, observándose la presencia de 17 miRNAs. De ellos, el miR-222-3p, resultó estar sobreexpresado en la DMG y su expresión estaba estrechamente relacionada con el nivel de estradiol en suero. Se ha sugerido que miR-222-3p podrá ser un potencial regulador de la expresión de ER α en la resistencia a la insulina inducida por estrógenos en la DMG y podría ser un biomarcador candidato y una diana terapéutica para la DMG (131). En estudios experimentales se ha observado que en tejido musculo esquelético, miR-222-3p regula la vía de señalización actuando

en la IRS-1, impidiendo la autofosforilación y la activación de la PI3K que inicia la traslocación de membrana que activa la vía de la GLUT4. También modula la expresión del Slc2a4 involucrado en la GLUT4 (132, 133). Zhao et al. observan un aumento de la expresión miR-222-3p circulante en la DMG. Otros estudios presentaron resultados contradictorios. Pfeiffer et al. observaron una disminución de la expresión del miR-222-3p en suero de mujeres gestantes. Tagoma et al, estudiaron la regulación de 15 miRNAs en DMG y no observaron un aumento de la expresión del miR-222-3p. Otros investigadores estudiaron la presencia y regulación del miR-222-3p y observaron que su expresión aumentaba considerablemente en las mujeres entre la semana 24-28 de gestación más que los otros miRNAs del mismo estudio en la DMG (134-136). Estos resultados sostienen que este miRNA se encuentra en una relación estrecha con las vías de señalización de insulina y podría ser un importante biomarcador de DMG. El esquema de actuación de miR-222-3p se muestra en la [Figura 9](#).

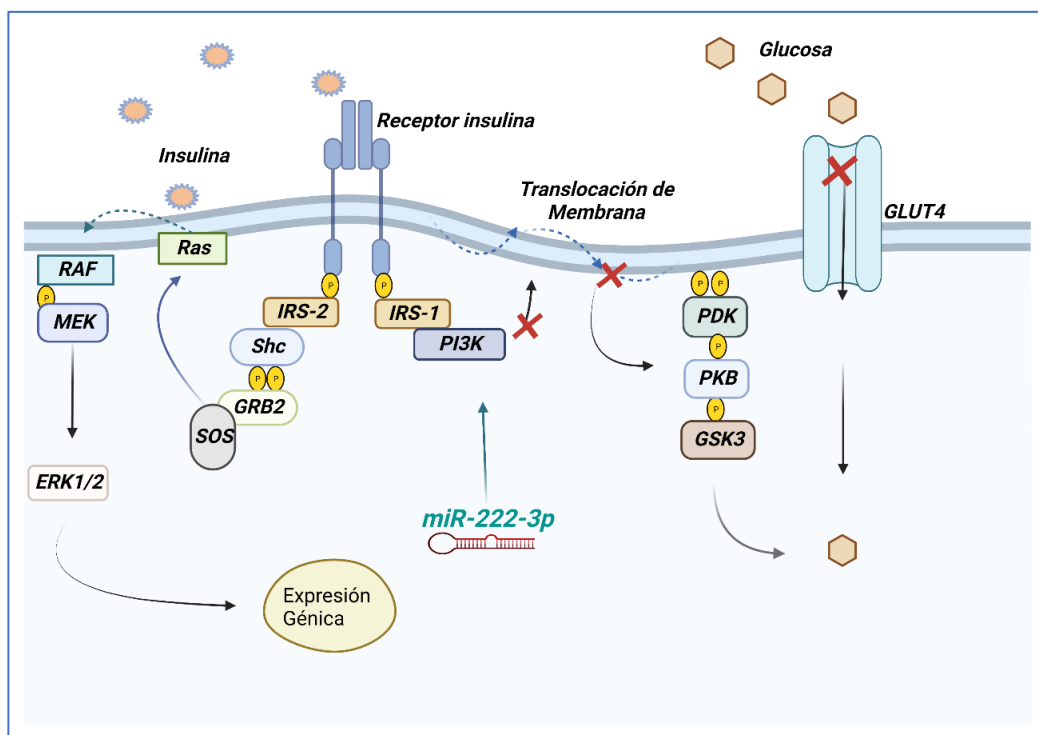


FIGURA 9. SILENCIAMIENTO E IMPLICACIÓN DEL MIR-222-3P EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

1.5.3 miR-132-3p

El miR-132-3p (miRbase: acceso MIMAT0000426, ID hsa-miR-132-3p) se encuentra en el cromosoma 17 e interactúa con el lncRNA según miRbase. Hasta ahora hay muy pocas evidencias sobre este miRNA en relación con la DMG. Zhao y col, han descrito su expresión en suero de mujeres chinas con DMG y Pfeiffer y col, en una cohorte de mujeres sudafricana con DMG y ambos observaron una disminución de su expresión en suero (137). Otros estudios han descrito disminuida su expresión en suero y tejido placentario en mujeres con DMG. Estudios experimentales de transfección celular comprobaron que este miRNA inhibía el efecto proliferativo y regulaba la apoptosis del trofoblasto (138). El miR-132-3p está siendo objeto de estudio actualmente en cáncer, enfermedades neuronales e inflamatorias, sin embargo, hay pocos estudios publicados en DMT2, sólo en animales de experimentación y no se ha podido demostrar su regulación al alza o a la baja en esta patología (139).

1.5.4 miR-103a-3p

El miR-103a-3p (miRbase: acceso MIMAT0000101, ID hsa-miR-103a-3p) se localiza en el cromosoma Chr5, región CRch28. Este miRNA juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa en la DMT2 (140). Se ha demostrado que está implicado en el metabolismo hepático y que afecta la sensibilidad de la insulina hepática provocando un desequilibrio de la homeostasis de la glucosa (141). En preadipocitos miR-103a-3p promueven la apoptosis mediada por el estrés a través de la vía Wnt3a/ β -catenina/ATF6. Se ha descrito que el aumento de miR-103a-3p en el plasma se correlacionaba negativamente con la reducción de los niveles de CAV-1 en la prediabetes y con la elevación de los niveles de SFRP4 en la DMT2, y se asociaba significativamente con el metabolismo de la glucosa, los niveles de HbA1c y otros factores de riesgo de la DMT2 que influyen en la progresión de un individuo normal a uno con pre-diabetes. Estos hallazgos sugieren que miR-103a-3p circulante puede servir como nuevo biomarcador para el diagnóstico de la DMT2, proporcionando una nueva visión de los mecanismos subyacentes a la pre-diabetes (141, 142). Sin embargo, hasta

el momento no se han publicado estudios de la relación del miR-103a-3p con la DMG. A continuación, se muestra la [Figura 10](#) que muestra la supuesta relación del miR-103a-3p en la vía de señalización.

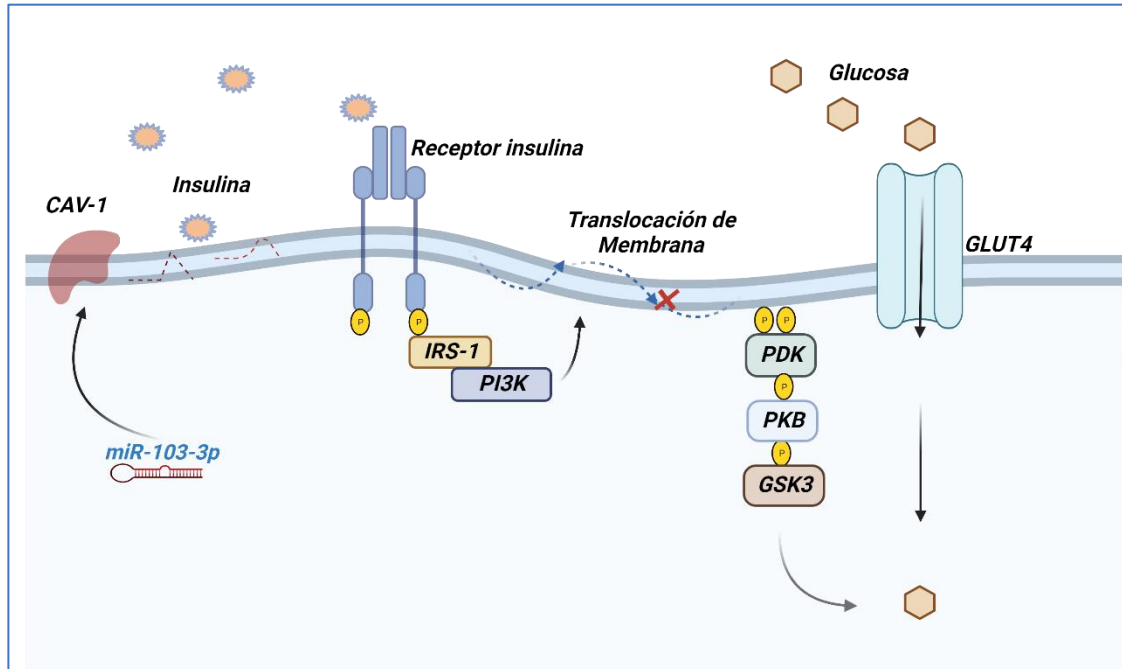


FIGURA 10. IMPLICACIÓN MIR-103A-3P EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA POR ACCIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LA CAVEOLINA 1. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

1.6 Dieta Mediterránea y DMG

Diversos estudios confirman que la incidencia de la DMG se puede reducir con una intervención nutricional, basada en la dieta mediterránea con una mayor ingesta de AOVE y pistachos. Las recomendaciones nutricionales proporcionadas en la práctica clínica limitan la ingesta de grasas para evitar un aumento excesivo del peso gestacional. Estas limitaciones incluyen las grasas trans y saturadas (143). Una dieta de estilo mediterráneo, rica en MUFA y PUFA, reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población no embarazada. Durante la gestación esta dieta tiene el potencial de mejorar los riesgos maternos y de la descendencia al prevenir la diabetes

gestacional, la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal (144). Por otra parte, una alta ingesta de verduras, frutas, nueces y legumbres se ha asociado con un menor riesgo de prematuridad, DMG, PIH gestacional, preeclampsia y menor riesgo en el feto en cuanto a su desarrollo del crecimiento (145, 146).

Diferentes mecanismos epigenéticos podrían estar implicados en estos efectos nutricionales beneficiosos. Las modificaciones epigenéticas incluyen la remodelación de la cromatina, las modificaciones de la cola de las histonas y la metilación del ADN y, más recientemente, la regulación génica postranscripcional por ARN no codificantes y los miARNs. Esto supone un vínculo entre el entorno, la nutrición y la enfermedad que se adquiere a lo largo de la vida (147).

Con respecto a los ARN no codificantes, el enriquecimiento en los hábitos alimenticios con AOVE y frutos secos puede inducir la regulación de diferentes genes a través de la modulación de ARNs exosómicos. Recientemente, algunos autores han caracterizado la modulación de los lncRNAs, mRNAs y miRNAs exosomales después de un año de adherencia a una dieta baja en grasas o a dietas de base de la DietMed enriquecidas con AOVE o con una mezcla de frutos secos. Los resultados muestran que las intervenciones dietéticas de 1 año con DietMed modulan el contenido de ARNs exosomales, afectando a un mayor número de miRNAs. La modulación de los ARNs exosómicos podría ayudar a explicar cómo la adherencia a una DietMed puede conducir a efectos beneficiosos y requiere más investigación (148).

1.6.1 Aceite Oliva Virgen Extra

El aceite de oliva extra virgen es uno de los alimentos principales de la DietMed, constituido por MUFA, compuestos fenoles que interactúan como antioxidantes, fosfolípidos y flavonas. De estos compuestos se sabe que las flavonas interactúan con diferentes miRNAs y se ha asociado con la reducción de enfermedades cardiovasculares, al disminuir la fracción de colesterol convirtiendo AOVE en alimento saludable (149, 150). Otros estudios han demostrado que un mayor consumo de alimentos ricos en

flavonas se asocia a la prevención del síndrome metabólico y DMT2 (151, 152). El principal polifenol del AOVE (hidroxitirosol) es un eliminador de ROS que reduce los niveles de LDL oxidada, disminuye la agregación plaquetaria, puede atenuar el estrés oxidativo y la señalización de mTOR implicado en el control de la transcripción de los miRNAs. Su consumo presenta propiedades beneficiosas: antiinflamatoria, antimicrobiana, y anticancerígena (153, 154).

Algunos investigadores han estudiado las interacciones de los diferentes polifenoles y grasas MUFA o PUFA y observaron la importancia de los miRNAs como moduladores de la actividad de los polifenoles de la dieta y su regulación en la expresión de varios miRNAs (155).

1.6.2 Pistachos

Los pistachos presentan un alto contenido de ácidos grasos MUFA y PUFA, con una alta composición de ácidos oleico y linoleico, fibra y además, contienen un 21 % de proteínas y una proporción de aminoácidos esenciales más alta que otros frutos secos (156, 157). Diferentes estudios “in vitro” muestran el potencial de los flavonoides en la regulación metabólica como un potente antioxidante capaz de reducir LDL y presentar un papel antiinflamatorio regulando el ARNm de la IL-6 y del TNF- α (158, 159). Otros estudios demostraron que estos flavonoides aumentaban la actividad de la GLUT4 cuando se vinculaban con la PI3K en la vía de señalización de la insulina. Otros muchos estudios han incidido en las acciones moleculares beneficiosas de los pistachos en la regulación glucémica en la diabetes mellitus (160, 161). Todos estos hallazgos sugieren que una ingesta en edad temprana de pistachos u otros frutos secos podría comportarse como efecto protector en la DMG. La evidencia acumulada confirma que la epigenética juega un papel importante y crucial en la DMG ocasionando diferentes cambios fisiopatológicos materno-fetal y cambios en la expresión génica con aumento de procesos inflamatorios y síndrome metabólico (162). Se presenta la [Figura 11](#) en la cual se observa la diafonía de las citoquinas y adipoquinas en la vía de la señalización.

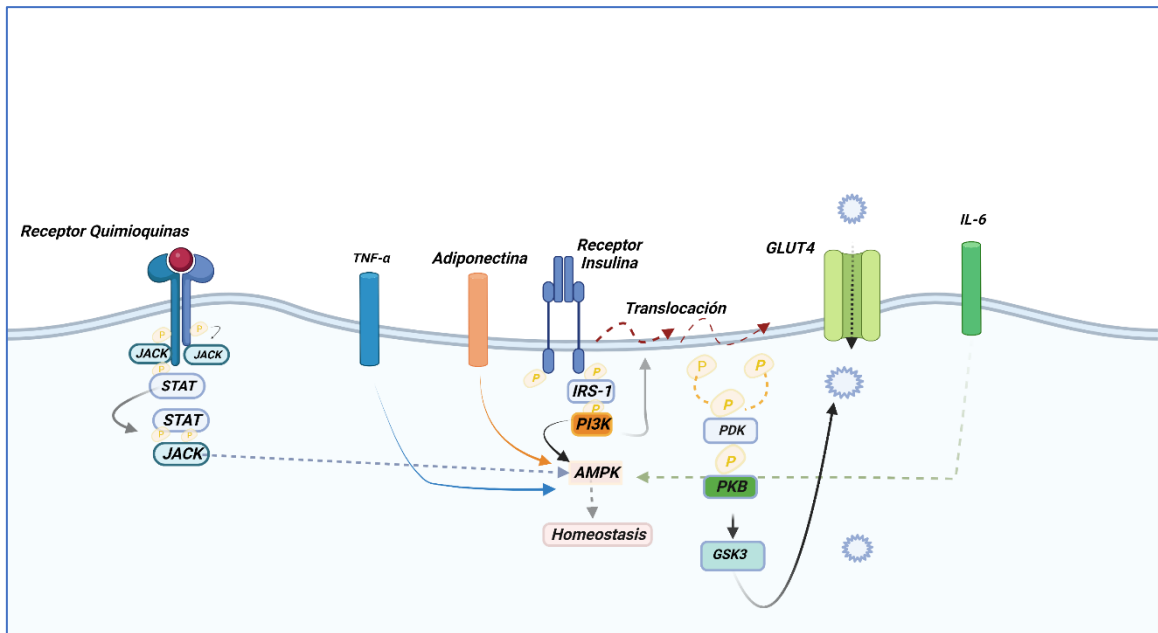


FIGURA 11. DIAFONÍA DE LAS ADIPOQUINAS Y CITOQUINAS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA. IMAGEN CREADA EN BIORENDER.

Teniendo en cuenta que se ha demostrado previamente que la adherencia a la DietMed se asocia a una reducción de la incidencia de DMG en aproximadamente un 30 %, sería interesante determinar cuáles son los mecanismos involucrados en esta reducción. Como se ha expuesto, la evidencia previa parece indicar que ciertas citoquinas, adipocinas y miRNAs participan en las vías de RI y podrían desempeñar un papel importante tanto en el desarrollo de DMG como en la reducción de su incidencia tras una intervención nutricional con DietMed. Además, teniendo en cuenta la función de los miRNAs, sería interesante valorar el mantenimiento en el tiempo de la intervención nutricional. Hasta la fecha no se han encontrado datos publicados en este campo. La disponibilidad de muestras de suero de las pacientes de la cohorte en la que se demostró previamente la reducción de la incidencia de DMG tras la intervención nutricional nos permitiría demostrar si se cumple la hipótesis que se expone a continuación.

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis:

La intervención sobre el estilo de vida basada en la introducción de una dieta mediterránea a partir de la primera visita (8-12 semana de gestación) mantenida hasta el parto, puede modificar la expresión de miRNAs, adipoquinas y citoquinas, involucrados en el desarrollo de la DMG y en el perfil de riesgo cardiovascular materno y mantenerse en el tiempo hasta los 2-3 años post parto.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general:

Investigar si existe un perfil en suero de adipoquinas (Adiponectina, Leptina), citoquinas (TNF- α , IL-6) y miRNAs circulantes (miR-222-3p, miR-103a-3p, miR-29a-3, miR-132-3p) relacionado con la aparición de DMG y con la regulación de la glucosa a los 2-3 años post parto y si este perfil puede modificarse mediante una intervención nutricional basada en la dieta mediterránea.

2.2.2 Objetivos específicos:

2.2.2.1 *Primario:*

Analizar en suero la expresión de citoquinas inflamatorias (TNF- α e IL-6), adipoquinas (leptina y adiponectina) y miRNAs (miR29, miR132 y miR222) en el primer trimestre gestacional, entre las semanas 24 y 28 coincidiendo con la sobrecarga oral de glucosa para el diagnóstico de diabetes gestacional y a los 2-3 años postparto.

2.2.2.2 *Secundario:*

Evaluar los hallazgos en citoquinas inflamatorias, adipoquinas y en la expresión de miRNAs en suero y los cambios tras la intervención nutricional con:

- La incidencia de DMG en la 24 y 28 SG
- Los cambios en HbA1c, insulina, HOMA-IR, perfil lipídico, tensión arterial en a las 24-28 SG (visita 2) y en la visita revisión a los 2-3 años postparto (Visita 3)
- La presencia de síndrome metabólico y factores de riesgo cardiovascular a los 2-3 años PP
- La composición corporal materna a los 2-3 años PP, valorada mediante la realización de impedancia multifrecuencia.
- IFG: Intolerancia a la Glucosa en Ayunas, IGT: Intolerancia a la Glucosa Regulación anormal de la glucosa

3 Metodología

3.1 Ámbito y Diseño del estudio

Este estudio se ha realizado y diseñado en el *Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid* (HCSC). Además, se ha contado con la participación de los Servicios de Análisis Clínicos y Obstetricia.

Se trata de un análisis secundario del “Estudio de prevención de la DMG en San Carlos”: un estudio de cohortes prospectivo, unicéntrico y aleatorizado con dos grupos paralelos de gestantes, diseñado para la prevención de la DMG mediante una intervención nutricional temprana basada en una MedDiet (ISRCTN84389045). Se incluyeron a todas las mujeres embarazadas seguidas en obstetricia del HCSC de Madrid (área 7). Este estudio se llevó a cabo desde enero de 2015 hasta agosto de 2016. La descripción detallada y los resultados de este estudio se han publicado previamente (163).

Para el estudio actual, se ha incluido una subcohorte de mujeres que posteriormente acudieron a una visita de seguimiento a los 2-3 años PP, entre 2017 y 2018.

El estudio fue aprobado por el *Comité de Ensayos Clínicos del Hospital Clínico San Carlos* (CI 13/296-E), Madrid, Spain y realizado según la Declaración de Helsinki. Todas las mujeres firmaron el consentimiento informado al inicio del ensayo.

3.2 Tamaño Muestral

Para la estimación del tamaño de la muestra para el objetivo principal del estudio actual se espera, basándose en una publicación previa, una media en el grupo de control entre la semana 16 y 19 del embarazo de $14,93 \cdot 10^{-5}$ para el miR-132-3p, $14,10 \cdot 10^{-5}$ para el miR-29a-3p, $3,09 \cdot 10^{-5}$ para el miR-222-3p (119). Para lograr un aumento relativo de la media de al menos un 20 % en cada uno de los miRNAs en el grupo de intervención, para un nivel de significación del 5 % y una potencia del 80 %, se necesitarían 144 mujeres en cada grupo. Con este tamaño muestral además sería posible detectar un aumento relativo de la media de adiponectina entre los dos grupos de estudio, de más del 12 % y

una disminución de la leptina del 20 %, para un nivel de significación del 5 % y una potencia del 80 %.

3.3 Sujetos

En el estudio de prevención de la DMG de San Carlos fueron evaluadas 874 gestantes. Para ese estudio, teniendo en cuenta el rechazo a la participación y pérdidas durante el seguimiento, se invitó a participar a las 1000 mujeres sucesivas que acudieron a la primera visita (visita-1) prenatal entre las 8-12 SG para garantizar una duración mínima de 3 meses de intervención. Los criterios de inclusión fueron: gestantes >18 años, niveles de glucosa <92 mg/dl en la primera consulta prenatal (entre las semanas 8-12 de gestación) y haber firmado un consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron: estar en la SG >14, los embarazos gemelares, embarazos por fecundación in vitro, la intolerancia a frutos secos o AOVE y la presencia de cualquier enfermedad médica o tratamiento farmacológico o nutricional que pudiera afectar a la intervención o al seguimiento. De las 1000 mujeres invitadas, 874 mujeres completaron el estudio: 434 en el grupo de dieta mediterránea suplementada con AOVE y pistachos y 440 en el grupo control. El procedimiento se ha especificado en publicaciones previas (163). A estas mujeres se les ofreció participar en un estudio de seguimiento, con una duración de 2 a 3 años tras el parto.

El estudio actual se ha realizado sobre una subcohorte de mujeres que cumplieron el periodo de seguimiento y asistieron a una visita a los dos a tres años del postparto, entre enero del 2017 hasta agosto 2018. El estudio de esta subcohorte también fue aprobado por el comité de *Ensayos clínicos del Hospital Clínico San Carlos (CI13/296-E)* y realizado de acuerdo con la declaración de *Helsinki*. De las 874 mujeres del estudio de prevención de DMG de San Carlos, un total de 305 mujeres que habían aceptado inicialmente participar en el estudio 175 GC y 130 GI no pudieron asistir a la visita de seguimiento de 2 a 3 años PP, ya sea por un cambio de residencia, por dificultades para contactar o por consideraciones logísticas personales, por lo que fueron excluidas del análisis. Doscientas cincuenta y seis mujeres (124/132, GC/IG) tuvieron un nuevo embarazo

antes del tercer año de seguimiento y fueron excluidas. Por último, se seleccionó para este estudio una subcohorta total de 313 mujeres (141 de CG y 172 de IG) que acudieron a la visita de seguimiento de 2-3 años y completaron el estudio. De todas ellas hubo muestras de suero disponibles obtenidas a los 8-12 SG (línea de base), 24-28 SG y 2-3 años PP. El diagrama de reclutamiento y el diagrama del protocolo de seguimiento se muestran en las Figuras 12 Y 13.

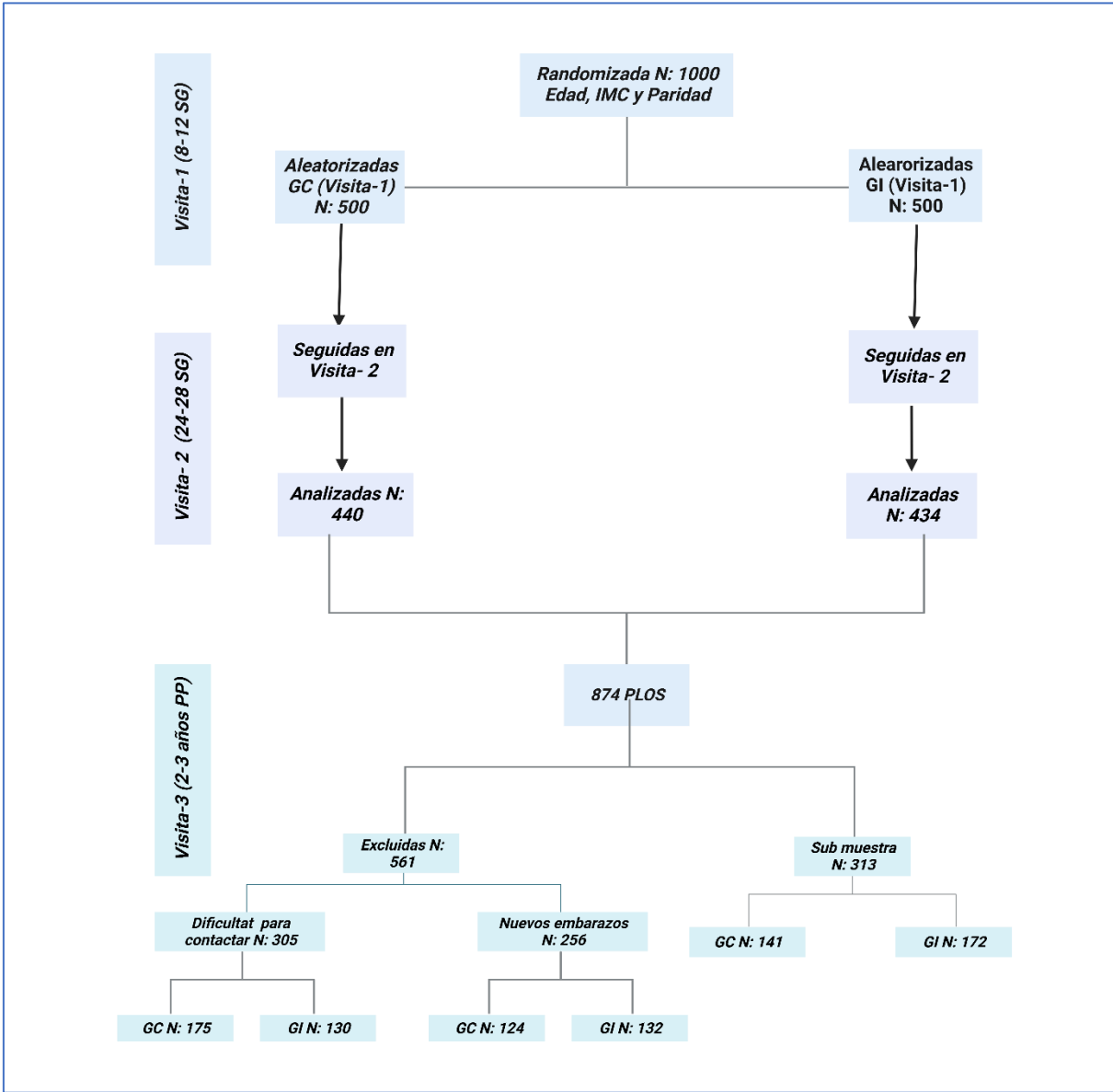


FIGURA 12. DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO DMG.

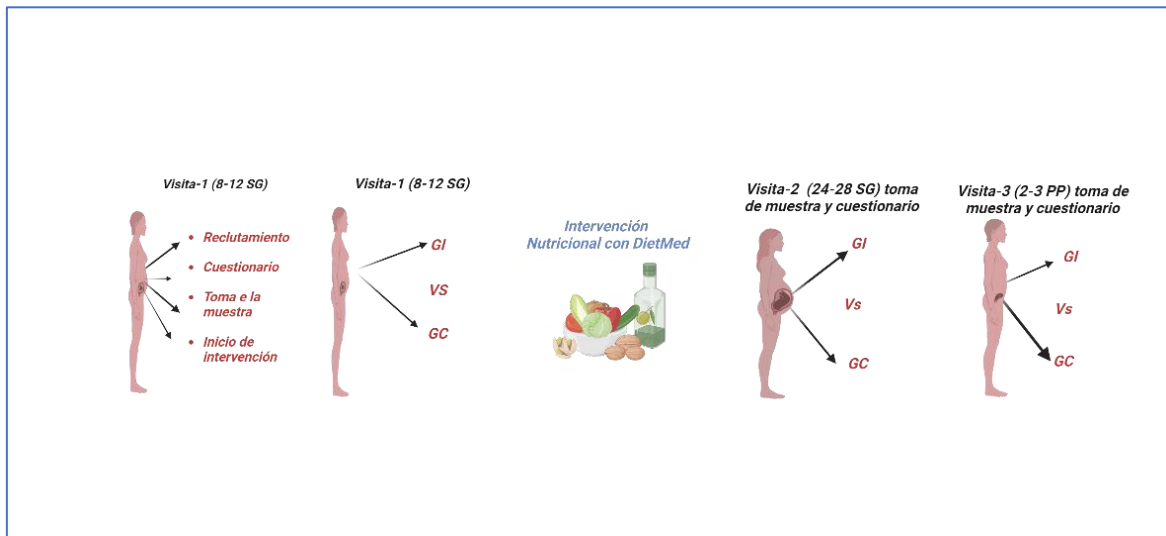


FIGURA 13. SEGUIMIENTO DEL GI Y GC

3.4 Intervención

Las mujeres fueron reclutadas a partir de su primera visita médica entre las 8 y las 12 SG Visita-1. A partir de ahí, las mujeres que finalmente fueron incluidas en el estudio fueron separadas aleatoriamente en un GC o de GI, según su edad, su origen étnico, su peso corporal antes del embarazo y paridad. A las mujeres del GI se les animó a aumentar el consumo de AOVE y pistachos, mientras que a las del GC se les aconsejó que restringieran toda la ingesta de grasas.

El cribado de la DMG se realizó a los 24-28 SG, aplicando los criterios de la IADPSG (Visita-2). Todas las mujeres inscritas en el estudio (874) fueron seguidas durante el embarazo y se les ofreció la inclusión en el programa de seguimiento. De ellas, 313 fueron evaluadas a los 2-3 años PP (Visita-3). Tras el parto, todas recibieron las mismas recomendaciones nutricionales basadas en las pautas de MedDiet.

Las mujeres elegibles fueron aleatorizadas, considerando su edad, etnia, peso corporal pregestacional y paridad, en dos grupos GC y GI a las que se les dio las siguientes indicaciones:

- GC: Las mujeres asignadas al grupo control, siguieron las recomendaciones habituales durante la gestación y fueron seguidas por el servicio de obstetricia. Las recomendaciones habituales actuales contemplan unas indicaciones para reducir el consumo de grasa total (30 %) y mantener el consumo de carbohidrato sobre un 50 % y de proteínas en un 20 %.
- GI DietMed: Las mujeres asignadas al grupo de intervención recibieron educación nutricional suministrada por una nutricionista, favoreciendo el consumo de grasa MUFA y PUFA. Se suministraron gratuitamente 1 litro de AOVE y 150 gramos de pistachos semanalmente. De forma simultánea, al igual que en el GC se recomendó incrementar el consumo de frutas enteras en lugar de zumos, cereales integrales en lugar de blancos, evitando el consumo de galletas, productos de bollería industrial, mermeladas, pan de molde y alimentos precocinados industriales. Esta intervención contiene aproximadamente entre 35-40 % de grasa, siendo > 50 % MUFA y PUFA, entre un 40 -45 % de carbohidrato con baja carga glucémica y bajo índice glucémico y mantiene un consumo de alimentos ricos en proteínas sobre el 20 % de las calorías totales, semejante al grupo GC. Las mujeres del GI fueron seguidas por el servicio de endocrinología conjuntamente en el servicio de obstetricia.

Las recomendaciones básicas fueron muy similares para los dos grupos. Se citan a continuación y se muestran en la [Figura 14:](#)

- Tomar más de 12 porciones de verduras a la semana tanto en comida y cena de forma diaria (todo tipo de verdura en cantidades ilimitadas).
- Tomar una fruta entera como postre en comida y cena todos los días (Excluyendo los zumos).

- Tomar más de 3 porciones a la semana de frutos secos.
- Mas de 6 días a la semana de consumo de aceite oliva virgen extra o ≥ 40 ml al día.
- Tomar cereales integrales en lugar de blancos, evitando el consumo de galletas, productos de bollería industrial y pan de molde.
- Realizar de forma habitual actividad física moderada (subir cuatro plantas de escaleras 4 veces al día).

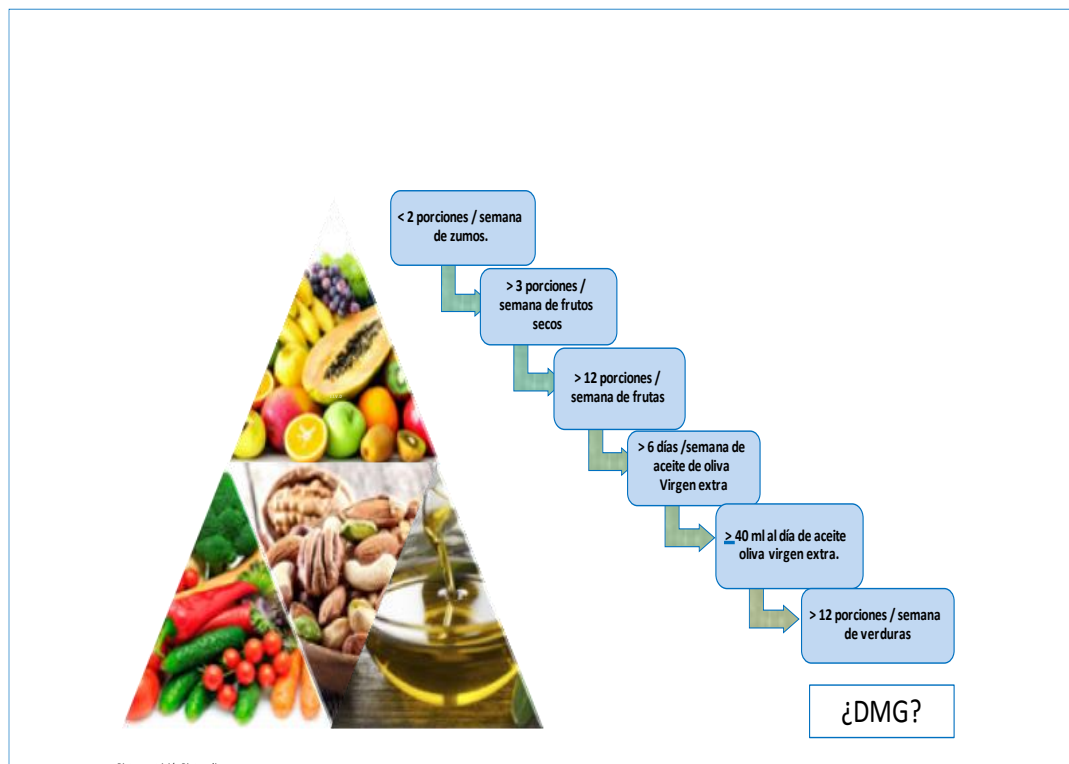


FIGURA 14. APLICACIÓN DE LAS RECOMENDACIONES ALIMENTARIAS POR SEMANA.

3.5 Variables

3.5.1 Datos Demográficos

Los siguientes datos se recopilaron en la visita inicial: edad al ingreso, etnia, antecedentes familiares de trastornos metabólicos como DMT2, antecedentes

obstétricos (abortos espontáneos y DMG), número de embarazos, nivel educativo, situación laboral, hábito tabáquico (registrando si fumaba en la actualidad o si fumaba hasta enterarse del embarazo), talla y edad gestacional al ingreso, coincidiendo con la primera ecografía. El peso corporal pregestacional fue autorreferido y el IMC se calculó como $\text{kg}/\text{altura m}^2$.

3.5.2 Datos clínicos

En cada visita se registraron datos clínicos y los siguientes datos antropométricos: Se realizó una medida del peso, medida sin zapatos y con ropa ligera y se registró el valor de la presión arterial, medida con un esfigmomanómetro de brazalete digital electrónico después de 10 minutos en posición sentada (*Omron7051T*). Sólo en la visita-3 se registró la circunferencia de la cintura y se realizó una evaluación antropométrica con el Analizador Médico de *Composición Corporal* (*SECA mCA515/514*). Este bioimpedanciómetro registra las medidas de peso, la altura y calcula parámetros derivados como la masa magra, la masa grasa, el IMC, el agua y la energía totales. Se realiza mediante pares de electrodos colocados en los pies y tres pares de electrodos para las manos.

3.5.3 Evaluación del estilo de vida

En cada visita se registró el estilo de vida de las madres. La adherencia del estilo de vida saludable (incluyendo actividad física y hábitos alimentarios saludables en general) se evaluó con el cuestionario de *Diabetes Nutrition and complication trial* (*DNCT*). Este cuestionario recoge 3 ítems sobre actividad física y 15 sobre frecuencia de consumo de alimentos. Tras la aplicación de este cuestionario, se obtuvieron una serie de patrones de alimentación y actividad física:

- **Escore de actividad física (*Physical activity score*):** Andar al menos una hora >5 días por semana; subir al menos 4 pisos de escaleras, 4 veces al día, >5 días por semana. 3 cuestiones, puntuación entre -3 y 3. Objetivo >1.

- Escore nutricional (*Nutrition score*): 12 cuestiones, puntuación entre -12 y -12. Objetivo >5.

La adherencia a la DietMed se evaluó con el cuestionario *Mediterranean Diet Adherence Screener* de 14 puntos para obtener la puntuación MEDAS, adaptado a la gestación (163-166).

3.5.4 Recogida de muestras y mediciones bioquímicas

En cada visita-1,2 y 3, se obtuvo una muestra de sangre entre las 08:00 y las 09:00 horas tras un ayuno nocturno de al menos 10 horas. La venopunción se realizó por el personal de enfermería del laboratorio del servicio de Endocrinología del Hospital Clínico San Carlos. Se recogieron diferentes muestras de sangre en apropiados tubos *vacutainer*.

Un tubo se envió inmediatamente al laboratorio central de nuestro hospital para la cuantificación bioquímica automatizada in situ de los siguientes parámetros: HbA1c, estandarizada por la *Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio*; HOMA-IR calculada como glucosa (mmol/L) x insulina (mcUI/mL) /22,7-, y glucosa en ayunas. El colesterol LDL se calculó con la fórmula de Friedewald. Los niveles séricos de colesterol-HDL se determinaron por el método de inmunoinhibición enzimática en un Olympus 5800 (*Beckman-Coulter, Brea, CA, USA*). Los niveles séricos de triglicéridos se determinaron mediante el método enzimático colorimétrico glicerol fosfato oxidasa p-aminofenazona (GPO-PAP). Un Programa de Garantía Externa de Calidad de la SEQC (*Sociedad Española de Química Clínica*) evalúa mensualmente la calidad de los métodos. También se recogió una muestra de orina de primera hora de la mañana y se almacenó a - 80°C para la posterior determinación de hidroxitirosol y γ -tocoferol en la visita inicial.

En las visitas 2 y 3 se realizó una SOG de 2 horas y 75 g. Se tomaron muestras de sangre en ayunas, a la hora y a las 2 horas. Con esta prueba se estableció el diagnóstico de DMG según la IADPSG en la visita-2 (24-28 SG). Los niveles de glucosa en ayunas y de glucosa

a las 2 horas se utilizaron para diagnosticar la intolerancia a la glucosa según las directrices de la ADA en la visita-3 (2-3 años post parto). Para la valoración de la regulación anormal de glucosa (RAG) se tomaron en cuenta los siguientes parámetros alterados: glucosa > 100 mg/dl, sobrecarga oral de glucosa > 140 mg/dl y una hemoglobina (HbA1c) de 5.7 mg/dl. El síndrome metabólico (SM) se diagnosticó de acuerdo con la definición armonizada utilizando las medidas de perímetro de cintura específicas de la población española, con 3 o más de las siguientes: perímetro de cintura (cm) ≥ 89 5, prediabetes (glucosa plasmática en ayunas (mg/dl) ≥ 100 y/o niveles de glucosa a las 2 horas >139 mg/dl y/o HbA1c (%) $\geq 5,7$), presión arterial sistólica (mmHg) ≥ 130 /presión arterial diastólica (mmHg) ≥ 85 , HDL (mg/dl) < 50, y triglicéridos (g/L) ≥ 150 (167).

Para el análisis de adipoquinas y miRNAs, se recogió otra muestra de sangre en un tubo vacutainer para obtener suero. Las muestras se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 10-30 minutos y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 rpm (1125g). Las fases superiores del suero se transfirieron a un nuevo tubo para una segunda centrifugación de 5 min a 3000g a temperatura ambiente. La superficie del suero se transfirió cuidadosamente, sin tocar el pellet, a viales separados de 1,5 ml, estériles y libres de nucleasas y pirógenos, que se almacenaron inmediatamente. Estas alícuotas de suero permanecieron congeladas a -80°C hasta que se descongelaron consecutivamente para el análisis de adipoquinas, citoquinas o miRNAs.

3.5.5 Análisis de adipoquinas, citoquinas e insulina:

Los niveles de leptina, IL-6 y TNF- α en suero se midieron simultáneamente mediante un inmunoensayo Multiplex con perlas magnéticas (*HADK2MAG-61K*, *Milliplex Map*, *Millipore CA*), y lectura de fluorescencia en un sistema *Luminex 200* (*Luminex corp. Austin TX*). Para ello se utilizó la tecnología Xmap. El sistema Luminex combina tres tecnologías xMAP: las microesferas xMAP de poliestireno de 5,6 micras rellenas de un “marcador” fluorescente. Cada microesfera tiene un espectro de fluorescencia único que detecta el sistema xMAP; el instrumento Luminex 200, basado en citometría de

flujo, que integra láseres, ópticas, fluidos y procesadores digitales de alta velocidad y el Software xPONENT®, con su protocolo de adquisición y análisis de datos. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante.

Para determinar los valores séricos de adiponectina, las muestras se diluyeron a 1:500. La concentración de adiponectina se midió por radioinmunoanálisis (RIA) disponible en el mercado (*Millipore Corporation, Linco Research, Inc, St. Charles, MO, USA.*; HADP-61HK). La sensibilidad analítica del método fue de 0,78 µg/mL, y las variaciones intraensayo e interensayo fueron de 1,8-6,2 % y 6,9-9,3 %, respectivamente. Las concentraciones de insulina sérica también se analizaron mediante RIA (Diasorin®), con un rango de 10-200 µU/ml, una sensibilidad de 3 µU/ml y un coeficiente de variación intra e interensayo del 5,5 % y el 9,7 %, respectivamente.

3.5.6 Aislamiento y análisis de miRNAs:

Para la extracción de miRNAs en suero, se descongelaron alícuotas de muestras almacenadas en frío para evitar la degradación del ARN. Se transfirieron 250 µL de suero a un nuevo tubo de recogida y se centrifugó a 3000g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se recogieron 200 µL de suero que se utilizaron para el aislamiento. El ARN se aisló utilizando el *miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), según el protocolo del fabricante, incluyendo el paso opcional de añadir en el tampón de lisis de la muestra el ARN del bacteriófago MS2 como *carrier* o portador para mejorar el rendimiento del aislamiento del ARN, y tres ARN *spike-in*, UniSP2, UniSP4 y UniSP5 como controles sintéticos de calidad del aislamiento del ARN (*miRCURY LNA RNA Spike-in kit*; cat.339390; Qiagen, Alemania). Cada muestra se diluyó finalmente en 40 µl de agua libre de nucleasas. La pureza del ARN se determinó en base a la relación entre la densidad óptica (DO) medida a 260 y 280 nm (OD260/280) y 260 y 230 nm (A260/230) en un Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*). Todas las muestras incluidas tenían valores entre 1,8 y 2,0. Las muestras se almacenaron a 80°C en alícuotas de 40 µl hasta su uso en la reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (RT-qPCR).

El análisis de la expresión de los miRNA se realizó utilizando el sistema de PCR *miRCURY LNA miRNA SYBR® Green*. Este sistema utiliza la tecnología *Locked nucleic acids* (LNA) o ácidos nucleicos bloqueados en español. Los LNA son unos análogos de ARN de alta afinidad en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" en la conformación ideal para la unión Watson-Crick. Como consecuencia de ello los oligonucleótidos de LNA presentan una gran estabilidad térmica al hibridarse a su cadena complementaria. Esto permite además que los oligonucleótidos de LNA pueden hacerse más cortos por lo que se puede mantener una temperatura de fusión o *melting temperatura* (145) elevada. Esto es importante cuando el oligonucleótido se utiliza para detectar cadenas muy pequeñas como los miRNAs. Por tanto, la incorporación de LNA en los oligonucleótidos mejora la sensibilidad y la especificidad de las reacciones.

Este sistema comprende dos reacciones sucesivas, una retrotranscripción (RT) universal y una reacción de PCR a tiempo real (RT-qPCR). Para la síntesis de ADN codificante (ADNc), se añade una cola de poli-adeninas (A) a la cadena de miRNA maduro y se sintetiza el ADNc utilizando un cebador de poli-timinas (T) con un anclaje degenerado en 3' y una caperuza universal en 5' (paso 1). A continuación, se amplifica el molde de ADNc utilizando cebadores directos e inversos específicos de miRNA y reforzados con tecnología LNA y se utiliza el reactivo SYBR® Green para la detección (paso 2). En la [Figura 15](#) se muestra un esquema del protocolo.

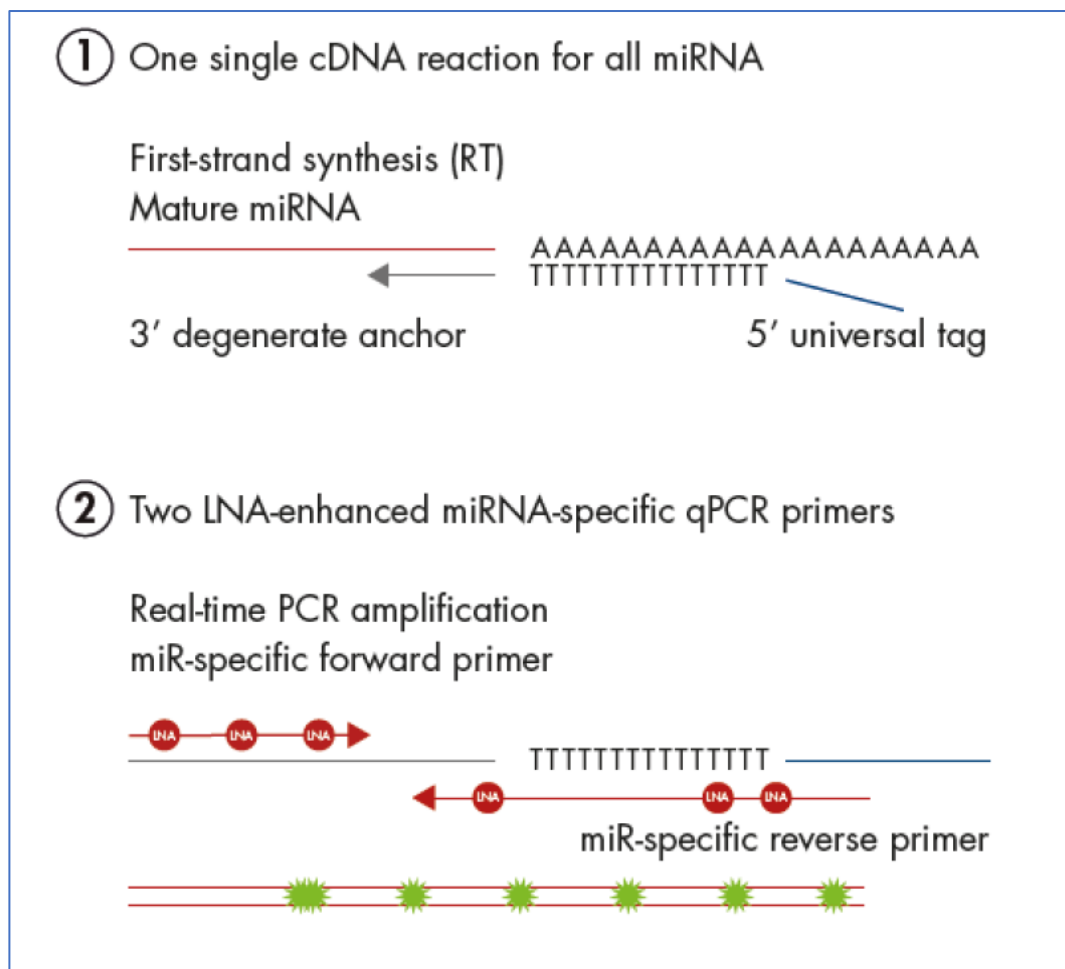


FIGURA 15. ESQUEMA DEL SISTEMA DE PCR MIRCURY LNA MIRNA SYBR® GREEN. QIAGEN®

La transcripción inversa se realizó utilizando el kit RT miRCURY LNA (Cat 339340; Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante, incluyendo un ARN endógeno (U6) como control interno de amplificación y una muestra simulada de agua en lugar de ARN como control negativo. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron utilizando el kit de PCR miRCURY LNA SYBR Green (Cat.339347; Qiagen, Alemania) en un sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems, EE.UU.). En todos los ensayos se agregaron 100 µl de reactivo ROX de fluorescencia pasiva, que no cambia con el volumen de las reacciones, por cada 10 µL de reactivo de fluorescencia SYBR Green. Las condiciones de las reacciones se muestran en la [Tabla 1](#).

TABLA 1. CONDICIONES DE REACCIÓN Y TEMPERATURAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MIRNAS

Reacción de RT		
Reactivos	Volumen (µL) en la reacción de RT para suero	
5x buffer reacción	8	
Agua Nuclease-free	15	
Enzima mix	4	
Spike in sintético, (UniSp6)	1	
Template total RNA	12	
Volumen Total	40	
Ciclos		
Temperatura	Tiempo	
Incubación 25°C	5 min	
Incubación 42°C	60 min	
Inactivación de la transcriptasa reversa 95°C	5 min	
Inmediatamente enfriar a 4°C	Infinito	
Reacción de RT-qPCR		
Reactivos	Volumen (10µl)	
SYBR® Green master mix	5	
PCR primer mix	1	
Diluted cADN template	4	
Volumen Total	10	
Ciclos		
Temperatura	Tiempo	
Activación de polimerasa y desnaturalización	95°C	10 min
	95°C	10 seg
	60°C	1 min
Amplificación 45 ciclos		
ramp/rate	1,6°C/seg	
Análisis de melting		

Todas las PCR se realizaron por triplicado excluyendo los valores atípicos si la desviación estándar (168) de los tres valores Ct superaba los 0,167. Se incorporaron a la reacción de PCR dos controles negativos, el agua en lugar del ADNc y la muestra simulada, que no generó ninguna señal. También se incluyó un calibrador interpolado en cada reacción para determinar la igualdad de rendimiento del ensayo. La presencia de hemólisis se analizó mediante la relación entre la expresión de miR-451a y miR-23a-3p. Se excluyeron las muestras hemolizadas. Las muestras se consideraron positivas si la señal de amplificación se producía en Ct < 37 (antes del 37º ciclo de umbral). Todos los cebadores se compraron a Qiagen (cat 339306; *miRCURY LNA miRNA PCR Assay*): miR-222-3p (YP00204551), miR-29a-3p (YP00204698), miR-132-3p (YP00206035), miR-103a-3p (YP00204063), miR-23a-3p (YP00204772), miR-451a (YP02119305), UniSp6 (YP00203954), UniSp5 (YP00203955) UniSp2 (YP00203950) y UniSp4 (YP00203953) (Qiagen, Düsseldorf, Alemania). Las secuencias de los cebadores utilizados y la función de los ensayos se indican en la [Tabla 2](#).

TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LA FUNCIÓN EN LA REACCIÓN, SECUENCIA DE CEBADORES, NIVEL UMBRAL Y EFICIENCIA PARA CADA ENSAYO RT-QPCR DE LOS MIRNAS UTILIZADOS

miRNA	Función	Secuencia	Umbral	Ciclos de basal	Eficiencia	R2
hsa-miR-23a-3p	Referencia. Control de hemólisis	5'-AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC-3'	0,500	3-15	2,00	1,00
hsa-miR-451a	Control de hemólisis	5'-AAACCGUUACCAUACUGAGUU-3'	1,470	3-12	2,11	0,99
hsa-miR-103a-3p	miRNA de interés	5'-AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA-3'	0,720	3-16	2,00	0,97
hsa-miR-29a-3p	miRNA de interés	5'-UAGCACCAUCUGAAAUCCGUUA-3'	1,400	3-15	1,99	1,00
hsa-miR-222-3p	miRNA de interés	5'-CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU-3'	0,390	3-15	1,99	0,99
hsa-miR-132-3p	miRNA de interés	5'-UACAGUCUACAGCCAUGGUCGC-3'	1,380	3-15	1,98	1,00

Para cada ensayo de miRNA, se estimó la eficiencia de cada una de las reacciones de amplificación utilizando el método de la curva estándar y siguiendo el método de Pfaffl. Todas las eficiencias fueron superiores a 1,99. Utilizando la curva estándar se fijó un umbral para cada reacción de miRNA en la parte lineal de la reacción. El nivel del umbral y los ciclos que indican la base de cada reacción se muestran en la [Tabla 2](#). Se eligió miR-

23a-3p como el mejor miRNA de referencia para la normalización, de acuerdo con publicaciones anteriores ya que es relativamente estable en suero y plasma y no se ve afectado por la hemólisis. La presencia de hemólisis se analizó con el software GenEx 6.0. La expresión relativa de cada miRNA en las visitas 2 y 3 se calculó con respecto a su expresión en la visita-1 utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y el método de Pfaffl (169).

3.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp)* y el *software de entorno estadístico R Jamovi (versión 2.3.18) (170)*.

Para el análisis descriptivo de los datos se examinaron las distribuciones de las variables y se representan mediante tablas. Las variables categóricas cualitativas se muestran en forma de frecuencias absolutas y porcentajes. Para la descripción de las variables cuantitativas en todos los casos se realiza la prueba de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov (KS) a fin de contrastar la hipótesis de normalidad de su distribución. En los casos en los que las variables sigan una distribución normal, para el análisis descriptivo se toma como valor resumen la media y como valor de dispersión la desviación estándar (DE). En ese caso la variable se presenta como media $\pm$ DE. Cuando la prueba de KS lleva a rechazar la hipótesis de normalidad, para la descripción de la variable se toma como valor resumen la mediana y su dispersión viene indicada por el rango intercuartílico, Q1-Q3 (RIC).

Para la comparación de variables todos los análisis primarios se realizaron por intención de tratar. Para establecer las comparaciones entre variables se utilizan las siguientes pruebas de hipótesis: para las pruebas paramétricas, la prueba de la T de Student y el análisis de la varianza ANOVA para grupos de variables con 2 y 3 categorías, respectivamente; para las no paramétricas, la prueba de la U de Mann-Whitney cuando la variable tiene dos categorías y la de Kruskal Wallis cuando la variable tiene 3 o más grupos. Para el estudio de la independencia entre dos variables cualitativas, se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). Dado que la distribución de los niveles de expresión de

miRNA en cada grupo no seguía una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica de los datos de la variable.

Se utilizó un análisis de regresión la logística binaria para explorar las asociaciones entre las posibles variables predictoras de desarrollo de DMG.

Las correlaciones entre los niveles de los cuatro miRNAs y los datos bioquímicos se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

El resultado de los contrastes realizados se indica expresando el p valor obtenido. Todas las pruebas de hipótesis realizadas fueron de tipo bilateral y se utilizó como nivel de significación el cociente $\alpha = 0,05$ (el nivel de significación se estableció en un valor $p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Análisis descriptivo y comparaciones entre las variables sociodemográficas, clínicas y bioquímicas entre grupos en la visita-1 (8-12 SG)

Las características y comparación entre los grupos de mujeres estudiadas se presentan a continuación. Las características basales y comparación entre las variables sociodemográficas, clínicas y bioquímicas entre los grupos GC y GI se muestran en la [Tabla 3](#). No se encontraron diferencias entre ambos grupos en el momento basal (Visita-1, 8-12 SG).

En la [Tabla 4](#) se muestran las características basales (Visita-1, 8-12 SG) y la comparación entre las variables sociodemográficas, clínicas y bioquímicas entre los grupos de gestantes que desarrollaron DMG frente a las que presentaron una TNG en la prueba de SOG a las 24-28 SG. Un total de 77 mujeres (24,6%) desarrollaron DMG y 236 (75,4%) fueron TNG. Del grupo que desarrolló DMG, 37 mujeres (48.1 %) pertenecían al grupo intervención y del grupo TNG, 135 (57,2%) pertenecían al grupo de intervención, no habiendo diferencias significativas en este porcentaje entre ambos grupos. Las mujeres con DMG tenían un peso corporal, IMC pregestacional y PAs mayor que las TNG. En ese momento, los niveles de TNF- α también fueron significativamente más altos en el grupo de DMG que en el de TNG (mediana pg/mL [RIC]= 3,2 [2,0-4,7] vs 2,4 [1,8-3,5]; $p<0,01$). Los niveles de adiponectina fueron menores en el grupo DMG que en el TNG (mediana [RIC] =15,3 [11,3-24,9] vs 20,0 [14,8-26,4]; $p=0,008$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativamente en las otras variables entre ambos grupos.

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en la visita-1 entre las mujeres que posteriormente fueron diagnosticadas de DMG o permanecieron TNG se realizó un análisis de regresión logística binaria incluyendo en el modelo aquellas variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas y como factor, pertenecer al GC o GI. Aunque la edad es un potente predictor de DMG no se incluyó en el modelo al no haber diferencias estadísticas entre ambos grupos en nuestra muestra. Los resultados del análisis se muestran en la [Tabla 5](#).

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS BASALES (VISITA-1) DE LAS MUJERES ANALIZADAS SEPARADAS POR GRUPOS CONTROL E INTERVENCIÓN

	GC N=141	GI N= 172	P
Edad (años)	33,6 ± 4,8	34,5 ± 4,7	0,112
Raza/Etnia			
Caucásico	85 (60,3)	113 (65,7)	0,324
Hispanico	50 (35,5)	56 (32,6)	
Otros	6 (4,2)	3 (1,8)	
Antecedentes familiares de			
Diabetes tipo 2	31 (21,9)	49 (28,5)	0,174
MetS (componentes >2)	26 (18,4)	42 (24,4)	
Historia previa de			
- DMG	7 (5,0)	6 (3,5)	0,791
-Abortos	49 (34,7)	61 (35,5)	
Situación educativa			
Educación primaria	15 (10,6)	9 (5,2)	0,109
Secundaria	67 (47,5)	73 (42,4)	
Titulación Universitaria	57 (40,4)	89 (51,7)	
Desconocida	2 (1,4)	1 (0,6)	
Empleado	105 (74,5)	140 (81,4)	0,510
Número de embarazos			
Primíparas	45 (31,9)	60 (35,1)	0,214
Segundo embarazo	49 (34,8)	73 (42,4)	
>2 embarazos	47 (33,3)	39 (22,5)	
Fumador			
Nunca	77 (54,6)	95 (55,2)	0,701
Actual	9 (6,4)	14 (8,1)	
Edad gestacional (semanas) al inicio del estudio	12,1 ± 0,6	12,1 ± 0,5	0,838
Peso corporal auto informado antes del embarazo (kg)	60,6 ± 11,0	61,2 ± 10,1	0,681
Peso corporal del embarazo a la entrada (kg)	62,8 ± 11,9	63,0 ± 10,1	0,930
Aumento de peso a 8-12 SG	2,18 ± 3,38	1,64 ± 2,79	0,128
IMC anterior al embarazo (kg/m ²)	23,1 ± 3,8	23,2 ± 3,6	0,752
TA sistólica/TA diastólica (mm Hg)	105 ± 9/63 ± 8	107 ± 11/66 ± 9	0,415/0,367
Glucosa en sangre en ayunas (mg/dl)	80,9 ± 6,4	80,8 ± 6,2	0,917
HbA1c (%)	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,2	0,563
Colesterol en ayunas (mg/dl)	175 ± 32	176 ± 27	0,725
Triglicéridos en ayunas (mg/dl)	87 ± 39	89 ± 56	0,767
Insulina plasmática en ayunas (μUI/ml)	12,3 (8,1-28,1)	11,8 (6,1-21,0)	0,09
HOMA-IR	2,6 (1,6-5,5)	2,3 (1,2-4,2)	0,089
Adiponectina (μg/ml)	20,4 (14,1-27,6)	17,7 (13,3-22,5)	0,081
Leptina (ng/ml)	7,3 (4,5-13,2)	6,5 (3,6-10,9)	0,099
IL-6 (pg/ml)	3,0 (1,5-7,3)	2,0 (0,1-4,9)	0,071
TNF-α (pg/mL)	2,9 (2,1-4,4)	2,4 (1,7-3,3)	0,071
TSH mcUI/ml	1,8 ± 1,17	1,9 ± 1,4	0,394
T4 (pg/dL)	8,7 ± 1,6	8,8 ± 1,3	0,656
Puntuación MEDAS	4,8 ± 1,7	5,1 ± 1,61	0,096
Puntuación de actividad física	-1,7 ± 1,1	-1,9 ± 1,0	0,251
Puntuación nutricional	0,9 ± 3,3	0,6 ± 3,2	0,452
DMG a 24-28 SG n (%)	40 (28,4)	37 (21,5)	0,102

Los datos se presentan como media ± DE, mediana (RIC) o número (%); Mets: Síndrome metabólico; IMC: Índice de masa corporal; SG: Semana de gestación; DMG: Diabetes mellitus gestacional; TA: Tensión arterial, IL6: interleuquina 6, TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa; T4: Tiroxina 4 Libre; puntuación MEDAS: 14 puntos Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS).; Puntuación de actividad física: (Caminar diariamente (>5 días/semana) Puntuación 0: Al menos 30 min. Puntuación +1, si >60 min. Puntuación -1, si <30 min. Subir escaleras (pisos/día, >5 días a la semana): Puntuación 0, entre 4 y 16; Puntuación +1, >16; Puntuación -1: <4)

TABLA 4. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BASALES (VISITA-1) ANALIZADAS DE LAS MUJERES CON DMG Y TNG

	DMG N=77	TNG N= 236	p
Edad (años)	34,9 ± 4,6	33,8 ± 4,8	0,056
Raza/Etnia			
Caucásico	51 (66,2)	147 (62,3)	0,132
Hispánico	24 (31,2)	82 (34,7)	
Otros	2 (2,6)	7 (2,9)	
Antecedentes familiares de			
Diabetes tipo 2	21 (27,3)	59 (25,0)	0,556
MetS (componentes >2)	16 (20,8)	52 (22,0)	
Historia previa de			
- DM gestacional	4 (5,2)	9 (3,8)	0,513
-Abortos	24 (31,2)	87 (36,8)	
Situación educativa			
Educación primaria	8 (10,4)	16 (6,8)	0,303
Secundaria	37 (48,1)	103 (43,7)	
Titulación Universitaria	31 (40,3)	115 (48,7)	
Desconocido	1 (1,3)	2 (0,8)	
Empleado	64 (83,1)	181 (76,7)	0,453
Número de embarazos			
Primíparas	29 (37,7)	76 (32,3)	0,760
Segundo embarazo	28 (36,4)	94 (40,0)	
>2 embarazos	20 (25,9)	39 (22,5)	
Fumador			
Nunca	40 (51,9)	132 (55,9)	0,843
Actual	7 (9,1)	16 (6,8)	
Edad gestacional (semanas) al inicio del estudio	12,2 ± 0,7	12,1 ± 0,5	0,135
Peso corporal antes del embarazo (kg)	63,1 ± 10,6	60,2 ± 10,4	0,036
Peso corporal del embarazo a la entrada (kg)	64,7 ± 10,7	62,3 ± 11,0	0,048
Aumento de peso a 8-12 SG	1,58 ± 2,45	1,99 ± 3,26	0,311
IMC anterior al embarazo (kg/m²)	24,2 ± 3,8	22,9 ± 3,6	0,007
TA sistólica/TA diastólica (mm Hg)	107 ± 11/66 ± 9	105 ± 9/63 ± 8	0,020/0,314
Glucosa en ayunas (mg/dl)	81,9 ± 6,2	80,5 ± 6,3	0,084
HbA1c (%)	5,2 ± 0,2	5,0 ± 0,1	0,540
Colesterol en ayunas (mg/dl)	179 ± 35	174 ± 28	0,329
Triglicéridos en ayunas (mg/dl)	96 ± 44	85 ± 50	0,139
Insulina plasmática en ayunas (μUI/ml)	11,9 (6,8-24,7)	10,8 (6,6-17,7)	0,322
HOMA-IR	2,5 (1,3-5,0)	2,3 (1,3-3,5)	0,324
Adiponectina (μg/ml)	15,3 (11,3-24,9)	20,0 (14,8-26,4)	0,008
Leptina (ng/mL)	8,8 (5,2-13,2)	6,4 (3,6-11,6)	0,099
IL-6 (pg/ml)	3,4 (0,9-7,3)	2,2 (0,1-5,7)	0,092
TNF-α (pg/mL)	3,2 (2,0-4,7)	2,4 (1,8-3,5)	0,010
TSH μUI/ml	1,84 ± 1,21	1,94 ± 1,36	0,608
T4 (pg/mL)	8,60 ± 1,39	8,76 ± 1,49	0,471
Puntuación MEDAS	5,1 ± 1,6	5,0 ± 1,7	0,665
Puntuación de actividad física	-1,9 ± 0,9	-1,8 ± 1,1	0,605
Puntuación nutricional	0,9 ± 3,0	0,7 ± 3,3	0,517
Grupo de intervención n (%)	37 (48,1)	135 (57,2)	0,102

Los datos se presentan como media ± DE, mediana (RIC) o número (%); Mets: Síndrome metabólico; IMC: Índice de masa corporal; SG: Semana de gestación; DMG: Diabetes mellitus gestacional; TA: Tensión arterial, IL6: interleuquina 6, TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa; T4: Tiroxina 4 Libre; puntuación MEDAS: 14 puntos Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS).; Puntuación de actividad física: (Caminar diariamente (>5 días/semana) Puntuación 0: Al menos 30 min. Puntuación +1, si >60 min. Puntuación -1, si <30 min. Subir escaleras (pisos/ día, >5 días a la semana): Puntuación 0, entre 4 y 16; Puntuación +1, >16; Puntuación -1: <4)

TABLA 5. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA ESTIMAR EL RIESGO DE DESARROLLO DE DMG EN EL MOMENTO DE LA VISITA-1

Predictor	Estimación	SE	Z	p	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	
						Inferior	Superior
Interceptar	-2.55	2.81	-0.90	0.366	0.08	0.00	19.50
GUPOS:							
INTERVENCION – CONTROL	-0.53	0.46	-1.13	0.258	0.59	0.24	1.47
IMC anterior al embarazo (kg/m2)	0.16	0.07	2.23	0.025	1.17	1.02	1.34
Adiponectina (mcg/mL) 12 SG	-0.09	0.04	-2.46	0.014	0.91	0.85	0.98
TNF- α (pg/mL) 8-12 SG	0.11	0.06	1.72	0.085	1.11	0.99	1.26
TAS (mmHg) 8-12SG	-0.01	0.02	-0.25	0.806	0.99	0.95	1.04

Se observó que tanto el IMC previo al embarazo como los niveles de adiponectina conferían un riesgo significativo para desarrollar DMG. Este modelo presentó un AUC de 0,75.

4.2 Modificaciones en las puntuaciones de estilo de vida a lo largo de las tres visitas

Los cambios en los patrones de nutrición y ejercicio tras la intervención nutricional se muestran en la [Tabla 6](#). Cuando se compara la puntuación entre las tres visitas, la puntuación en la escala de nutrición (*Nutrition Score*) y la puntuación *MEDAS* para valorar DietMed mejoraron significativamente en el grupo de intervención en la visita-2 (24-28 SG), tanto en las mujeres con TNG como en las de DMG, en comparación con las puntuaciones que tenían en ambas escalas antes de comenzar la intervención (visita-1), y seguían siendo significativamente más altas a los 2-3 años PP (visita-3). En el GC también mejoró significativamente la puntuación nutricional y MEDAS a los 2-3 años PP en comparación con la visita-1.

Cuando se comparó a las mujeres por grupos de GI frente a GC en cada tiempo, sólo se observaron diferencias significativas entre GI y GC en la visita-2, tanto en las mujeres

con DMG y TNG. En la tercera visita-3 a los 2-3 años PP, sólo seguía siendo estadísticamente significativa la puntuación DietMed en el GI a expensas del grupo TNG.

TABLA 6. PATRÓN DE NUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN (VISITA-2) Y A LOS 2-3 AÑOS DESPUÉS DEL PARTO (VISITA-3). DATOS POR GRUPOS DE INTERVENCIÓN Y/O TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

	Todo	Grupo de control Grupos regulación de glucosa		Todo	Grupo de Intervención Grupos regulación de glucosa	
		TNG	DGM		TNG	DGM
N	141	101	40	172	135	37
Visita-1, Pregestacional						
Puntuación nutricional	0,9 ± 3,3	0,7 ± 3,3	1.3 ± 3.4	0,6 ± 3,2	0,6 ± 3,3	0,7 ± 2,6
Puntuación de actividad física	-1.7 ± 1.1	-1.7 ± 1.1	-1.8 ± 1.0	-1.9 ± 1.0	-1.9 ± 1.0	-1.9 ± 0.9
Puntuación MEDAS	4,8 ± 1,7	4,8 ± 1,7	4,8 ± 1,8	5.1 ± 1.6	5,1 ± 1,7	5,3 ± 1,3
Visita-2, 24-28 SG						
Puntuación nutricional	1.3 ± 3.5	1.0 ± 3.2	2.2 ± 3.9	4.7 ± 3.0 ***a	4.8 ± 3.2***a	4.2 ± 2.4***a
Puntuación de actividad física	-1.8 ± 1.0	-1.7 ± 1.0	-1.9 ± 1.0	-1.9 ± 0.9	-1.9 ± 0.9	-1.9 ± 0.8
Puntuación MEDAS	4,7 ± 1,7	4,5 ± 1,6	4.9 ± 2.0	6.7 ± 1.8***a	6.7 ± 1.8***a	6.5 ± 1.7***a
Visita-3, 2-3 años PP						
Puntuación nutricional	2,8 ± 3,8 ^b	2.2 ± 3.9 ^b	3,8 ± 3,4 ^b	3.4 ± 3.6 ^b	3.2 ± 3.8 ^b	3.9 ± 3.0 ^b
Puntuación de actividad física	-1.6 ± 1.0	-1.6 ± 1.1	-1,7 ± 0,8	-1.7 ± 0.9	-1.7 ± 1.0	-1.9 ± 0.9
Puntuación MEDAS	6.1 ± 1.9 ^b	5,9 ± 1,9 ^b	6,5 ± 1,7 ^b	6.6 ± 1.9 ^{*a}	6.5 ± 1.9 ^{*a}	6.9 ± 2.0 ^a

Los datos son Media ± SDM o número (%). SG: Semana gestacional; Puntuación MEDAS: Evaluador de adherencia a la dieta mediterránea de 14 puntos; Puntuación de actividad física: Phy-Activity S; TNG: Tolerancia normal a la glucosa; DMG: Diabetes mellitus gestacional. PP: Post parto.

***, $P < 0.001$, **, $p < 0.01$ y *, $p < 0.05$, denotan diferencias entre ambas cohortes, ^a $p < 0.01$ y ^b $p < 0.05$, denotan diferencias en relación con la Visita-1.

4.3 Comparaciones clínicas y bioquímicas entre de DMG y TNG, según pertenezcan al grupo control o de intervención, en las visitas 2 (62) y 3 (2-3 años PP)

En la [Tabla 7](#) se presentan los datos y las diferencias clínicas y bioquímicas entre los DMG y TNG en las visitas 2 y 3. Como era de esperar, las mujeres con DMG tenían niveles más altos de glucosa plasmáticas basal y en los tiempos de la PTOG, valores de HbA1c, de insulina plasmática en ayunas y HOMA-IR que las mujeres con TNG en la visita-2 y continuaron siendo más altos a los 2-3 años PP. Los niveles de adiponectina fueron significativamente más bajos y los de leptina más altos en mujeres con DMG en

comparación con mujeres TNG tanto en la visita-2 como en la 3, mientras que los niveles de IL-6 y TNF- α sólo aumentaron en este grupo significativamente en la visita-3.

Para todos los miRNAs la expresión fue mayor en el grupo total de mujeres con DMG en comparación con el grupo TNG, pero sólo el miR-222-3p a los 2-3 años PP fue significativamente mayor en este grupo (DMG vs TNG, mediana [RIC] =1,45 [0,76-2,21] vs. 0,99 [0,21-1,70]; $p<0,05$).

En la [Tabla 8](#) se presentan los datos y las diferencias clínicas y bioquímicas entre los grupos GC y GI en las visitas 2 y 3. El análisis comparativo entre estos dos grupos mostró una mejora en los niveles de glucosa en ayunas y tras PTOG, así como en los valores de HbA1c en el GI en comparación con GC a las 24-28 SG. Los niveles de insulina, los valores de HOMA-IR y los niveles de IL-6 fueron significativamente más bajos en el GI en la visita-2 y se mantuvieron más bajos a los 2-3 años PP. Los niveles de leptina sólo fueron significativamente más bajos en el grupo GI frente al GC en la visita-2. La expresión de miR-222-3p y miR-103a-3p a las 24-28 SG fue mayor en el GI frente al GC tanto en la visita-2 como en la visita-3.

TABLA 7. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO DURANTE EL EMBARAZO (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS DESPUÉS DEL PARTO (VISITA-3) SEPARADO POR GRUPOS TNG Y DMG

	TNG (n=236)		DMG (n=77)	
	24-28 SG	2-3 años PP	24-28 SG	2-3 años PP
PC (Kg)	67,4 ± 10,9	63,9 ± 12,9	70,1 ± 11,0	65,4 ± 12,8
Glucosa FP (mg/dl)	83,5 ± 5,1	91,9 ± 6,1	92,6 ± 6,7***	97,4 ± 7,1***
1h PTOG (mg/dl)	118,8 ± 27,4	n.d.	159,4±33,3***	n.d.
2h PTOG (mg/dl)	104,5 ± 20,8	95,0 ± 19,4	135,1±31,3***	108,3 ±33,4**
TAS (mm Hg)	104 ± 11	111 ± 12	108 ± 11*	113 ± 10
TAD (mm Hg)	62 ± 9	71 ± 9	65 ± 8*	73 ± 8*
T-Chol. (mg/dL)	255 ± 44	176 ± 29	250 ± 46	183 ± 34
Triglicéridos (g/L)	162 ± 55	75 ± 42	168 ± 45	92 ± 55**
HbA1c-IFCC %	4,9 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5.1 ± 0.3***	5,5 ± 0,3**
TSH µUI/mL	2.0 ± 1.0	1,9 ± 1,0	2.1 ± 1.0	1,9 ± 1,0
T4 (pg/mL)	7.1 ± 1.1	8.3 ± 1.1	6,8 ± 1,0	8.1 ± 1.3
Insulina FP (µUI/ml)	9.4(7.0-12.8)	8.7 (6.7-11.9)	11.4 (8.6-16.5) ***	10.5(8.1-16.3) **
Incremento bs	5,8 ± 15,4	6.1 ± 17.5	7.1 ± 7.0*	11,1 ± 16,9*
Cambio (%)	32 ± 8	28 ± 5	30 ± 3	35 ± 4 *
HOMA-IR	1.8 (1.4-2.7)	1.9 (1.5-2.8)	2.3 (1.3-3.9) *	2.5 (1.9-3.9) *
Incremento bs	-0,7 ± 4,5	0,4 ± 5,2	0,1± 3,2*	-1.2 ± 4.4**
Cambio (%)	7 ± 4	7 ± 2	8 ± 4	20 ± 11**
Adiponectina (µg/ml)	17(13-22)	16.9(12.0-21.8)	12.9 (9.8-17.2) ***	13.7 (9.5-17.3) **
Incremento bs	-2.6 ± 7.1	-3.5 ± 7.2	-3.6 ± 6.8	-3.5 ± 6.9
Cambio (%)	11 ± 4	13 ± 4	20 ± 3	21 ± 3
IL-6 (pg/ml)	2.1 (0.1-5.1)	2.6 (0.1-6.2)	2.8 (1.3-7.3)	3.4 (1.0-10.5) *
Incremento bs	0,3 ± 7,0	-0,1 ± 13,3	0,8 ± 4,5	-0,5 ± 7,5
Cambio (%)	16 ± 48	53 ± 19	24± 21	-42 ± 19
Leptina (ng/ml)	9.6 (6.0-15.1)	6.4 (3.4-11.9)	14.6 (9.2-19.4) *	9.9 (5.6-15.3) **
Incremento bs	3,6 ± 5,8	0,2 ± 5,1	5,6 ± 6,4**	1,5 ± 7,3*
Cambio (%)	39 ± 9	2 ± 1	41 ± 7	25 ± 4*
TNF-α (pg/mL)	2.7 (1.8-3.9)	2.8 (1.9-4.2)	3.0 (2.0-4.4)	3.6 (2.5-4.6) *
Incremento bs	0,3 ± 2,2	1,8 ± 1,9	1,9 ± 1,4	1.2 ± 1.6
Cambio (%)	10 ± 9.1	19 ± 8,5	38 ± 3	31 ± 5
miR-222-3p	1.20 (0.28-1.85)	0.99 (0.21-1.70)	1.24 (0.58-2.01)	1.45 (0.76-2.21) *
miR-103a-3p	0.92 (-0.90-2.24)	1.44 (-0.21-2.53)	1.18 (-0.25-1.91)	1.58 (0.21-2.62)
miR-132-3p	0.18 (-0.35-0.85)	0.05 (-0.55-0.75)	0.18 (-0.59-0.96)	0.45 (-0.09-0.94)
miR-29a-3p	0.26 (-0.95-1.67)	0.11 (-1.07-1.54)	0.21 (-0.52-2.06)	0.38 (-0.69-1.81)

Los datos se presentan como media ± DE, mediana (RIC) o número (%); PC: Peso corporal; PTOG: Prueba de tolerancia oral a la glucosa; Glucosa FP: Glucosa basal de PTOG en ayunas; TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica; HbA1c-IFCC: Federación Internacional de Química Clínica de Hemoglobina Glicosilada; bs: desde la visita-1; Cambio (%): cambio desde visita-1; TSH: Hormona liberadora de tiroides; T4: Tiroxina libre 4, Insulina FP: Insulina plasmática en ayunas; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance Index; PG: Peso gestacional; PP: Postparto; CC: Circunferencia de la cintura; IMC: Índice de masa corporal IL-6: Interleuquina 6; TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa; miR: microARN.

* p <0,05; **p<0.01; y *** p <0,001, denotan diferencias entre ambas cohortes

TABLA 8. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO DURANTE EL EMBARAZO (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS DESPUÉS DEL PARTO (VISITA-3) SEPARADO POR GRUPOS GC Y GI

	GRUPO CONTROL (n=141)		GRUPO INTERVENCIÓN (n=172)	
	24-28 SG	2-3 años PP	24-28 SG	2-3 años PP
PC (Kg)	68,1 ± 11,8	64,4 ± 14,6	68,1 ± 10,3	64,2 ± 11,2
Glucosa FP (mg/dl)	86,3 ± 6,7	93,6 ± 6,9	85,3 ± 6,8*	92,9 ± 6,7
1h PTOG (mg/dl)	126,8 ± 31,3	n.d.	124,2 ± 33,5*	n.d.
2h PTOG (mg/dl)	110,0 ± 27,0	95,0 ± 23,7	109,6 ± 24,5	99,3 ± 25,7
TAS (mm Hg)	104 ± 11	111 ± 12	105 ± 12	112 ± 12
TAD (mm Hg)	62 ± 9	71 ± 8	63 ± 9	71 ± 9
T-Chol. (mg/dL)	250 ± 47	174 ± 29	257 ± 42	180 ± 31
Triglicéridos (g/L)	162 ± 52	83 ± 43	164 ± 54	76 ± 49
HbA1c-IFCC %	5,1 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,0 ± 0,3*	5,3 ± 0,3
TSH µUI/mL	1,9 ± 1,0	1,9 ± 1,1	2,1 ± 0,9	1,9 ± 0,9
T4 (pg/mL)	7,2 ± 1,1	8,3 ± 1,1	7,0 ± 1,1	8,1 ± 1,3
Insulina FP (µUI/ml)	10,8 (8.3-15.7)	10,2 (7.7-14.2)	9,0 (6.8-12.0) ***	8,6 (6.7-11.6) **
Incremento bs	6,5 ± 13,2	8,6 ± 20,2	5,9 ± 14,4	6,2 ± 14,9
Cambio (%)	34 ± 6	34 ± 5	29 ± 7	26 ± 4
HOMA-IR	2.3 (1.7-3.3)	2.3 (1.7-3.4)	1.9 (1.4-2.6) *	1.9 (1.5-2.8) *
Incremento bl	0,7 ± 4,7	0,1 ± 5,9	0,5 ± 3,9*	-0,1 ± 4,2*
Cambio (%)	9 ± 7	5 ± 8	7 ± 3	-6 ± 9 *
Adiponectina (µg/ml)	17,0 (12.1-23.0)	16,2 (11.2-22.6)	15,5 (12.3-18.8)	15,3 (11.2-18.9)
Incremento bs	-2,9 ± 7,1	-3,8 ± 7,8	-2,5 ± 6,9	-3,0 ± 6,1
Cambio (%)	-10 ± 3	-10 ± 4	-10 ± 3	-10 ± 3
IL-6 (pg/ml)	2,9 (1,9-7,1)	3,0 (1,7-7,5)	1,3(0-4,8)***	1,6 (0,1-6,9) **
Incremento bs	0,8 ± 5,7	0,3 ± 8,2	-1,1 ± 7,1	-0,8 ± 15,0
Cambio (%)	16. ± 48,4	36,8 ± 19,3	24 ± 21,4	65 ± 21,7
Leptina (ng/mL)	11,8 (7,6-19,5)	7,5 (3,4-15,3)	9,5 (6,3-14,7) **	7,4 (4,2-11,5)
Incremento bs	5,0 ± 6,6	0,5 ± 6,6	3,1 ± 5,2**	0,6 ± 4,8*
Cambio (%)	9 ± 2	2 ± 1	8 ± 2	4 ± 10
TNF-α (pg/mL)	2,9 (1,9-4,5)	3,3 (2,2-4,4)	2,7 (1,8-3,6)	2,8 (1,8-4,2)
Incremento bs	1,9 ± 2,5	1,1 ± 1,2	0,9 ± 1,9	0,8 ± 2,3
Cambio (%)	-8 ± 9	-10 ± 6	25 ± 2	27 ± 4
miR-222-3p	1,04 (-0,5-1,93)	0,85 (-0,11-1,64)	1,29 (0,71-1,87) ***	1,11 (0,62-1,98) ***
miR-103 a-3p	-0,12 (-1,48-1,20)	0,35 (-0,92-1,80)	1,57 (0,41-2,47) ***	2,02 (0,52-2,80) ***
miR-132-3p	0,25 (-0,2-0,89)	0,34 (-0,1-0,81)	0,17 (-0,51-0,83)	-0,03 (-0,58-0,86)
miR-29a-3p	0,09 (-0,82-1,43)	0,28 (-0,75-1,41)	0,29 (-1,01-1,93)	0,06 (-1,14-1,77)

Los datos se presentan como media ± DE, mediana (RIC) o número (%); PC: Peso corporal; PTOG: Prueba de tolerancia oral a la glucosa; Glucosa FP: Glucosa basal de PTOG en ayunas; TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica; HbA1c-IFCC: Federación Internacional de Química Clínica de Hemoglobina Glicosilada; bs: desde la visita-1; Cambio (%): cambio desde visita-1; TSH: Hormona liberadora de tiroides; T4: Tiroxina libre 4, Insulina FP: Insulina plasmática en ayunas; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance Index; PG: Peso gestacional; PP: Postparto; CC: Circunferencia de la cintura; IMC: Índice de masa corporal IL-6: Interleuquina 6; TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa; miR: microARN. * p < 0,05; ** p < 0,01; y *** p < 0,001, denotan diferencias entre ambas cohortes

Teniendo en cuenta las diferencias obtenidas entre los grupos GC y GI y grupo de TNG y DMG, se realiza un análisis comparativo sólo de aquellas variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, en la visita-2 y 3, pero separado ahora por los 4 grupos que se forman en combinación: mujeres del grupo control y que permanecen TNG (GC/TNG; n=101), del grupo control y que desarrollan DMG (GC/DMG; n= 40), del grupo de intervención y que permanecen TNG (GI/TNG; n=135) y del grupo de intervención que desarrollan DMG (GI/DMG; n=37). Se realiza un análisis comparativo de Kruskal Wallis y un análisis *post-hoc* de comparaciones dos a dos de *Dwass-Steel-Critchlow-Fligner* entre los grupos. Para demostrar la hipótesis del estudio y valorar el efecto de la intervención, se muestran las comparaciones dos a dos entre los grupos GC/TNG vs GC/DMG y GI/TNG vs G/DMG en la [Tabla 9](#). El resto de las comparaciones dos a dos estadísticamente significativas y relevantes para el estudio se refieren en el texto.

Tanto en el grupo control como en el de intervención, se encontraron diferencias significativas entre DMG y TNG, en todos los valores de glucosa plasmática de la PTOG en la 24-28 SG, tal y como era de esperar, pues es la prueba que define los criterios clínicos.

A los dos- tres años PP existen también diferencias entre las que tuvieron DMG y las que no en la PTOG, entre GC y GI, pero sólo en los niveles basales de glucosa. En el GI, a los dos años PP, los niveles de glucosa basal en el grupo DMG fueron menores (mediana [RIC]= 96,0 [94,0-99,0]) que los de DMG del GC (mediana [RIC]= 98,5; [93,0-102,3]), pero el análisis comparativo dos a dos DSCF GC/DMG vs GI/DMG no reveló diferencias estadísticamente significativas entre ellos (p=0,697).

Con respecto a la insulina y HOMA-IR no se encontraron diferencias entre DMG y TNG en el GC en la SG 24-28, pero sí en el GI. El análisis comparativo dos a dos DSCF reveló además una diferencia estadísticamente significativa a expensas de la mejoría en el

grupo TNG (mediana [RIC] GC/TNG vs GI/TNG= 10,7 [8,1-13,8] vs 8,6 [6,5-11,4], $p<0,001$). A los 2-3 años PP, el análisis comparativo dos a dos DSCF reveló una diferencia entre GC/TNG vs GI/TNG en HOMA-IR e insulina, pero no llegó a alcanzar la significación ($p=0,007$ y $p=0,062$ respectivamente).

A las 24-28 SG, las diferencias en los niveles de adiponectina entre NGT y DMG se mantienen con independencia de grupo GC o GI. Los niveles de leptina en todo el grupo de GI fueron menores que en GC, poniéndose de manifiesto en ese grupo las diferencias entre DMG y TNG. No se encontraron diferencias entre DMG/TNG dentro del GC o GI ni en leptina ni en adiponectina a los 2-3 años PP.

Con respecto a la IL-6, las diferencias estadísticas encontradas en la prueba de kruskal-wallis, al hacer las diferencias dos a dos DSCF demuestran que las diferencias encontradas tanto en la SG 24-28 como a los 2-3 años es a expensas de la mejoría en el grupo TNG (24-28 SG mediana [RIC] GC/TNG vs GI/TNG= 3,2 [1,9 -5,9]) vs 1,0 (0,0-4,0), $p<0,001$; 2-3 años PP mediana [RIC] GC/TNG vs GI/TNG= 2,9 [1,6 -6,5] vs 1,1 [0,0-4,9], $p<0,001$.

En el caso de $\text{TNF-}\alpha$ se observa que al separar el análisis en los cuatro grupos desaparece la asociación estadística con DMG a los dos años encontrada previamente, aunque alcanza casi la significación ($p=0,063$)

Con respecto a los miRNAs, se encontró una diferencia estadísticamente significativa de los miR-222-3p y miR-103a-3p entre TNG y DMG sólo en el GC a las 24-28 SG y a los 2-3 años. En el GI desaparecen estas diferencias. Al hacer las diferencias dos a dos DSCF se demuestra que existe también una diferencia estadísticamente significativa en ambos miRNAs, a las 24-28 SG y a los 2-3 años PP, entre GC/TNG y GI/TNG. Estas comparaciones se muestran en la [Tabla 10](#).

TABLA 9: ANÁLISIS COMPARATIVO DE KRUSKAL WALLIS CON ANÁLISIS POST-HOC DE COMPARACIONES DOS A DOS DE DWASS-STEEL-CRITCHLOW-FLIGNER ENTRE DMG Y TNG DENTRO DE LOS GC O GI (4 GRUPOS); DURANTE EL EMBARAZO (VISTA 2) Y A LOS 2-3 AÑOS DESPUÉS DEL PARTO (VISITA-3)

	GC / TNG (n=101)	GC / DMG (n=40)	DSCF		GI / TNG (n=135)	GI/DMG (n=37)	DSCF		Kruskal-Wallis sig
	Median	Median	W	p	Median	Median	W	p	
Glucosa FP (mg/dl) 24 SG	84,0 (81,0 - 88,0)	93,0 (90,3- 96,0)	8,6	< ,001	83,0 (80,0- 86,0)	94,0 (89,0-98,0)	10,4	< ,001	< ,001
1 h PTOG (mg/dl) 24 SG	119,0 (97,8 - 140,0)	155,0 (129,0- 180,3)	6	< ,001	116,5 (101,0- 134,5)	163,0 (153,5- 183,3)	8,1	< ,001	< ,001
2 h PTOG (mg/dl) 24 SG	101,0 (86,0 - 115,0)	149,5 (119,0- 165,0)	7,2	< ,001	106,0 (91,0- 118,8)	133,0 (112,0- 153,5)	5,3	0,00	< ,001
Glucosa FP (mg/dl) 2-3 años PP	92,0 (88,0 - 95,0)	98,5 (93,0- 102,3)	6,6	< ,001	92,0 (87,0- 96,0)	96,0 (94,0-99,0)	4,8	0,00	< ,001
2 h PTOG (mg/dl) 2-3 años PP	94,5 (82,8 - 106,5)	99,0 (87,0- 110,0)	1,2	0,80	93,0 (83,0- 106,0)	104,0 (86,0- 130,0)	3,2	0,10	0,10
Insulina FP (mcU/ml) 24 SG	10,7 (8,1-13,8)	12,1 (9,5 -16,7)	2,1	0,50	8,6 (6,5-11,4)	10,3 (8,3- 14,9)	4,4	0,00	< ,001
Insulina FP (mcU/ml) 2-3 años PP	9,8 (7,2-13,7)	10,6 (8,5-16,1)	2,4	0,30	8,2 (6,5-11,1)	9,9 (7,5-14,4)	3,1	0,13	0,00
HOMA-IR 24-28 SG	2,2 (1,7-3,0)	2,8 (2,1- 4,1)	3,2	0,10	1,7 (1,3-2,3)	2,5 (2,0-3,6)	6,1	< ,001	< ,001
HOMA-IR 2-3 años PP	2,2 (1,7 -3,1)	2,7 (2,1- 3,9)	3,1	0,10	1,9 (1,5-2,7)	2,3 (1,8-3,2)	3,6	0,10	< ,001
TAs (mm Hg) 24-28 SG	102,0 (94,0 - 108,0)	106,0 (99,8- 112,3)	3,3	0,10	103,0 (97,0- 110,0)	108,0 (99,8- 113,0)	2,7	0,20	0,00
TAd (mm Hg) 24-28 SG	60,0 (54,0- 67,0)	64,0 (60,0- 73,0)	4,2	0,00	62,0 (57,0- 69,8)	63,0 (59,0-69,0)	1,1	0,90	0,00
Adiponectina (mcg/mL) 24-28 SG	18,2 (13,4 - 23,8)	13,9 (9,7-20,0)	-3,8	0,00	16,2 (13,7- 21,4)	12,1 (10,2-15,8)	-4	0,00	< ,001
Adiponectina (mcg/mL) 2-3 años PP	17,6 (12,1 - 23,0)	13,2 (9,9-17,1)	-3,4	0,10	15,7 (11,6- 19,7)	14,0 (9,5- 16,6)	-2,9	0,20	0,00
Leptina (ng/ml) 24-28 SG	11,3 (6,8 -18,2)	15,4 (9,7-20,5)	3,4	0,10	8,7 (5,2-13,26)	13,5 (9,2- 17,8)	4,2	0,02	< ,001
Leptina (ng/ml) 2-3 años PP	6,0 (3,2 -13,8)	10,4 (4,0-16,4)	2,8	0,20	7,1 (3,7-10,1)	9,5 (5,7- 13,3)	3,1	0,10	0,00
IL-6 (pg/mL) 24-28 SG	3,2 (1,9 -5,9)	2,8 (1,8- 7,1)	-0,5	1,00	1,0 (0,0-4,0)	3,0 (1,1- 7,6)	3,6	0,10	< ,001
IL-6 (pg/mL) 2-3 años PP	2,9 (1,6 -6,5)	3,4 (2,2- 9,0)	1,5	0,70	1,1 (0,0-4,9)	2,9 (0,2- 11,5)	2,5	0,30	0,00
TNF-α (pg/mL) 24-28 SG	2,75 (1,77- 4,26)	3,06 (2,07- 5,08)	1,85	0,55	2,52 (1,75- 3,56)	3,01 (2,13-3,83)	1,73	0,612	0,145
TNF-α (pg/mL) 2-3 años PP	2,89 (2,04- 4,29)	3,71 (2,71- 4,64)	2,7	0,22	2,69 (1,87- 4,02)	3,42(1,87-4,46)	1,48	0,72	0,063
Log2 miR-222-3p 24-28 SG	0,1 (-1,3 -1,8)	1,4 (1,1- 2,1)	4,1	0,00	1,3 (0,8-1,9)	1,1 (0,3 -2,0)	-1,4	0,80	< ,001
Log2 miR-222-3p 2- años PP	0,4 (-0,6-1,5)	1,5 (0,8- 2,3)	4,4	0,00	1,1 (0,6-2,0)	1,2 (0,6- 2,1)	0,8	0,90	< ,001
Log2 miR-103a-3p 24-28 SG	-0,9(-1,7 -0,9)	1,1 (-0,1-1,6)	4,4	0,00	1,7 (0,5-2,5)	1,3 (-0,3- 2,5)	-1,3	0,80	< ,001
Log2 miR-103a-3p 2-3 años PP	-0,2 (-1,2 -1,1)	1,6 (0,3- 2,3)	4,8	0,00	2,0 (0,7-2,8)	1,3 (-0,3- 3,0)	-1,2	0,80	< ,001

Kruskal-Wallis entre los 4 grupos; DSCF: Comparaciones dos a dos Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

TABLA 10: ANÁLISIS POST-HOC DE COMPARACIONES DOS A DOS DE DWASS-STEEL-CRITCHLOW-FLIGNER EN LA EXPRESIÓN DE MIR-222-3P Y MIR-103A-3P ENTRE 4 GRUPOS COMBINADOS DURANTE EL EMBARAZO (VISTA 2) Y A LOS 2-3 AÑOS DESPUÉS DEL PARTO (VISITA-3)

		miR-222-3p 24-28 SG		miR-222-3p 2-3 años PP		miR-103a-3p 24-24 SG		miR-103a-3p 2-3 años PP	
Grupos comparación		W	p	W	p	W	p	W	p
GC/TNG	GC/DMG	4.05	0.022	4.38	0.011	4.44	0.009	4.80	0.004
GC/TNG	GI/TNG	5.91	< .001	4.92	0.003	9.08	< .001	8.39	< .001
GC/DMG	GI/DMG	-1.37	0.769	-0.45	0.989	1.10	0.866	0.39	0.993
GI/TNG	GI/DMG	-1.40	0.754	0.76	0.949	-1.26	0.809	-1.22	0.825

GC: Grupo control; GI: Grupo de intervención; TNG: Tolerancia normal a la glucosa; DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

A continuación, se muestran los diagramas de caja/violín para comparaciones no paramétricas entre sujetos en todos los niveles de las variables de agrupación DMG/TNG y GC/GI. Se muestran los estadísticos y los gráficos de la prueba de Wilcoxon Mann Whitney, a lo largo de los dos tiempos, 24-28 SG (visita-2) y 2-3 años PP (visita-3) para las variables cuya diferencia fue estadísticamente significativa. Se observa que las diferencias en insulina y HOMA-IR entre DMG y TNG en el grupo de intervención a las 24-28 SG y a los 2-3 años se asocian a una mejoría a expensas del grupo TNG (Figuras 16 Y 17). Los niveles de adiponectina son siempre y en todos los tiempos menores en el grupo de DMG, con independencia de la intervención. Lo contrario sucede para la leptina (Figuras 18 Y 19). Existen diferencias entre DMG y TNG en IL-6 en el grupo de intervención, a expensas de la mejoría en el grupo TNG. Esta diferencia es estadísticamente significativa a la 24-28 SG y casi alcanza la significación a los 2-3 años PP (Figura 20).

Con respecto a los dos miRNAs, se observa que en el grupo de intervención desaparece la diferencia significativa que existía entre GDM y TNG en el grupo control, a expensas de un aumento relativo de la expresión en el grupo de TNG. Esta circunstancia se mantiene hasta los 2-3 años PP (Figuras 21 Y 22).

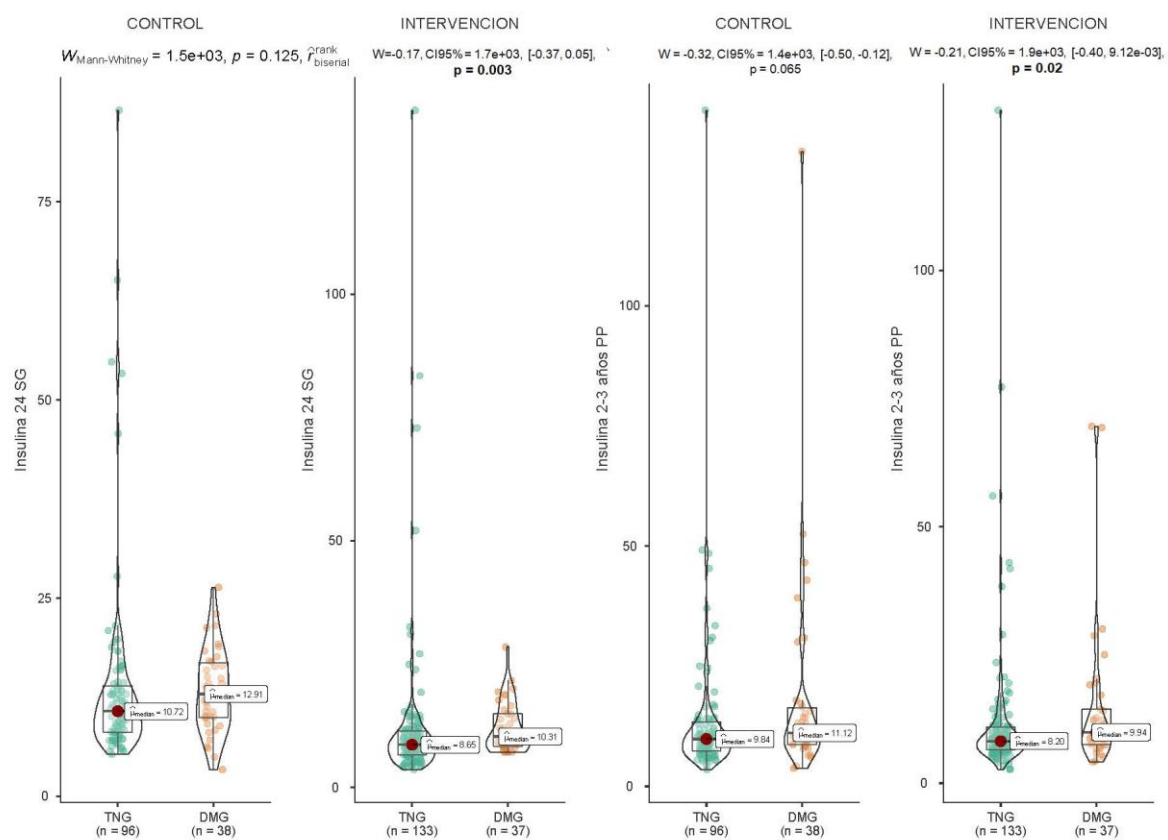


FIGURA 16. DIAGRAMAS DE CAJA/VOLÍN Y ESTADÍSTICOS PARA COMPARACIONES ENTRE DMG/TNG Y GC/GI DE INSULINA BASAL LO LARGO DE LOS DOS TIEMPOS, 24-28 SG (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS PP (VISITA-3)

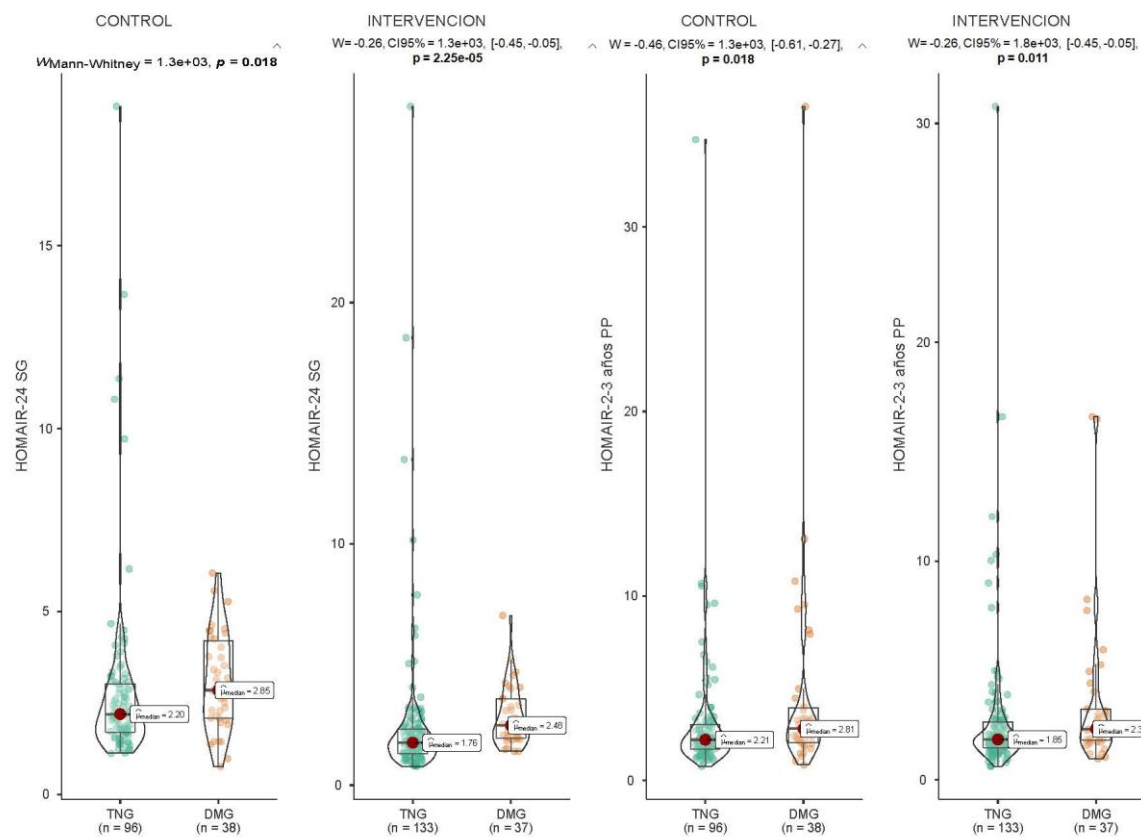


FIGURA 17. DIAGRAMAS DE CAJA/VIOLÍN Y ESTADÍSTICOS PARA COMPARACIONES ENTRE DMG/TNG Y GC/GI DE HOMA-IR A LO LARGO DE LOS DOS TIEMPOS, 24-28 SG (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS PP (VISITA-3)

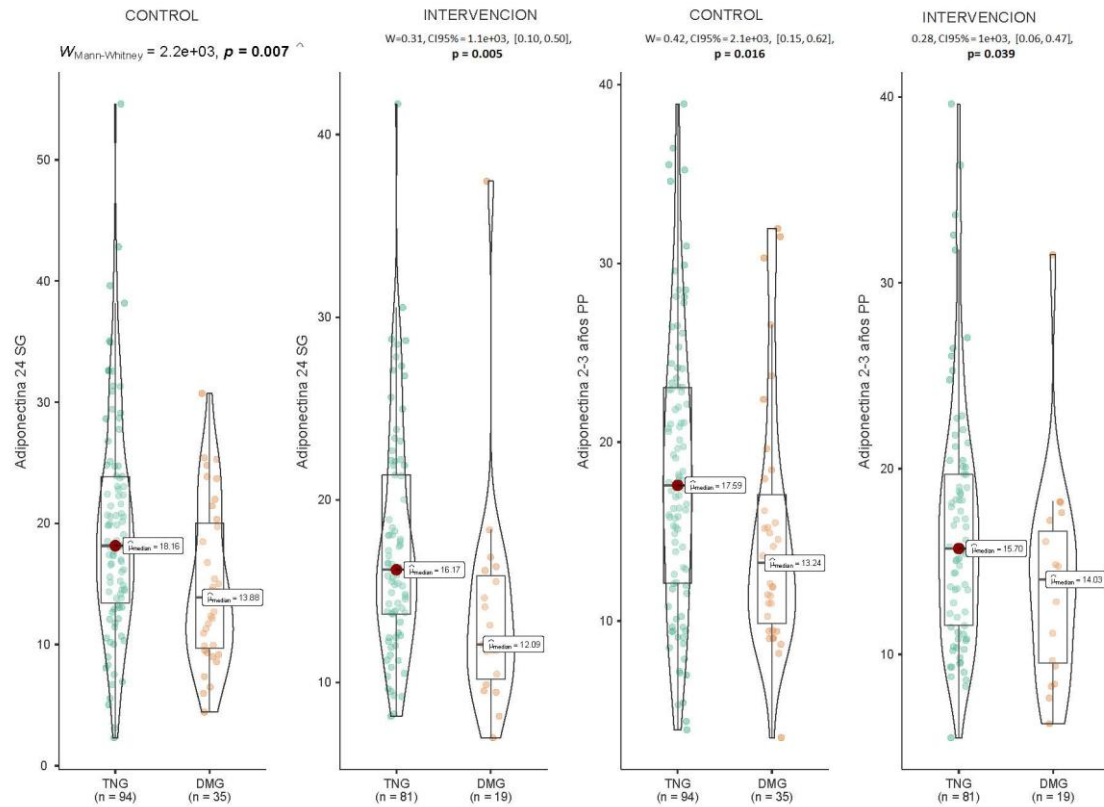


FIGURA 18. DIAGRAMAS DE CAJA/VIOLÍN Y ESTADÍSTICOS PARA COMPARACIONES ENTRE DMG/TNG Y GC/GI DE ADIPONECTINA A LO LARGO DE LOS DOS TIEMPOS, 24-28 SG (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS PP (VISITA-3)

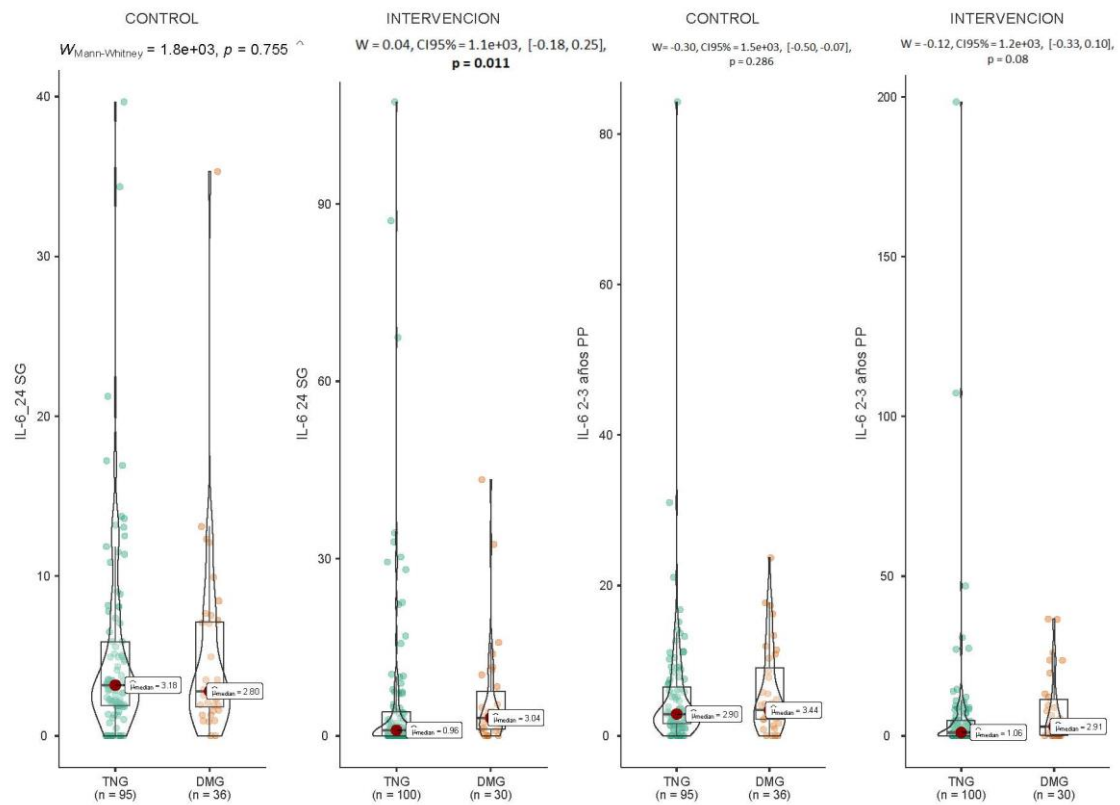


FIGURA 20. DIAGRAMAS DE CAJA/VIOLÍN Y ESTADÍSTICOS PARA COMPARACIONES ENTRE DMG/TNG Y GC/GI DE IL-6 A LO LARGO DE LOS DOS TIEMPOS, 24-28 SG (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS PP (VISITA-3)

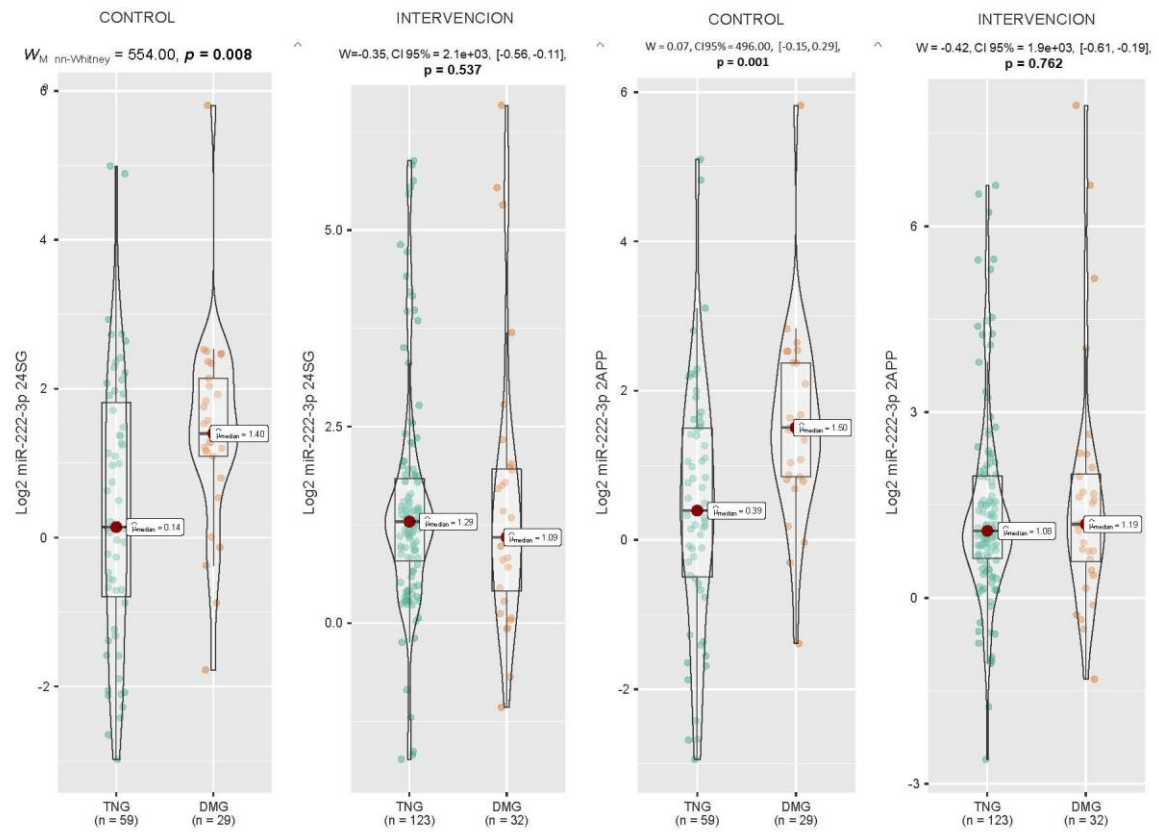


FIGURA 21. DIAGRAMAS DE CAJA/VIOLÍN Y ESTADÍSTICOS PARA COMPARACIONES ENTRE DMG/TNG Y GC/GI DE MIR-222-3P A LO LARGO DE LOS DOS TIEMPOS, 24-28 SG (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS PP (VISITA-3)

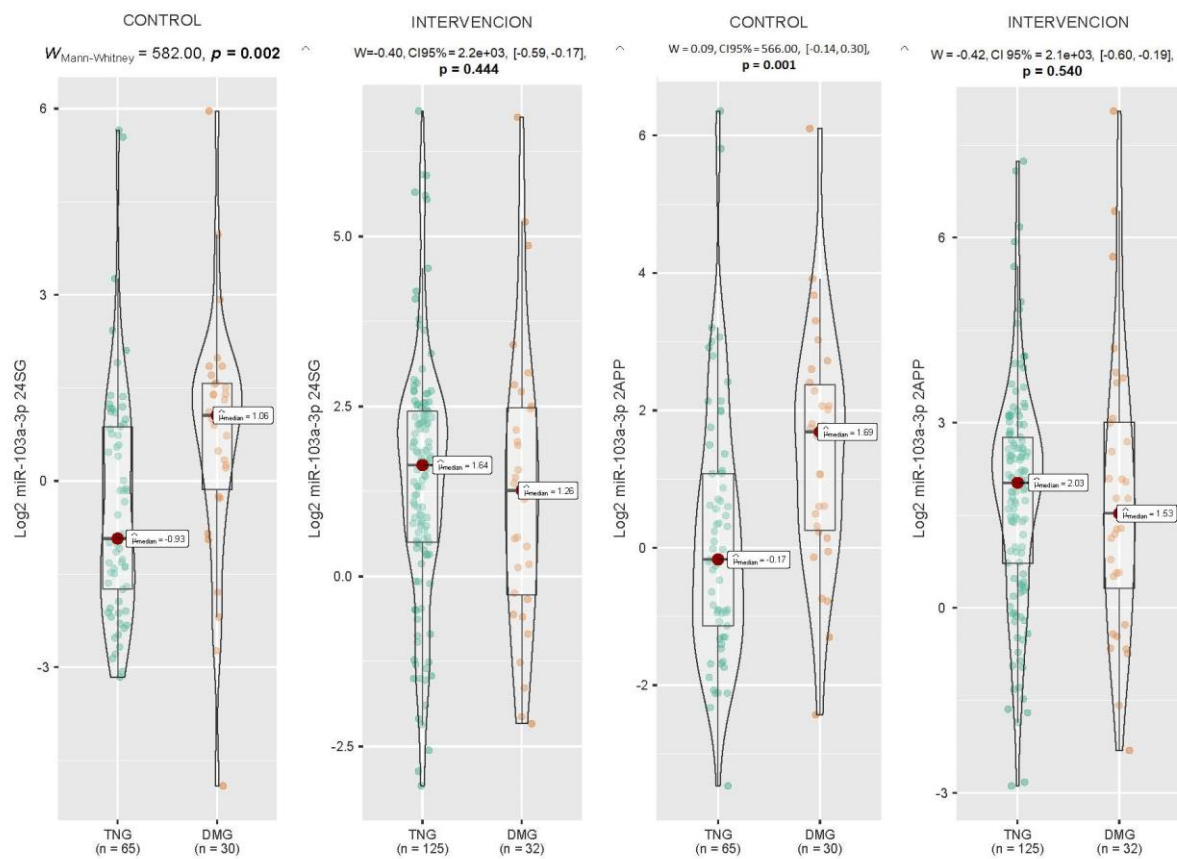


FIGURA 22. DIAGRAMAS DE CAJA/VOLÍN Y ESTADÍSTICOS PARA COMPARACIONES ENTRE DMG/TNG Y GC/GI DE MIR-103A-3P A LO LARGO DE LOS DOS TIEMPOS, 24-28 SG (VISITA-2) Y 2-3 AÑOS PP (VISITA-3)

Las diferencias en la composición corporal y en cada uno de los componentes del Síndrome Metabólico, a los 2-3 años después del parto entre las mujeres TNG y DMG se muestran en la [Tabla 11](#). Las mujeres del grupo de DMG en relación con las del grupo de TNG presentaban a los 2-3 años PP un IMC y un perímetro de cintura mayor y tenían tasas significativamente más altas de regulación anormal de la glucosa (RAG): 25 (36,4%) frente a 28 (19,6%); $p < 0,001$; sobrepeso y obesidad: 44 (57,1%) frente a 100 (42,5%); $p < 0,05$; y síndrome metabólico: 18 (23,4%) frente a 26 (11,0%); $p < 0,05$; sin embargo, la composición corporal fue similar en ambos grupos.

TABLA 11. COMPOSICIÓN CORPORAL Y COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO, A LOS 2-3 AÑOS PP

	TNG N=236	DMG N=77
IMC (Kg/m ²)	24.2 ± 4.6	25.0 ± 4.7*
PC (cm)	81.4 ± 11.1	84.7 ± 12.8 *
Energía estimada en reposo (Kcal/día)	1385 ± 176	1402 ± 225
Energía total (Kcal/día)	2343 ± 325	2352 ± 276
Masa grasa (kg)	21.3 ± 9.1	22.7 ± 9.0
Masa magra (kg)	41.4 ± 6.0	41.9 ± 6.4
Masa de músculo esquelético (kg)	18.9 ± 5.4	19.1 ± 3.4
Agua corporal (L)	31.2 ± 4.9	32.3 ± 5.9
IMC >25 (Kg/m ²)	100 (42.5)	44 (57.1) *
CC ≥89.5 cm	56 (23.7)	32 (41.6) **
Regulación anormal de la glucosa	28 (10.6)	25 (36.4) ***
IGA	21 (8.9)	24 (31.2) ***
IG	6 (2.5)	10 (12.5) **
Prediabetes (A1c ≥5.7%)	11(4.8)	15 (19.7) ***
TAS >130 mm Hg	3 (1.2)	0
TAD >85 mm Hg	29 (12.4)	11 (13.8)
TG ≥150 mg/dl	12 (5.1)	9 (11.7) *
HDL ≤45 mg/dl	25 (10.6)	8 (10.5)
Síndrome Metabólico	26 (11.0)	18 (23.4) *

Los datos se expresan como media + DEG o número (%). IMC: Índice de Masa Corporal, CC: Perímetro de la Cintura, IGA: Intolerancia a la Glucosa en Ayunas, IG: Intolerancia a la Glucosa, PAS: Presión arterial sistólica, PAD: Presión arterial diastólica, TG: Triglicéridos, HDL: lipoproteínas de alta densidad, DMG: diabetes mellitus gestacional, TNG: tolerancia normal a la glucosa.

4.4 Correlaciones

Se realizó un análisis de correlación para explorar una relación entre la expresión sérica de miR-222-3p y miR-103a-3p, la adiposidad, la inflamación y la resistencia a la insulina. En la [Tabla 12](#) se muestran las correlaciones estadísticamente significativas (Rho de Spearman) encontradas tanto en el análisis bruto como ajustado al IMC pregestacional. Tras la corrección por el IMC pregestacional, miR-222-3p mostró una correlación negativa con los niveles de insulina, TNF- α e IL-6 a los 24-28 SG.

La expresión sérica de miR-103a-3p en 24-28 SG y en 2-3 PP se correlacionó negativamente con los niveles de insulina, HOMA-IR, leptina y TNF- α en la visita-2. Aparece una correlación negativa ($p < 0,001$) entre la expresión de miR-103a-3p y los niveles de IL-6 en las tres visitas.

Finalmente se encontró una correlación ($p < 0,001$) entre la expresión de miR-222-3p y miR-103a-3p y el cambio en los niveles de insulina, HOMA-IR y leptina de la visita-1 a la visita-2.

TABLA 12. CORRELACIONES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE MIR-222-3P Y MIR-103A-3P CON LA INSULINA, EL HOMA-IR, LAS ADIPOCINAS Y LAS CITOCINAS.

	Crudo								Ajustado por IMC pregestacional							
	miR-222-3p				miR-103a-3p				miR-222-3p				miR-103a-3p			
	24-28 SG		2-3 años PP		24-28 SG		2-3 años PP		24-28 SG		2-3 años PP		24-28 SG		2-3 años PP	
	R	p-valor	R	p-valor	R	p-valor	R	p-valor	R	p-valor	R	p-valor	R	p-valor	R	p-valor
<i>IMC pregestación (kg/m2)</i>	0.111	0.079	0.155	0.014	0.081	0.198	0.13	0.039								
<i>Insulina µUI/ml</i>																
<i>FP 24 SG</i>	-0.127	0.044	-0.108	0.091	-0.165	0.008	-0.148	0.018	-0.157	0.013	-0.152	0.018	-0.189	0.003	-0.184	0.003
<i>Cambio a 24-28 SG</i>	0.137	0.03	0.087	0.174	0.151	0.016	0.162	0.01	0.151	0.017	0.106	0.1	0.162	0.01	0.179	0.005
<i>Cambio a 2-3 años PP</i>	0.092	0.146	0.026	0.686	0.111	0.078	0.116	0.066	0.118	0.064	0.057	0.376	0.131	0.037	0.146	0.02
<i>HOMA-IR</i>																
<i>24-28 SG</i>	-0.119	0.06	-0.098	0.125	-0.152	0.015	-0.133	0.035	-0.153	0.016	-0.147	0.022	-0.179	0.004	-0.173	0.006
<i>Cambio a 24-28 SG</i>	0.128	0.043	0.078	0.222	0.149	0.018	0.155	0.014	0.144	0.023	0.099	0.122	0.161	0.01	0.174	0.006
<i>Cambio a 2-3 años PP</i>	0.079	0.211	0.025	0.701	0.103	0.1	0.108	0.087	0.105	0.099	0.056	0.385	0.124	0.049	0.139	0.028
<i>Leptina (ng/ml)</i>																
<i>8-12 SG</i>	0.156	0.025	0.193	0.006	0.022	0.75	0.093	0.18	0.08	0.25	0.093	0.188	-0.074	0.283	0.001	0.989
<i>24-28 SG</i>	-0.028	0.693	0.024	0.732	-0.149	0.03	-0.12	0.083	-0.117	0.093	-0.089	0.209	-0.247	< .001	-0.226	0.001
<i>2-3 años PP</i>	0.029	0.677	0.09	0.201	-0.02	0.775	0.019	0.786	-0.103	0.143	-0.064	0.37	-0.148	0.032	-0.114	0.099
<i>Cambio a 24-28 SG</i>	0.23	< .001	0.239	< .001	0.202	0.003	0.269	< .001	0.2	0.004	0.199	0.005	0.176	0.011	0.242	< .001
<i>Cambio a 2-3 años PP</i>	0.154	0.026	0.146	0.038	0.032	0.646	0.098	0.155	0.18	0.01	0.177	0.012	0.049	0.477	0.121	0.081
<i>Adiponectina (µg/ml)</i>																
<i>2-3 años PP</i>	-0.123	0.104	-0.163	0.032	-0.034	0.649	-0.064	0.394	-0.093	0.221	-0.122	0.112	-0.001	0.989	-0.022	0.772
<i>TNF-α(pg/mL)</i>																
<i>8.12 SG</i>	-0.075	0.281	0.087	0.217	-0.16	0.02	-0.055	0.424	-0.09	0.198	0.071	0.316	-0.172	0.012	-0.067	0.333
<i>24-28 SG</i>	-0.14	0.044	0.021	0.762	-0.204	0.003	-0.102	0.14	-0.153	0.028	0.005	0.949	-0.215	0.002	-0.111	0.108
<i>IL-6 (pg/ml)</i>																
<i>8-12 SG</i>	-0.152	0.028	-0.008	0.911	-0.243	< .001	-0.147	0.033	-0.151	0.031	-0.006	0.935	-0.242	< .001	-0.145	0.037
<i>24-28 SG</i>	-0.151	0.029	0	0.995	-0.307	< .001	-0.156	0.023	-0.165	0.018	-0.016	0.826	-0.318	< .001	-0.168	0.015
<i>2-3 años PP</i>	-0.092	0.184	-0.003	0.971	-0.238	< .001	-0.14	0.042	-0.106	0.128	-0.019	0.784	-0.25	< .001	-0.154	0.026

SG= Semana gestacional; año PP= años post parto; IL-6= interleuquina 6; IMC = índice de masa corporal; TNF-α= Factor de necrosis tumoral alfa; HOMA-IR= Evaluación del modelo de homeostasis del índice de resistencia a la insulina; Rho de Spearman; cambio = cambio de nivel (%) desde el inicio.

5 Discusión

De acuerdo con los datos encontrados en el presente estudio, las mujeres que desarrollan DMG tienen valores de adiponectina significativamente más bajos al inicio de la gestación y un IMC, TAS y TNF- α más elevados en comparación con las mujeres que permanecen con tolerancia normal a la glucosa, lo que sugiere que la adiponectina o el TNF- α podrían jugar un papel importante como biomarcadores del riesgo de DMG. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado evidencias de que la adiponectina o el TNF- α sean mejores biomarcadores predictivos del riesgo de desarrollar DMG que el IMC pregestacional.

El IMC es uno de los factores de riesgo modificables en la gestación y su aumento se asocia a DMG principalmente si está elevado en la primera mitad de gestación (171). Recientemente se ha publicado un estudio relacionando la aparición de DMG con los cambios de aumento en el IMC desde la adolescencia hasta momentos antes de la gestación. En este estudio se hizo un seguimiento de las jóvenes nulíparas hasta su embarazo y se observó que las mujeres que presentaban un IMC modificable al alza tenían mayor riesgo de DMG. La evidencia acumulada permite reconocer el IMC como un factor de riesgo modificable en la DMG (172).

La adiponectina es una proteína derivada de los adipocitos que se correlaciona de forma inversa con la obesidad, hipertensión, lípidos séricos y enfermedades arteriales (173). Se sabe que la adiponectina mejora el almacenamiento de lípidos en los adipocitos, evitando su acumulación ectópica (174, 175). Diferentes estudios han demostrado que el aumento de adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina. En línea con nuestros hallazgos, la mayoría de los estudios indican que los niveles circulantes de adiponectina disminuyen a medida que avanza el embarazo y aumenta la RI (78). Se ha descrito previamente que los niveles de adiponectina eran menores en mujeres que desarrollaban DMG que en las que no y que esto podría deberse a su efecto sobre el receptor de insulina (79). Un número no despreciable de publicaciones está en consonancia con nuestros datos y prácticamente todos los estudios coinciden en confirmar que existe una disminución de los niveles circulantes de adiponectina durante

todo el embarazo, incluso con independencia de la etnia y del IMC (63, 64, 67-69, 83-85). La mayoría de los estudios se han realizado en el primer y segundo trimestre de gestación. Se ha visto que en ese tiempo la adiponectina está inversamente relacionada con el riesgo de DMG y otros marcadores de riesgo cardiometabólicos, por lo que se ha propuesto que su determinación podrá ser un buen predictor de aparición de DMG (61, 62, 85, 86).

Hay pocos trabajos que estudian los niveles de adiponectina al final del embarazo y no hemos encontrado prácticamente publicaciones en las que se determinen los niveles de adiponectina en mujeres que desarrollaron DMG después de 2-3 años de la gestación. En un estudio caso y control de mujeres gestantes donde se valoró la asociación de adiponectina y glucosa con DMG, se observó que al final del embarazo las mujeres que habían desarrollado DMG tuvieron de forma significativa niveles más bajos de adiponectina que las que no tuvieron DMG. Además, en el grupo de mujeres con DMG, la adiponectina en suero no se correlacionó con el IMC materno ni con el SM post parto (176). Nuestros resultados indican que a los 2-3 años, las mujeres que tuvieron DMG siguen teniendo niveles más bajos de adiponectina que las que fueron TNG, incluso a pesar de la intervención nutricional, lo que reforzaría su papel como posible predictor de DMG.

La leptina es secretada por el tejido adiposo y por la placenta durante el embarazo ejerciendo una función sobre la homeostasis de la glucosa a medida que va progresando la gestación (29). Aunque la leptina tiene como principal función la homeostasis energética y la regulación del apetito, tiene otras funciones sobre el receptor de insulina y el sistema inmunitario, actuando como una adipoquina proinflamatoria (51). La leptina es sintetizada por la placenta desde el inicio de la gestación (58) aumentando hasta alcanzar niveles 2 a 3 veces mayor en el embarazo que fuera del mismo (177, 178). Se ha sugerido que este aumento de las concentraciones de leptina desde el principio del embarazo y antes de la ganancia de peso se debe a otros factores, como su papel proinflamatorio, y no a la adiposidad (59, 92, 179) Kristine et al. asociaron el desarrollo

de DMG con la presencia de una inflamación subclínica y observaron un aumento de la leptina y una disminución de la adiponectina en plasma, independientemente del grado de obesidad (79). Algunos autores han encontrado niveles elevados de leptina en controles con peso normal (180). Estas acciones proinflamatorias pueden influir aumentando la resistencia a la insulina, por lo que también podrían tener implicaciones significativas en la patogénesis de la DMG.

Existen datos contradictorios sobre el papel de la leptina en la DMG y es un campo de investigación de creciente interés. Los estudios son escasos. Algunos trabajos han demostrado que la leptina está aumentada en las mujeres con DMG en el primer y segundo trimestre del embarazo, incluso al inicio del tercer trimestre (61-65). Otros no han descrito ninguna asociación entre los niveles de leptina y DMG (67). Nosotros no hemos encontrado diferencias en la leptina en la 8-12 SG entre las mujeres que desarrollaron DMG y las que no, pero sí en la 24-28 SG. Esta no parece tener relación con los cambios en el tejido adiposo, ya que no hubo diferencias significativas en el peso corporal en ese momento entre las mujeres con DMG y las TNG, por lo que debería haber otros mecanismos implicados. Pocos trabajos han estudiado la leptina más tarde del segundo o tercer trimestre de embarazo, excepto uno, que también encuentra elevada la leptina antes del parto (66). Para nuestro conocimiento, los estudios sobre el estado de la leptina en DMG más allá del parto son muy escasos o inexistentes. Nosotros hemos encontrado que, a los 2 a 3 años post parto, en las mujeres que tuvieron previamente DMG, los niveles de leptina permanecían elevados con respecto a las que no, por lo que podría indicar la persistencia de un estado proinflamatorio en este grupo.

Efectivamente, una de las características de la DMG es la presencia de un estado inflamatorio de bajo grado que puede provocar un aumento de la secreción de citoquinas y adipocinas por alteración en la estructura estructural y funcional de la placenta (59, 181). En las últimas décadas se ha despertado un creciente interés por estudiar la relación entre el IMC, DMG y citoquinas o marcadores inflamatorios. Recientemente, Santana et al. han determinado los niveles de PCR en suero e IL-6/ IL-

10 en plasma en 68 pacientes en edad fértil en un estudio de seguimiento antes, durante el embarazo y en el postparto. Observaron que las mujeres que presentaron un IMC pregestacional más alto tuvieron niveles de PCR mayores durante el embarazo y post parto en comparación con las que tuvieron un IMC normal, sin embargo no observaron cambios en las concentraciones de IL-6 o IL-10 (182). Por el contrario, Meng et al. sí determinaron una asociación de marcadores inflamatorios (IL-6 y TNF- α) en mujeres con IMC elevado y la DMG (183). Otros estudios han relacionado ciertas citoquinas (IL-6 y el TNF- α) con el aumento de peso de la placenta en mujeres diagnosticada de DMG y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de los marcadores inflamatorios en mujeres con DMG. Sin embargo si encuentran diferencias con el aumento de peso placentario ≥ 610 gramos y la HbA1C $\geq 5,1\%$ y la DMG (184).

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria producida por monocitos y macrófagos que está siendo muy estudiada por ser un importante mediador de la resistencia a la insulina en la obesidad y la diabetes (185). Presenta la capacidad de reducir la actividad tirosina quinasa en la RI (186). Estudios experimentales en murinos observaron que el aumento en suero o plasma de TNF- α se asocia a una regulación negativa del RI (90, 94). Los trabajos que han estudiado los niveles de TNF- α durante el embarazo en mujeres con y sin DMG son contradictorios (62, 64). En algunos de ellos no encontraron diferencias entre ambos grupos, ni en el primer ni en el segundo trimestre de gestación (95), pero en otros estudios sí (96). Además, los niveles de TNF- α en DMG se han asociado inversamente con el HOMA- β y positivamente con la glucosa en ayunas (62).

Algunos autores han enfatizado su papel en la DMG con independencia del IMC. Mohammed et al. compararon los niveles de TNF- α en suero de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG y observaron que los niveles más altos del TNF- α se encontraban asociados a mujeres con DMG y obesidad y mujeres con DMG aunque tuvieran un peso normal (187). Al-Musharaf et al. observaron que los niveles de TNF- α en la semana 8 a 12 de gestación podrían predecir el desarrollo de DMG, sin embargo, la significación se perdía cuando otras variables maternas, como la paridad, la historia familiar de diabetes

y otros factores de estilo de vida de la madre se añadían al ajuste (62). También se ha demostrado que el TNF- α aumenta considerablemente en mujeres de mayor edad asociado a un aumento de receptores de TNF- α en la placenta preeclampsia y aborto (188, 189). Nosotros hemos encontrado mayores niveles de TNF- α en las mujeres que después desarrollaron DMG. Esto no tuvo relación con la edad, pues era similar en ambos grupos. El análisis de regresión descartó su papel predictor de DMG. A los 2-3 años encontramos una asociación entre los niveles de TNF- α y el grupo total de mujeres que tuvieron DMG, sin tener en cuenta su estratificación por intervención o no, lo que podría estar de acuerdo con la persistencia de un estado proinflamatorio en estas mujeres.

Existen muy pocos trabajos publicados que estudien el papel de la IL-6 en la DMG. Una revisión reciente parece demostrar que los niveles séricos de IL-6 eran significativamente más altos en las mujeres con DMG que en las TNG, aunque los estudios son muy heterogéneos (62, 85, 101). Nosotros no hemos encontrado diferencias en los niveles de IL-6 en el grupo total de mujeres con DMG en la semana 8-12 ni 24-28 de gestación en relación con el grupo de TNG, si no se tiene en cuenta la estratificación por intervención. Sin embargo, sí hemos encontrado que, a los 2 a 3 años post parto, en las mujeres que tuvieron previamente DMG, los niveles de IL-6 estaban más elevados con respecto a las que no, por lo que podría indicar igualmente la persistencia de un estado proinflamatorio en este grupo.

Como era de esperar, las mujeres con DMG tenían niveles más altos de glucosa plasmáticas basal y en los tiempos de la PTOG, ya que los criterios diagnósticos de DMG se basan en esta prueba. También presentaron mayores valores de HbA1c, de insulina plasmática en ayunas y HOMA-IR que las mujeres con TNG. Previamente, en la semana 8-12 de gestación no había diferencias en estos parámetros entre ambos grupos.

En estudios anteriores se ha demostrado que la intervención con una dieta mediterránea y enriquecida con aceite AOVE y pistachos disminuye la incidencia de

DMG de hasta un 30% (32, 163). En este contexto, hemos observado diferencias significativas en la puntuación de los cuestionarios tanto de nutrición como en el MEDAS en la 24-28 SG en el grupo de intervención, tanto en las que tuvieron DMG como en las TNG. Sin embargo, a los 2-3 años PP en el grupo TNG del GI se vieron diferencias significativas en el cuestionario del MEDAS en cuanto al cuestionario de actividad física pero no alcanzamos a ver diferencias.

Diferentes estudios se centran en la intervención nutricional con DietMed para ver el impacto de los cambios fisiológicos en muestras tanto de hombres como de mujeres y concluyen que los bioactivos o los diferentes nutrientes de los alimentos procedentes de la dieta mediterránea pueden modificar los cambios de expresión de las vías de señalización tanto de biomarcadores inflamatorios como génicos. Bédard et al. estudian los cambios producidos por una intervención con DietMed durante 4 semanas en 38 hombres y 32 mujeres en edad premenopáusica para ver los cambios de adiponectina y leptina. Observaron que una intervención con dieta mediterránea de sólo 4 semanas modula los niveles de adiponectina positivamente, así como la sensibilidad de la insulina, siendo el efecto más significativo en hombres que en el grupo de mujeres. Sin embargo, no obtuvieron diferencias en los cambios de leptina en ninguno de los grupos (190).

Otras investigaciones han demostrado que los bioactivos de los alimentos procedentes de la dieta mediterránea pueden causar una diafonía en los receptores tanto de las adipquinas como de citoquinas, así como alterar la expresión de algunos miRNAs. Entre estos bioactivos se encuentran los polifenoles presentes en las verduras, frutos secos, frutas y el AOVE. Wang et al. han demostrado la actividad beneficiosa del resveratrol en la multimerización de la adiponectina en el adipocito 3T3-L1, regulando las vías de señalización de la AMPK y otras proteínas vinculadas (155, 191). En estudios en animales de experimentación sobre ratas con DMG y sus crías, sí se ha visto que cuando se les daba alimentos enriquecidos con aceite de oliva éste activaba las vías de señalización mTOR, PPAR γ de la placenta y disminuía el estrés oxidativo y la inflamación (153).

¿Pueden prevenirse los cambios que hemos encontrado en el grupo de mujeres con DMG con una intervención nutricional? Cada vez existe más evidencia del potencial de la intervención con dieta mediterránea y enriquecida con AOVE y pistachos. Estos cambios son similares tanto durante la gestación como en el periodo postnatal. Existen evidencia de que los bioactivos del AOVE, pueden modular la inflamación y que algunos de estos pueden aumentar la expresión de grupos de miRNAs.

Nosotros hemos comprobado que cuando la intervención nutricional está basada en los principios de la dieta mediterránea y se aplica al principio del embarazo, con independencia de si las mujeres tenían DMG o no, se reduce significativamente la elevación de los valores de HOMA-IR y los niveles de insulina, leptina e IL-6. Estos niveles se encuentran más bajos en el grupo de intervención, tanto en el momento del cribado de la DMG como a los 2-3 años después del parto. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la leptina puede estar implicada tanto en la vía de la DMG como en el efecto protector y antiinflamatorio de la Dieta Mediterránea sobre el desarrollo de la DMG, independientemente del peso corporal.

Nosotros hemos encontrado también una sobreexpresión de miR103a-3p y miR222-3p en el grupo de intervención a las 24-28 SG y a los 2-3 años post parto, con independencia de la presencia de DMG o no. Acorde con estos datos presentados se ha observado como el aumento de la ingesta de AOVE (30mL) provoca un impacto en los cambios postprandiales de los niveles de miRNAs circulante en las enfermedades cardiovasculares debido a los polifenoles presentes en el AOVE. Existen muy pocos estudios en este sentido y representan un campo de estudio muy novedoso. Daimiel et al, recientemente han publicado los resultados de la intervención sobre 12 participantes sanos instándoles a consumir 30mL de AOVE con diferente contenido en polifenoles y han examinado la respuesta posprandial en la expresión de diferentes miRNAs y han observado que en los sujetos sanos disminuye la expresión de un grupo de miRNAs en estado postprandial (192). Los trabajos pueden ser contradictorios. Santiago-Fernández et al. encontraron 28 miRNAs regulados al alza en cultivos de células endoteliales

tratadas obtenidas en sujetos tras una comida rica en grasas con aceite de oliva virgen extra o aceite de girasol. La ingesta de AOVE parece producir perfiles más ateroprotectores (193). Estos estudios refuerzan la hipótesis de que los algunos bioactivos del aceite de oliva interviene de alguna forma en la regulación de los miRNAs. No existen estudios conocidos que hayan estudiado el efecto de la intervención con AOVE sobre los miRNAs en mujeres con DMG.

Con la intención de analizar con más precisión el efecto de la nutrición decidimos analizar los datos separando a las mujeres según los grupos que se forman en combinación: mujeres del grupo control y que permanecen TNG, del grupo control y que desarrollan DMG, del grupo de intervención y que permanecen TNG y del grupo de intervención que desarrollan DMG. Tras este análisis observamos que los niveles de adiponectina son siempre y en todos los tiempos menores en el grupo de DMG, con independencia de la intervención. Los niveles de leptina fueron diferentes tanto en el GC como en el GI, pero en el GI, aun manteniéndose las diferencias entre DMG y TNG, los niveles de leptina fueron menores en todo el grupo.

Con respecto a la insulina y HOMA-IR se encontraron diferencias en el grupo de intervención a expensas de la mejoría en el grupo TNG en la semana 24 de gestación. A los 2-3 años, el análisis comparativo dos a dos también reveló una mejoría en ambos parámetros en el grupo de intervención a expensas del grupo TNG que fue significativa en el análisis estratificado por intervención en ambos tiempos. Lo mismo sucede para la IL-6, las diferencias tanto en la SG 24-28 como a los 2-3 años se encontraron sólo en el grupo de intervención a expensas de la mejoría del grupo TNG. Con respecto a los dos miRNAs, se observa que en la semana 24-28 de gestación en el grupo de intervención desaparece la diferencia significativa GDM y TNG del grupo control, a expensas de un aumento relativo de la expresión en el grupo de NTG. Esta circunstancia se mantiene hasta los 2-3 años PP. Estos datos reflejan que el efecto de la nutrición se pone de manifiesto especialmente en el grupo de TNG. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos de nuestro grupo en el que se constata la DietMed es

especialmente beneficiosa en gestantes del grupo TNG y en su descendencia (194). Se podría interpretar como que las mujeres que a pesar de la intervención siguen desarrollando DMG escaparían a los efectos beneficiosos de la DietMed.

El análisis de correlación podría confirmar relación entre la expresión sérica de miR-222-3p y miR-103a-3p, la adiposidad, la inflamación y la resistencia a la insulina. Este análisis pondría de manifiesto especialmente lo que sucede en el grupo TNG ya que éste forma el 75% de la muestra incluida en el estudio. Tras ajustar por IMC pregestacional, la expresión sérica de miR-222-3p mostró una correlación negativa con los niveles de insulina, TNF- α e IL-6 a los 24-28 SG. Del mismo modo la expresión de miR-103a-3p se correlacionó negativamente con los niveles de insulina, HOMA-IR, leptina y TNF- α en la visita en 24-28 SG. En este caso se mantiene hasta los 2-3 años post parto. También se encontró una fuerte correlación negativa entre la expresión de miR-103a-3p y los niveles de IL-6 en las tres visitas. La expresión en suero de ambos miRNAs se correlacionó con el cambio en los niveles de insulina, HOMA-IR y leptina de la visita-1 a la visita-2, en el tiempo que se hace la intervención nutricional.

Existen muy pocas publicaciones en las que se hayan analizado los miRNAs circulantes en suero en la gestación y en DMG. Los resultados son contradictorios. Zhao et al. asocian por primera vez la expresión de miRNAs circulantes en sueros en mujeres embarazadas entre la 16 y 19 SG con la DMG y concluyeron que los miRNAs (miR-29a-3p, miR-222-3p y miR-132-3p) redujeron su niveles de expresión significativamente en las mujeres que tuvieron DMG (119). Wander et al. observaron un aumento de la expresión de miR-29a-3p en las mujeres con sobre peso y obesidad con DMG y con descendencia masculina (118). No alejado de estos estudios se ha estudiado la expresión de miRNAs en suero y plasma tanto en poblaciones africanas y caucásicas obteniendo resultados en cuanto a la expresión totalmente contradictorios (121, 135). La evidencia acumulada parece indicar un papel importante para la expresión de miR-132a-3p y miR-222a-3p, en la homeostasis de la glucosa, la regulación del tejido adiposo y GLUT4 (23,

36, 38). Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio no sugieren ninguna implicación de los miRNAs 29a-3p o miR-132-3p con la DMG en nuestra muestra.

El miR-222-3p fue uno de los primeros miRNAs asociados a la DMG, y el estudio se realizó en una población de origen chino, observando que las mujeres con DMG presentaron una desregulación de la expresión de este miRNA (119). Shi et al. analizaron el tejido adiposo omental en mujeres con DMG a las 38-39 semanas de gestación y observaron una mayor expresión de miR-222-3p en el suero. Los autores sugirieron que miR-222-3p podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina. De hecho, en un ensayo experimental con ratas, se observó que miR-222-3p provocaba una regulación a la baja del sustrato-1 del receptor de la insulina (IRS-1) y la consiguiente inactivación de otras proteínas de la cascada de la insulina con alteración del transportador de glucosa 4 (GLUT4) (54). Así mismo se han encontrado datos que existe una asociación entre el miR-222-3p y concentraciones plasmáticas de leptina y adiponectina regulando así la vía de señalización leptina / adiponectina (195, 196).

Por el momento no tenemos constancia de que se hayan publicado trabajos relacionando la expresión del miR-103a-3p en suero y DMG. Hasta el momento los trabajos realizados con este miRNA son en otra línea de estudios más orientados a factores cardiovasculares, obesidad, prediabetes y DM2. La familia del miR-103a-3p juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa. El miR-103a-3p se encuentra en las células del tejido adiposo, regulando la expresión del RNAm, y causando resistencia a la insulina al alterar GLUT4, IRS-1 y caveolina-1 (cav-1) (39). Los mecanismos subyacentes de la relación de este miRNA con la regulación de la glucosa aun no son muy claros, pero se hipotetiza que el miR-103a-3p circulante regula la CAV-1 y al inactivarla provoca la inhibición de la translocación de membrana que bloquea o impide la fosforilación en la vía de señalización de insulina. En un estudio reciente se han analizado las correlaciones significativas y negativas existentes con los niveles de CAV-1 y los niveles de SFRP en los pacientes diagnosticados con Pre-diabetes y DM2.

También se ha estudiado su asociación con el metabolismo de la glucosa y la HbA1c (141, 197).

Teniendo en cuenta lo expuesto, se podría afirmar que todavía no se conocen bien los mecanismos por los que los miRNAs descritos intervienen en la regulación de la glucosa. Tampoco existen muchos trabajos que estudien sus cambios de expresión en suero en el embarazo y en la DMG. Siguiendo nuestros resultados podríamos afirmar que una intervención con DietMed podría aumentar la expresión de ambos miRNAs. Este aumento se correlacionaría con la mejoría en los niveles de insulina, HOMA-IR y con la mejoría de los niveles de citoquinas proinflamatorias como la IL-6. Este efecto se pondría de manifiesto sólo en el grupo de mujeres con TNG, que comprende las mujeres que realmente con TNG en el embarazo más aquellas que presentaban al inicio un cierto grado de resistencia a insulina alterado y que han respondido a la intervención nutricional. Este efecto podría mantenerse hasta 2-3 años post parto. Las mujeres que a pesar de la intervención escapan a estos mecanismos serían las que mantienen la regulación de la glucosa suficientemente alterada como para desarrollar DMG.

Estas mujeres podrían ser también aquellas que desarrollan síndrome metabólico a los 2-3 años post parto. Las mujeres del grupo de DMG en relación con las del grupo de TNG presentaban a los 2-3 años PP un IMC y un perímetro de cintura mayor y tenían tasas significativamente más altas de regulación anormal de la glucosa, de sobrepeso y obesidad y de síndrome metabólico, a pesar de que el estudio de composición corporal fue similar en ambos grupos. En esa misma línea un estudio en mujeres danesas determinó que aquellas mujeres que tenían DMG presentaron mayor probabilidad de tener síndrome metabólico después del parto en los 10 años siguientes (198, 199). Raitaharju et al. por otro lado encuentran una correlación entre SM con nueve miRNAs circulantes, algunos de estos miRNAs presentaron una asociación con la HbA1c, glucosa, lípidos y ácidos grasos, y una relación con la regulación de la vía de señalización de la insulina, aunque ninguno de ellos era los miRNAs analizados en este trabajo (200).

Por todo lo expuesto estimamos que estos hallazgos podrían contribuir a conocer mejor la fisiopatología de la regulación anormal de la glucosa en el embarazo y en el periodo postnatal. La medición de estos parámetros puede contribuir a la detección precoz de esta desregulación. Además, subrayan la importancia de la incorporación de estrategias dirigidas a la intervención nutricional basada en la dieta mediterránea al principio del embarazo.

5.1 Limitaciones y fortalezas

En nuestro estudio se encontraron varias limitaciones. En primer lugar, cuando se evalúa la intervención nutricional basada en la MedDiet, es posible que las diferencias en la dieta entre los grupos pueden no haber sido lo suficientemente sustanciales como para inducir cambios más evidentes en las adipoquinas y miRNAs séricos. Las diferencias obtenidas en la puntuación de los cuestionarios utilizados entre ambos grupos fueron superiores a 2 puntos durante la gestación/después del parto, diferencia que puede considerarse insuficiente para detectar estos efectos. Ambos grupos (GI y GC) recibieron recomendaciones nutricionales, uno basadas en la dieta mediterránea, reforzadas con AOVE y pistachos o con un consumo restringido de grasas totales durante la gestación, y ambos grupos recibieron las mismas recomendaciones después del parto.

En segundo lugar, los amplios rangos en los valores de dispersión detectados en algunas adipoquinas y miRNAs, como consecuencia de las características de la metodología empleada. Esta circunstancia podría hacer que las diferencias estadísticamente significativas sean más difíciles de alcanzar.

En tercer lugar, la valoración de la implicación de los miRNAs, adipoquinas y citoquinas puede verse afectada por la utilización de diferentes criterios diagnósticos de DMG, basados en diferentes umbrales de glucosa en la respuesta a la PTOG.

Otra limitación importante se refiere a la localización de la grasa corporal en la composición corporal. La grasa ectópica es más frecuente en presencia de niveles bajos

de adiponectina. Por lo tanto, es probable que nuestro estudio no haya detectado diferencias significativas entre las mujeres con DMG y NGT.

La fortaleza de este trabajo es que es un estudio prospectivo de un tamaño muestral en relación con los estudios previos realizados sobre miRNAs en DMG, en el que se analizó a cada mujer en 3 momentos sucesivos, al principio del embarazo (8-12 SG), en el momento del cribado de la DMG (24-28 SG) y en el momento del cribado postnatal de la Diabetes Mellitus tipo 2, en un seguimiento a largo plazo. Este enfoque prospectivo permite analizar la dinámica de los parámetros estudiados, en comparación con el embarazo temprano, así como las diferencias/similitudes de los factores de riesgo implicados en la DMG y la DMT2 postnatal.

6 Conclusiones

- La aparición de DMG se asocia con un aumento de los niveles de insulina, HOMA-IR, leptina, y una reducción de adiponectina en la semana 24-28 de gestación que permanece a los 2-3 años post parto.
- La DMG se asocia con un aumento significativo de la expresión relativa del miR-222-3p a los 2-3 años post parto.
- La intervención nutricional basada en los principios de la dieta mediterránea se acompaña de un descenso significativo de los niveles de insulina, IL-6, leptina y de los valores de HOMA-IR que se mantiene hasta los 2-3 años post parto.
- Las mujeres que desarrollarán DMG ya tienen niveles significativamente más bajos de adiponectina y valores más altos de IMC y TAD al inicio del embarazo en la semana 8-12 de gestación.
- Los niveles de adiponectina son en todos los tiempos, al inicio de la gestación, a las 24 -28 semanas de gestación y a los 2-3 años post parto, menores en el grupo de DMG, con independencia de la intervención.
- Los niveles de leptina son diferentes entre DMG y TNG, tanto en la semana 24-28 de gestación como a los 2-3 años post parto, pero aun manteniéndose las diferencias, los niveles fueron menores en el grupo de intervención.
- El descenso de los niveles de insulina y HOMA-IR en el grupo de intervención se produce a expensas de la mejoría del grupo de tolerancia normal a la glucosa, en la semana 24-28 de gestación y se mantiene hasta a los 2-3 años post parto.
- El descenso de los niveles de IL-6 en el grupo de intervención se produce a expensas de la mejoría del grupo de tolerancia normal a la glucosa, en la semana 24-28 de gestación y se mantiene hasta a los 2-3 años post parto.
- En el grupo de intervención desaparece la diferencia que existe en la expresión de miR-222-3p y miR-103a-3p entre GDM y tolerancia normal a la glucosa, tanto en la semana 24-28 de gestación como a los 2-3 años post parto. Esto se produce a expensas de un aumento de la expresión en el grupo de tolerancia normal a la glucosa.
- El análisis de correlación ajustado por IMC confirma una relación entre la expresión sérica de miR-222-3p y miR-103a-3p, la inflamación y la resistencia a la insulina.

- Los niveles de expresión en suero de miR-222-3p y miR-103a-3p en la SG 24, en el momento del cribado de DMG, se correlacionaron negativamente con los niveles de insulina, los valores de HOMA-IR, los niveles de TNF-alfa y los niveles de IL-6 en ese momento.
- Los niveles de expresión en suero de miR-222-3p y miR103a-3p a los dos años post parto se correlacionaron negativamente con los niveles que se tuvieron de insulina y HOMA-IR en la semana 24 de gestación.
- También se encontró una fuerte correlación negativa entre la expresión de miR-103a-3p en la semana 24-28 de gestación y los niveles de IL-6 en las tres visitas.
- Las mujeres del grupo de DMG presentaban a los 2-3 años post parto un IMC y un perímetro de cintura mayor. En este grupo se encontraron tasas más altas de mujeres con regulación anormal de la glucosa, sobrepeso y obesidad y de síndrome metabólico, a pesar de que el estudio de composición corporal fue similar en ambos grupos.
- La intervención nutricional basada en los principios de la Dieta Mediterránea se asocia con una sobreexpresión de miR-222 y miR-103 que se correlaciona con una mejora en la sensibilidad a la insulina y con el perfil inflamatorio de citoquinas. Este efecto se pone de manifiesto especialmente en el grupo de tolerancia normal a la glucosa.
- La medición de estos parámetros puede contribuir a conocer mejor y a la detección precoz de una regulación anormal de la glucosa durante el embarazo y en el periodo postnatal. Además, subrayan la importancia de las estrategias dirigidas a la intervención nutricional basada en la dieta mediterránea al principio del embarazo.

Referencias Bibliográficas

1. Vounzoulaki E, Khunti K, Abner SC, Tan BK, Davies MJ, Gillies CL. Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2020;369:m1361.
2. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
3. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(Supplement_1):S81-S90.
4. Mirghani Dirar A, Doupis J. Gestational diabetes from A to Z. *World J Diabetes*. 2017;8(12):489-511.
5. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 2022;43(5):763-93.
6. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl 1):S13-S28.
7. Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. *Diabetes Metab J*. 2022;46(1):3-14.
8. International Association of D, Pregnancy Study Groups Consensus P, Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(3):676-82.
9. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(3):341-63.
10. O'Sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes*. 1964;13:278-85.
11. Diabetes mellitus. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1965;310:1-44.
12. O'Sullivan JB, Mahan CM, Charles D, Dandrow RV. Screening criteria for high-risk gestational diabetic patients. *Am J Obstet Gynecol*. 1973;116(7):895-900.
13. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes*. 1979;28(12):1039-57.
14. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;144(7):768-73.
15. American Diabetes A. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26 Suppl 1:S103-5.

16. Group HSCR, Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2008;358(19):1991-2002.
17. Addendum. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* 2021;44(Suppl. 1):S15-S33. *Diabetes Care*. 2021;44(9):2182.
18. Hartling L, Dryden DM, Guthrie A, Muise M, Vandermeer B, Aktary WM, et al. Screening and diagnosing gestational diabetes mellitus. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2012(210):1-327.
19. Howe CG, Cox B, Fore R, Jungius J, Kvist T, Lent S, et al. Maternal Gestational Diabetes Mellitus and Newborn DNA Methylation: Findings From the Pregnancy and Childhood Epigenetics Consortium. *Diabetes Care*. 2020;43(1):98-105.
20. Cleary EM, Thung SF, Buschur EO. Gestational Diabetes. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2022, MDText.com, Inc.; 2000.
21. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>.
22. Zhang C, Rawal S, Chong YS. Risk factors for gestational diabetes: is prevention possible? *Diabetologia*. 2016;59(7):1385-90.
23. Kim C, Berger DK, Chamany S. Recurrence of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1314-9.
24. Siddiqui S, Zainal H, Harun SN, Sheikh Ghadzi SM, Ghafoor S. Gender differences in the modifiable risk factors associated with the presence of prediabetes: A systematic review. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(5):1243-52.
25. Lende M, Rijhsinghani A. Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(24):9573.
26. Majali-Martinez A, Weiss-Fuchs U, Miedl H, Forstner D, Bandres-Meriz J, Hoch D, et al. Type 1 Diabetes Mellitus and the First Trimester Placenta: Hyperglycemia-Induced Effects on Trophoblast Proliferation, Cell Cycle Regulators, and Invasion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):10989.
27. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *The International Journal of Developmental Biology*. 2010;54(2-3):303-12.
28. Huynh J, Dawson D, Roberts D, Bentley-Lewis R. A systematic review of placental pathology in maternal diabetes mellitus. *Placenta*. 2015;36(2):101-14.

29. Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF, Luthy DA, Williams MA. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2006;55(5):501-12.
30. Capobianco G, Gulotta A, Tupponi G, Dessole F, Pola M, Viridis G, et al. Materno-Fetal and Neonatal Complications of Diabetes in Pregnancy: A Retrospective Study. *J Clin Med*. 2020;9(9).
31. Carrasco-Wong I, Moller A, Giachini FR, Lima VV, Toledo F, Stojanova J, et al. Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(2):165535.
32. de la Torre NG, Assaf-Balut C, Jimenez Varas I, Del Valle L, Duran A, Fuentes M, et al. Effectiveness of Following Mediterranean Diet Recommendations in the Real World in the Incidence of Gestational Diabetes Mellitus (GDM) and Adverse Maternal-Foetal Outcomes: A Prospective, Universal, Interventional Study with a Single Group. The St Carlos Study. *Nutrients*. 2019;11(6).
33. Damm P, Houshmand-Oeregaard A, Kelstrup L, Lauenborg J, Mathiesen ER, Clausen TD. Gestational diabetes mellitus and long-term consequences for mother and offspring: a view from Denmark. *Diabetologia*. 2016;59(7):1396-9.
34. Olmos-Ortiz A, Flores-Espinosa P, Díaz L, Velázquez P, Ramírez-Isarraraz C, Zaga-Clavellina V. Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(15):8087.
35. Pérez-Pérez A, Vilariño-García T, Guadix P, Dueñas JL, Sánchez-Margalet V. Leptin and Nutrition in Gestational Diabetes. *Nutrients*. 2020;12(7).
36. Riskin-Mashiah S, Younes G, Damti A, Auslender R. First-Trimester Fasting Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *Diabetes Care*. 2009;32(9):1639-43.
37. Plows J, Stanley J, Baker P, Reynolds C, Vickers M. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(11):3342.
38. Park SY, Gautier J-F, Chon S. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2021;45(5):641-54.
39. Kampmann U, Knorr S, Fuglsang J, Ovesen P. Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. *Journal of Diabetes Research*. 2019;2019:1-9.
40. Catalano PM. Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *REPRODUCTION*. 2010;140(3):365-71.
41. Friedman JE, Kirwan JP, Jing M, Presley L, Catalano PM. Increased Skeletal Muscle Tumor Necrosis Factor- α and Impaired Insulin Signaling Persist in Obese Women With Gestational Diabetes Mellitus 1 Year Postpartum. *Diabetes*. 2008;57(3):606-13.

42. Kasuga M. Structure and function of the insulin receptor—a personal perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2019;95(10):581-9.
43. Balaji V, Pokrzywa W, Hoppe T. Ubiquitylation Pathways In Insulin Signaling and Organismal Homeostasis. *BioEssays*. 2018;40(5):1700223.
44. Molinaro A, Becattini B, Mazzoli A, Bleve A, Radici L, Maxvall I, et al. Insulin-Driven PI3K-AKT Signaling in the Hepatocyte Is Mediated by Redundant PI3K α and PI3K β Activities and Is Promoted by RAS. *Cell Metabolism*. 2019;29(6):1400-9.e5.
45. Nelson DL. *Lehninger principles of biochemistry*. Eighth edition /. ed. New York, NY: Macmillan International Higher Education; 2021.
46. Trayhurn P. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2022;127(2):161-4.
47. Garavito P, Mosquera-Heredia MI, Fang L, Payares F, Ruiz M, Arias I, et al. Polimorfismos de los genes del sistema leptina-melanocortina asociados con la obesidad en la población adulta de Barranquilla. *Biomédica*. 2020;40(2):257-69.
48. Pico C, Palou M, Pomar CA, Rodriguez AM, Palou A. Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Rev Endocr Metab Disord*. 2022;23(1):13-30.
49. Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015;22(5):353-9.
50. Liu J, Yang X, Yu S, Zheng R. The Leptin Resistance. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1090:145-63.
51. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(3-4):313-25.
52. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*. 2015;64(1):13-23.
53. Liu H, Du T, Li C, Yang G. STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. *Nutrition & Metabolism*. 2021;18(1).
54. Mirshamsi S, Laidlaw HA, Ning K, Anderson E, Burgess LA, Gray A, et al. *BMC Neuroscience*. 2004;5(1):54.
55. Wu C-W, Storey KB. mTOR Signaling in Metabolic Stress Adaptation. *Biomolecules*. 2021;11(5):681.
56. Barrios V, Campillo-Calatayud A, Guerra-Cantera S, Canelles S, Martín-Rivada Á, Frago LM, et al. Opposite Effects of Chronic Central Leptin Infusion on Activation of Insulin Signaling Pathways in Adipose Tissue and Liver Are Related to Changes in the Inflammatory Environment. *Biomolecules*. 2021;11(11):1734.

57. Feduchi Conosa E. Bioquímica, conceptos esenciales. Bioquímica, conceptos esenciales 2010. p. 379-.
58. Schanton M, Maymó JL, Pérez-Pérez A, Sánchez-Margalet V, Varone CL. Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta. *Reproduction*. 2018;155(1):R1-R12.
59. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy. *Biol Reprod*. 2000;63(5):1219-28.
60. Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28(1):33-41.
61. Francis EC, Li M, Hinkle SN, Cao Y, Chen J, Wu J, et al. Adipokines in early and mid-pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes: a longitudinal study in a multiracial cohort. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2020;8(1):e001333.
62. Al-Musharaf S, Sabico S, Hussain SD, Al-Tawashi F, AlWaily HB, Al-Daghri NM, et al. Inflammatory and Adipokine Status from Early to Midpregnancy in Arab Women and Its Associations with Gestational Diabetes Mellitus. *Dis Markers*. 2021;2021:8862494.
63. Sweeting AN, Wong J, Appelblom H, Ross GP, Kouru H, Williams PF, et al. A Novel Early Pregnancy Risk Prediction Model for Gestational Diabetes Mellitus. *Fetal Diagn Ther*. 2019;45(2):76-84.
64. Saucedo R, Valencia J, Moreno-Gonzalez LE, Pena-Cano MI, Aranda-Martinez A, Garcia Y, et al. Maternal serum adipokines and inflammatory markers at late gestation and newborn weight in mothers with and without gestational diabetes mellitus. *Ginekol Pol*. 2021.
65. Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Biegelmayer C, Schneider B, Ludvik B, et al. Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(2):164-72.
66. Zhang Y, Lu JH, Zheng SY, Yan JH, Chen L, Liu X, et al. Serum levels of nesfatin-1 are increased in gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(8):621-4.
67. Guelfi KJ, Ong MJ, Li S, Wallman KE, Doherty DA, Fournier PA, et al. Maternal circulating adipokine profile and insulin resistance in women at high risk of developing gestational diabetes mellitus. *Metabolism*. 2017;75:54-60.
68. Thagaard IN, Krebs L, Holm JC, Lange T, Larsen T, Christiansen M. Adiponectin and leptin as first trimester markers for gestational diabetes mellitus: a cohort study. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(11):1805-12.
69. Tagoma A, Haller-Kikkatalo K, Oras A, Roos K, Kirss A, Uibo R. Plasma cytokines during pregnancy provide insight into the risk of diabetes in the gestational diabetes risk group. *J Diabetes Investig*. 2022;13(9):1596-606.
70. Kadowaki T. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(7):1784-92.

71. Schäffler A, Orsó E, Palitzsch KD, Büchler C, Drobnik W, Fürst A, et al. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;260(2):416-25.
72. Yatagai T, Nagasaka S, Taniguchi A, Fukushima M, Nakamura T, Kuroe A, et al. Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2003;52(10):1274-8.
73. Valencia-Ortega J, Gonzalez-Reynoso R, Ramos-Martinez EG, Ferreira-Hermosillo A, Pena-Cano MI, Morales-Avila E, et al. New Insights into Adipokines in Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11).
74. Chen C-C, Wei Y-H, Huang C-C, Hung S-H, Wang Z-W, Wong R-H. Interaction of Adiponectin Genotypes and Insulin Resistance on the Occurrence of Taiwanese Metabolic Syndrome. *BioMed Research International.* 2021;2021:1-9.
75. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, *de novo* lipogenesis and novel lipids. *Journal of Internal Medicine.* 2016;280(5):465-75.
76. Ramezani S, Doulabi MA, Saqhafi H, Alipoor M. Prediction of Gestational Diabetes by Measuring the Levels of Pregnancy Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) During Gestation Weeks 11-14. *J Reprod Infertil.* 2020;21(2):130-7.
77. Zhao C, Zhang T, Shi Z, Ding H, Ling X. MicroRNA-518d regulates PPAR α protein expression in the placentas of females with gestational diabetes mellitus. *Molecular Medicine Reports.* 2014;9(6):2085-90.
78. Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, Wiser A, Schiff E, et al. Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. *J Perinatol.* 2007;27(2):77-81.
79. Winzer C, Wagner O, Festa A, Schneider B, Roden M, Bancher-Todesca D, et al. Plasma Adiponectin, Insulin Sensitivity, and Subclinical Inflammation in Women With Prior Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2004;27(7):1721-7.
80. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *Journal of Molecular Cell Biology.* 2016;8(2):93-100.
81. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423(6941):762-9.
82. Kalkman HO. An Explanation for the Adiponectin Paradox. *Pharmaceuticals.* 2021;14(12):1266.
83. Atarod Z, Ebrahemian M, Jafarpour H, Moraghebi M, Sharafkhani E. Association between serum adiponectin levels with gestational diabetes mellitus and postpartum metabolic syndrome:A case control study. *Endocr Regul.* 2020;54(2):119-25.

84. Mierzynski R, Dluski D, Nowakowski L, Poniedzialek-Czajkowska E, Leszczynska-Gorzela B. Adiponectin and Omentin Levels as Predictive Biomarkers of Preterm Birth in Patients with Gestational Diabetes Mellitus. *Biomed Res Int*. 2018;2018:7154216.
85. Abell SK, Shorakae S, Harrison CL, Hiam D, Moreno-Asso A, Stepto NK, et al. The association between dysregulated adipocytokines in early pregnancy and development of gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33(8).
86. Yuan XS, Shi H, Wang HY, Yu B, Jiang J. Ficolin-3/adiponectin ratio for the prediction of gestational diabetes mellitus in pregnant women. *J Diabetes Investig*. 2018;9(2):403-10.
87. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*. 2000;50(3):184-95.
88. Haghani K, Pashaei S, Vakili S, Taheripak G, Bakhtiyari S. TNF- α knockdown alleviates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460(4):977-82.
89. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
90. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119(1):105-10.
91. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(5):2409-15.
92. Pantham P, Aye ILMH, Powell TL. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta*. 2015;36(7):709-15.
93. Aye ILMH, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Dudley DJ, Jansson T, et al. Increasing Maternal Body Mass Index Is Associated with Systemic Inflammation in the Mother and the Activation of Distinct Placental Inflammatory Pathways¹. *Biology of Reproduction*. 2014;90(6):129-.
94. Fasshauer M, Blüher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(6):488-99.
95. Pena-Cano MI, Valencia-Ortega J, Morales-Avila E, Diaz-Velazquez MF, Gomez-Diaz R, Saucedo R. Omentin-1 and its relationship with inflammatory factors in maternal plasma and visceral adipose tissue of women with gestational diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. 2022;45(2):453-62.
96. Yin X, Huo Y, Liu L, Pan Y, Liu S, Wang R. Serum Levels and Placental Expression of NGAL in Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol*. 2020;2020:8760563.

97. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and Diabetes. *Diabetes*. 2005;54(suppl_2):S114-S24.
98. Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, et al. Interleukin-6 Enhances Glucose-Stimulated Insulin Secretion From Pancreatic β -Cells. *Diabetes*. 2011;60(2):537-47.
99. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):1-20.
100. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and Insulin Resistance. *Molecular Medicine*. 2008;14(11):741-51.
101. Simjak P, Cinkajzlova A, Anderlova K, Klouckova J, Kratochvilova H, Lacinova Z, et al. Changes in plasma concentrations and mRNA expression of hepatokines fetuin A, fetuin B and FGF21 in physiological pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2018;67(Suppl 3):S531-S42.
102. Geekiyanage H, Rayatpisheh S, Wohlschlegel JA, Brown R, Jr., Ambros V. Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(39):24213-23.
103. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.
104. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
105. Palmer JD, Soule BP, Simone BA, Zaorsky NG, Jin L, Simone NL. MicroRNA expression altered by diet: can food be medicinal? *Ageing Res Rev*. 2014;17:16-24.
106. Kim M, Zhang X. The Profiling and Role of miRNAs in Diabetes Mellitus. *J Diabetes Clin Res*. 2019;1(1):5-23.
107. Lee Y. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*. 2002;21(17):4663-70.
108. Martinez-Gonzalez MA, Buil-Cosiales P, Corella D, Bullo M, Fito M, Vioque J, et al. Cohort Profile: Design and methods of the PREDIMED-Plus randomized trial. *International Journal of Epidemiology*. 2019;48(2):387-+.
109. Zhang C, Seo J, Murakami K, Salem ESB, Bernhard E, Borra VJ, et al. Hepatic Ago2-mediated RNA silencing controls energy metabolism linked to AMPK activation and obesity-associated pathophysiology. *Nat Commun*. 2018;9(1):3658.
110. Bhattacharjee J, Borra VJ, Salem ESB, Zhang C, Murakami K, Gill RK, et al. Hepatic Ago2 Regulates PPAR α for Oxidative Metabolism Linked to Glycemic Control in Obesity and Post Bariatric Surgery. *Endocrinology*. 2021;162(4).

111. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(10):4626-40.
112. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.
113. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293(5532):1146-50.
114. Nakanishi K. Anatomy of <scp>RISC</scp> : how do small <scp>RNAs</scp> and chaperones activate Argonaute proteins? *WIREs RNA*. 2016;7(5):637-60.
115. Dooley J, Garcia-Perez JE, Sreenivasan J, Schlenner SM, Vangoitsenhoven R, Papadopoulou AS, et al. The microRNA-29 Family Dictates the Balance Between Homeostatic and Pathological Glucose Handling in Diabetes and Obesity. *Diabetes*. 2016;65(1):53-61.
116. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7473-8.
117. Jiang S. MicroRNA-451 Escapes Global MicroRNA Crisis by Clustered Neighboring MicroRNA-144 During Erythropoiesis. *Molecular Cell*. 2020;78(5):808-10.
118. Wander PL, Boyko EJ, Hevner K, Parikh VJ, Tadesse MG, Sorensen TK, et al. Circulating early- and mid-pregnancy microRNAs and risk of gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;132:1-9.
119. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(8):e23925.
120. Ibarra A, Vega-Guedes B, Brito-Casillas Y, Wägner AM. Diabetes in Pregnancy and MicroRNAs: Promises and Limitations in Their Clinical Application. *Noncoding RNA*. 2018;4(4).
121. Dias S, Pheiffer C, Abrahams Y, Rheeder P, Adam S. Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
122. Pheiffer C, Dias S, Rheeder P, Adam S. Decreased Expression of Circulating miR-20a-5p in South African Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Mol Diagn Ther*. 2018;22(3):345-52.
123. Wander PL, Boyko EJ, Hevner K, Parikh VJ, Tadesse MG, Sorensen TK, et al. Circulating early- and mid-pregnancy microRNAs and risk of gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017;132:1-9.

124. Vaishya S, Sarwade RD, Seshadri V. MicroRNA, Proteins, and Metabolites as Novel Biomarkers for Prediabetes, Diabetes, and Related Complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:180.
125. Deng L, Huang Y, Li L, Chen H, Su J. Serum miR-29a/b expression in gestational diabetes mellitus and its influence on prognosis evaluation. *J Int Med Res*. 2020;48(9):300060520954763.
126. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2007;21(11):2785-94.
127. Li Z-H, Xiong Q-Y, Xu L, Duan P, Yang QO, Zhou P, et al. miR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):32566-75.
128. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & Nutrition*. 2017;12(1).
129. Pullen TJ, Da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA. miR-29a and miR-29b Contribute to Pancreatic β -Cell-Specific Silencing of Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1). *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(15):3182-94.
130. Ono K, Igata M, Kondo T, Kitano S, Takaki Y, Hanatani S, et al. Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver. *PLOS ONE*. 2018;13(1):e0191553.
131. Shi Z, Zhao C, Guo X, Ding H, Cui Y, Shen R, et al. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER α expression in estrogen-induced insulin resistance. *Endocrinology*. 2014;155(5):1982-90.
132. Filardi T, Catanzaro G, Mardente S, Zicari A, Santangelo C, Lenzi A, et al. Non-Coding RNA: Role in Gestational Diabetes Pathophysiology and Complications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
133. Esteves JV, Enguita FJ, Machado UF. MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance. *Journal of Diabetes Research*. 2017;2017:1-11.
134. Deiluiis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(1):88-101.
135. Tagoma A, Alnek K, Kirss A, Uibo R, Haller-Kikkatalo K. MicroRNA profiling of second trimester maternal plasma shows upregulation of miR-195-5p in patients with gestational diabetes. *Gene*. 2018;672:137-42.
136. Li H, Guo L, Wu Q, Lu J, Ge Q, Lu Z. A comprehensive survey of maternal plasma miRNAs expression profiles using high-throughput sequencing. *Clin Chim Acta*. 2012;413(5-6):568-76.

137. Gillet V, Ouellet A, Stepanov Y, Rodosthenous RS, Croft EK, Brennan K, et al. miRNA Profiles in Extracellular Vesicles From Serum Early in Pregnancies Complicated by Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(11):5157-69.
138. Zhou X, Xiang C, Zheng X. miR-132 serves as a diagnostic biomarker in gestational diabetes mellitus and its regulatory effect on trophoblast cell viability. *Diagn Pathol*. 2019;14(1):119.
139. Dusaulcy R, Handgraaf S, Visentin F, Vesin C, Philippe J, Gosmain Y. miR-132-3p is a positive regulator of alpha-cell mass and is downregulated in obese hyperglycemic mice. *Mol Metab*. 2019;22:84-95.
140. Rome S. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? *Clin Biochem*. 2013;46(10-11):937-45.
141. Luo M, Xu C, Luo Y, Wang G, Wu J, Wan Q. Circulating miR-103 family as potential biomarkers for type 2 diabetes through targeting CAV-1 and SFRP4. *Acta Diabetol*. 2020;57(3):309-22.
142. Zhang Z, Wu S, Muhammad S, Ren Q, Sun C. miR-103/107 promote ER stress-mediated apoptosis via targeting the Wnt3a/ β -catenin/ATF6 pathway in preadipocytes. *J Lipid Res*. 2018;59(5):843-53.
143. Assaf-Balut C, Garcia de la Torre N, Duran A, Fuentes M, Bordiu E, Del Valle L, et al. A Mediterranean Diet with an Enhanced Consumption of Extra Virgin Olive Oil and Pistachios Improves Pregnancy Outcomes in Women Without Gestational Diabetes Mellitus: A Sub-Analysis of the St. Carlos Gestational Diabetes Mellitus Prevention Study. *Ann Nutr Metab*. 2019;74(1):69-79.
144. Assaf-Balut C, Garcia de la Torre N, Fuentes M, Duran A, Bordiu E, Del Valle L, et al. A High Adherence to Six Food Targets of the Mediterranean Diet in the Late First Trimester is Associated with a Reduction in the Risk of Materno-Foetal Outcomes: The St. Carlos Gestational Diabetes Mellitus Prevention Study. *Nutrients*. 2018;11(1).
145. B HAW, Dodds J, Placzek A, Beresford L, Spyrelli E, Moore A, et al. Mediterranean-style diet in pregnant women with metabolic risk factors (ESTEEM): A pragmatic multicentre randomised trial. *PLoS Med*. 2019;16(7):e1002857.
146. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1279-90.
147. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(8):853-9.
148. Mantilla-Escalante DC, López de Las Hazas MC, Crespo MC, Martín-Hernández R, Tomé-Carneiro J, Del Pozo-Acebo L, et al. Mediterranean diet enriched in extra-virgin olive oil or nuts modulates circulating exosomal non-coding RNAs. *Eur J Nutr*. 2021;60(8):4279-93.

149. De Santis S, Cariello M, Piccinin E, Sabbà C, Moschetta A. Extra Virgin Olive Oil: Lesson from Nutrigenomics. *Nutrients*. 2019;11(9).
150. Bounegru AV, Apetrei C. Evaluation of Olive Oil Quality with Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):12708.
151. Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, Angelico F, Bartimoccia S, Nocella C, et al. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutrition & Diabetes*. 2015;5(7):e172-e.
152. Xu H, Luo J, Huang J, Wen Q. Flavonoids intake and risk of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(19):e0686.
153. Capobianco E, Gomez Ribot D, Fornes D, Powell TL, Levieux C, Jansson T, et al. Diet Enriched with Olive Oil Attenuates Placental Dysfunction in Rats with Gestational Diabetes Induced by Intrauterine Programming. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(19):e1800263.
154. Martínez-Zamora L, Peñalver R, Ros G, Nieto G. Olive Tree Derivatives and Hydroxytyrosol: Their Potential Effects on Human Health and Its Use as Functional Ingredient in Meat. *Foods*. 2021;10(11):2611.
155. Santangelo C, Zicari A, Mandosi E, Scazzocchio B, Mari E, Morano S, et al. Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds? Current knowledge and future perspectives. *British Journal of Nutrition*. 2016;115(7):1129-44.
156. Bailey HM, Stein HH. Raw and roasted pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) are 'good' sources of protein based on their digestible indispensable amino acid score as determined in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020;100(10):3878-85.
157. Mandalari G, Barreca D, Gervasi T, Roussel MA, Klein B, Feeney MJ, et al. Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.): Production, Nutrients, Bioactives and Novel Health Effects. *Plants*. 2021;11(1):18.
158. Paterniti I, Impellizzeri D, Cordaro M, Siracusa R, Bisignano C, Gugliandolo E, et al. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Potential of Pistachios (*Pistacia vera* L.) In Vitro and In Vivo. *Nutrients*. 2017;9(8).
159. Asbaghi O, Hadi A, Campbell MS, Venkatakrishnan K, Ghaedi E. Effects of pistachios on anthropometric indices, inflammatory markers, endothelial function and blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*. 2021;126(5):718-29.
160. Şöhretoğlu D, Sari S. Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochemistry Reviews*. 2020;19(5):1081-92.

161. Hsu C-Y, Shih H-Y, Chia Y-C, Lee C-H, Ashida H, Lai Y-K, et al. Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2014;58(6):1168-76.
162. Dłuski DF, Wolińska E, Skrzypczak M. Epigenetic Changes in Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(14):7649.
163. Assaf-Balut C, García De La Torre N, Durán A, Fuentes M, Bordiú E, Del Valle L, et al. A Mediterranean diet with additional extra virgin olive oil and pistachios reduces the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM): A randomized controlled trial: The St. Carlos GDM prevention study. *PLOS ONE*. 2017;12(10):e0185873.
164. Schröder H, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr*. 2011;141(6):1140-5.
165. Assaf-Balut C, García De La Torre N, Fuentes M, Durán A, Bordiú E, Del Valle L, et al. A High Adherence to Six Food Targets of the Mediterranean Diet in the Late First Trimester is Associated with a Reduction in the Risk of Materno-Foetal Outcomes: The St. Carlos Gestational Diabetes Mellitus Prevention Study. *Nutrients*. 2018;11(1):66.
166. Cruz AF, Calle-Pascual AL. Diabetes Nutrition and Complications Trial: Trends in nutritional pattern between 1993 and 2000 and targets of diabetes treatment in a sample of Spanish people with diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(4):984-7.
167. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
168. Maria Sanchez-Morla E, Barabash A, Martinez-Vizcaino V, Tabares-Seisdedos R, Balanza-Martinez V, Antonio Cabranes-Diaz J, et al. Comparative study of neurocognitive function in euthymic bipolar patients and stabilized schizophrenic patients. *Psychiatry Research*. 2009;169(3):220-8.
169. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
170. The jamovi project, 2021. jamovi. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from. <https://www.jamovi.org>.
171. Rahnemaei FA, Abdi F, Kazemian E, Shaterian N, Shaterian N, Behesht Aeen F. Association between body mass index in the first half of pregnancy and gestational diabetes: A systematic review. *SAGE Open Medicine*. 2022;10:205031212211099.
172. Chodick G, Omer-Gilon M, Derazne E, Puris G, Rotem R, Tzur D, et al. Adolescent body mass index and changes in pre-pregnancy body mass index in relation to risk of gestational diabetes. *eClinicalMedicine*. 2021;42:101211.

173. Brink HS, van der Lely AJ, van der Linden J. The potential role of biomarkers in predicting gestational diabetes. *Endocr Connect*. 2016;5(5):R26-34.
174. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(7):1369-79.
175. Jennifer, Joseph, Philipp. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metabolism*. 2016;23(5):770-84.
176. Atarod Z, Ebrahemia M, Jafarpour H, Moraghebi M, Sharafkhani E. Association between serum adiponectin levels with gestational diabetes mellitus and postpartum metabolic syndrome:A case control study. *Endocrine Regulations*. 2020;54(2):119-25.
177. Highman TJ, Friedman JE, Huston LP, Wong WW, Catalano PM. Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(5):1010-5.
178. Bogdanet D, Reddin C, Murphy D, Doheny HC, Halperin JA, Dunne F, et al. Emerging Protein Biomarkers for the Diagnosis or Prediction of Gestational Diabetes-A Scoping Review. *J Clin Med*. 2021;10(7).
179. Lee SR, Choi W-Y, Heo JH, Huh J, Kim G, Lee K-P, et al. Progesterone increases blood glucose via hepatic progesterone receptor membrane component 1 under limited or impaired action of insulin. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
180. Esteghamati A, Noshad S, Khalilzadeh O, Morteza A, Nazeri A, Meysamie A, et al. Contribution of serum leptin to metabolic syndrome in obese and nonobese subjects. *Arch Med Res*. 2011;42(3):244-51.
181. 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.
182. Santana DD, Kac G, Dos Santos PPT, Da Silva TC, Benaïm C, Cocate PG, et al. Association between Pre-Pregnancy BMI and Inflammatory Profile Trajectories during Pregnancy and Postpartum in Brazilian Women with Periodontitis: The IMPROVE Trial. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022;19(5):2705.
183. Zhang J, Chi H, Xiao H, Tian X, Wang Y, Yun X, et al. Interleukin 6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Inflammation and Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus in Inner Mongolia. *Med Sci Monit*. 2017;23:4149-57.
184. Braga FO, Negrato CA, Matta MDFBD, Carneiro JRI, Gomes MB. Relationship between inflammatory markers, glycated hemoglobin and placental weight on fetal outcomes in women with gestational diabetes. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2019;63(1):22-9.

185. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008;582(1):117-31.
186. Li YX, Long DL, Liu J, Qiu D, Wang J, Cheng X, et al. Gestational diabetes mellitus in women increased the risk of neonatal infection via inflammation and autophagy in the placenta. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(40):e22152.
187. Mohammed A, Aliyu IS. Maternal serum level of TNF- α in Nigerian women with gestational diabetes mellitus. *Pan Afr Med J.* 2018;31:250.
188. Yelavarthi KK, Hunt JS. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor- α receptor messenger RNA and protein in human placentas. *Am J Pathol.* 1993;143(4):1131-41.
189. Anim-Nyame N, Gamble J, Sooranna SR, Johnson MR, Steer PJ. Microvascular permeability is related to circulating levels of tumour necrosis factor- α in pre-eclampsia. *Cardiovascular Research.* 2003;58(1):162-9.
190. Bédard A, Tchernof A, Lamarche B, Corneau L, Dodin S, Lemieux S. Effects of the traditional Mediterranean diet on adiponectin and leptin concentrations in men and premenopausal women: do sex differences exist? *European Journal of Clinical Nutrition.* 2014;68(5):561-6.
191. Wang A, Liu M, Liu X, Dong LQ, Glickman RD, Slaga TJ, et al. Up-regulation of adiponectin by resveratrol: the essential roles of the Akt/FOXO1 and AMP-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L. *J Biol Chem.* 2011;286(1):60-6.
192. Daimiel L, Micó V, Valls RM, Pedret A, Motilva MJ, Rubió L, et al. Impact of Phenol-Enriched Virgin Olive Oils on the Postprandial Levels of Circulating microRNAs Related to Cardiovascular Disease. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2020;64(15):2000049.
193. Santiago-Fernandez C, Martin-Reyes F, Bautista R, Tome M, Gómez-Maldonado J, Gutierrez-Repiso C, et al. miRNA/Target Gene Profile of Endothelial Cells Treated with Human Triglyceride-Rich Lipoproteins Obtained after a High-Fat Meal with Extra-Virgin Olive Oil or Sunflower Oil. *Mol Nutr Food Res.* 2020;64(17):e2000221.
194. Melero V, Assaf-Balut C, Torre NG, Jimenez I, Bordiu E, Valle LD, et al. Benefits of Adhering to a Mediterranean Diet Supplemented with Extra Virgin Olive Oil and Pistachios in Pregnancy on the Health of Offspring at 2 Years of Age. Results of the San Carlos Gestational Diabetes Mellitus Prevention Study. *J Clin Med.* 2020;9(5).
195. Al-Rawaf HA. Circulating microRNAs and adipokines as markers of metabolic syndrome in adolescents with obesity. *Clin Nutr.* 2019;38(5):2231-8.
196. Wróblewski A, Strycharz J, Świdarska E, Drewniak K, Drzewoski J, Szemraj J, et al. Molecular Insight into the Interaction between Epigenetics and Leptin in Metabolic Disorders. *Nutrients.* 2019;11(8):1872.
197. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature.* 2011;474(7353):649-53.

198. Thayer SM, Lo JO, Caughey AB. Gestational Diabetes: Importance of Follow-up Screening for the Benefit of Long-term Health. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2020;47(3):383-96.
199. Lauenborg J, Hansen T, Jensen DM, Vestergaard H, Mølsted-Pedersen L, Hornnes P, et al. Increasing Incidence of Diabetes After Gestational Diabetes: A long-term follow-up in a Danish population. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1194-9.
200. Raitoharju E, Seppälä I, Oksala N, Lyytikäinen LP, Raitakari O, Viikari J, et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;391(1-2):41-9.

Anexos



nutrients

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (**nutrients-1977670**) titled:

The relationship between serum adipokines, miR222-3p and glucose regulation in pregnancy and two to three years post-delivery in women with gestational diabetes mellitus following Mediterranean Diet Recommendations

Authored by:

Johanna Valerio; Ana Barabash; Nuria Garcia de la Torre; Paz De Miguel; Verónica Melero;
Laura Del Valle;

Inmaculada Moraga; Cristina Familiar; Alejandra Durán; Maria Jose Torrejon; José Ángel
Díaz; Inés Jiménez;

Pilar Matía-Martín; Miguel A Rubio-Herrera; Alfonso L Calle-Pascual



Academic Open Access Publishing
since 1996

has been accepted in *Nutrients* (ISSN 2072-6643) on 04 November 2022

Basel, November 2022

CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Nos interesa conocer sus hábitos de alimentación, por ello necesitamos que responda a algunas cuestiones relacionadas con su dieta. Le informamos que este cuestionario es totalmente anónimo.

Muchas gracias por su colaboración

Nº	Pregunta	Modo de valoración	Puntos
1	¿Usa usted el aceite de oliva principalmente para cocinar?	Si =1 punto	
2	¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, el de las comidas fuera de casa, las ensaladas, etc.)?	Dos o más cucharadas =1 punto	
3	¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día (las guarniciones acompañamientos contabilizan como ½ ración)?	Dos o más al día (al menos una de ellas en ensaladas o crudas)= 1 punto	
4	¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día?	Tres o más al día= 1 punto	
5	¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día (una ración equivale a 100-150 gr.)?	Menos de una al día= 1 punto	
6	¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día (porción individual equivale a 12 gr)?	Menos de una al día= 1 punto	
7	¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter) consume al día?	Menos de una al día= 1 punto	
8	¿Bebe vino? ¿Cuánto consume a la semana?	Tres o más vasos por semana= 1 punto	
9	¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana (una ración o plato equivale a 150 gr)?	Tres o más por semana= 1 punto	
10	¿Cuántas raciones de pescado o mariscos consume a la semana (un plato, pieza o ración equivale a 100-150 gr de pescado ó 4-5 piezas de marisco)?	Tres o más por semana= 1 punto	
11	¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana?	Menos de tres por semana= 1 punto	
12	¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana (una ración equivale a 30 gr)?	Una o más por semana= 1 punto	
13	¿Consumo preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas (carne de pollo: una pieza o ración equivale a 100- 150 gr)?	Si= 1 punto	
14	¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, el arroz u otros platos aderezados con una salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?	Dos o más por semana= 1 punto	
Resultado final, puntuación total			

PUNTUACIÓN TOTAL:
< 9 baja adherencia
>= 9 buena adherencia

Para finalizar, le vamos a pedir que registre algunos datos de interés estadístico:

SEXO: Hombre ☐ Mujer ☐

EDAD: _____

EMPRESA/INSTITUCIÓN: _____

CENTRO DE TRABAJO: _____

POBLACIÓN: _____

PROFESIÓN: _____

CATEGORÍA PROFESIONAL: _____

DEPARTAMENTO EN EL QUE TRABAJA: _____

Muchas gracias por su colaboración.

Los resultados se tratarán de forma global y se mantendrá el anonimato de los participantes en las publicaciones que puedan derivarse de este cuestionario.
La transmisión de datos se hará con las medidas de seguridad adecuadas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y el Real Decreto 994/99.

VISITA-2 AÑOS POS PARTO

Peso actual:

Talla:

TA:

P. cintura:

Lactancia: SI/NO;

Cuanto tiempo de duración:

Motivo abandono:

MIXTA SI/NO

Cuanto tiempo de duración:

Incidencias médicas desde la fecha del parto:

- ITUS
- Embarazos
- Abortos
- Otros:

Fármacos y suplementos utiliza en la actualidad: ninguno ó enumerar:

En relación con el tabaco responda lo que define su situación:

- No he fumado nunca
- Deje el tabaco únicamente en embarazo
- Continúo fumando en la actualidad (nº cigarrillo /día:)

Utiliza sal yodada en la cocina: SI NO

Número de comidas que hace al día.

Bioimpedancia:

Peso:

Kg;

IMC

Kg/m2

Consumo de energía en reposo:

Kcal/d

Consumo energía total:

Kcal/d

Masa grasa:

Kg

Masa magra:

Kg

Masa muscular esquelética:

kg

Agua corporal total:

l;

%

DATOS PARTO:

Lugar:		Tipo parto:	
Fecha:	SG:	APGAR:	PH:
Inducción:	Rotura bolsa:	Desgarros/episiotomía:	

DATOS NIÑO:

NHC:
AP:
Ingresos hospitalarios (SI/NO; DURACIÓN Y MOTIVO):
Tratamiento actual:
Tratamientos con antibióticos (CUANTOS/MOTIVOS):
Tratamientos con esteroides (CUANTOS /MOTIVOS):
Vacunas obligatorias SI/ NO
Vacunas optativas SI/NO; CUALES:
Introducción cereal:
Alergias alimentarias:
Guardería SI/NO;

RN:

Peso	Percentil	Talla	Percentil
Perímetro cefálico	Percentil		
Perímetro abdominal	Percentil		

REVISIÓN 1 AÑO

Peso	Percentil	Talla	Percentil
Perímetro cefálico	Percentil		
Perímetro abdominal	Percentil		

REVISION 2 AÑOS

Peso	Percentil	Talla	Percentil
Perímetro cefálico	Percentil		
Perímetro abdominal	Percentil		

Actividad Física	A	B	C	2 AÑOS PP
Pasea al día	+ de 1 h	30-60 min.	- de 30 m	
Andar con la bolsa / carro de la compra	+ de 1 h	30-60 min.	- de 30 m	
Sube pisos por día	+ de 16	Entre 4 y 16	- de 4	
Aerobic (por semana)	+ de 3 d	Entre 1 y 3	- de 1 día	
≥ 30" ejercicio en casa /gimnasio (por semana)	+ de 3 d	Entre 1 y 3	- de 1 día	
≥ 30' de deporte moderado (por semana)	+ de 3 d	Entre 1 y 3	- de 1 día	
Consumo por semana	A	B	C	
Verduras y/o ensaladas	+ de 12 veces	Entre 6 y 12	- de 6	
Piezas de Frutas	+ de 12 piezas	Entre 6 y 12	- de 6	
Frutos secos	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Aceite de oliva virgen extra	+ de 6 días	Entre 3 y 6	- de 3	
Pescado Azul	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Pescado Azul en conserva	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Pescado Blanco	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Marisco/concha	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Pan y cereales integrales	+ de 6 días	Entre 3 y 6	- de 3	
Arroz/Pasta/Pan Blanco	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Legumbres	- de 2 días	Entre 1 y 2	- de 1	
Lácteos/quesos desnatados	+ de 6 días	Entre 3 y 6	- de 3	
Lácteos/quesos semides.	- de 3 días	Entre 3 y 6	+ de 6	
Lácteos/quesos enteros	- de 3 días	Entre 3 y 6	+ de 6	
Lácteos enriquecidos	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Raciones de mantequilla, margarina o nata	+ de 1 al día	1 al día	- de 1	
Carne grasa	- de 3 días	Entre 3 y 6	+ de 6	
Embutidos blancos	- de 3 días	Entre 3 y 6	+ de 6	
Productos procesados y precocinados (hamburguesas salchichas, croquetas)	- de 2 días	2-3 días	+ de 3	
Pollo/Pavo/Conejo	+ de 2 días	Entre 1 y 2	- de 1	
Salsas mostaza ó similares	- de 2 días	Entre 2 y 4	+ de 4	
Mayonesa/Salsas con aceite(alioli, verde, pesto)	- de 2 días	Entre 2 y 4	+ de 4	
Bebidas azucaradas/ zumos	- de 2 días	Entre 2 y 4	+ de 4	
Bebidas edulcoradas	- de 2 días	Entre 2 y 4	+ de 4	
Galletas/Bollería, pan de molde, pan procesado	- de 2 días	Entre 2 y 4	+ de 4	
Alcohol (número de bebidas cada día)	Entre 1 y 4	Ninguna ó entre 4 y 6	+ de 6	
Café (de cualquier tipo)	+ de 3 al día	Menos de 3		
Bebida con comidas	Solo agua	Agua y otras	Otras	
Chocolate Negro	+ de 3 días	Entre 1 y 3	- de 1	
Consumo de platos aderezados con sofrito	+ de 2	Entre 1 y 2	- de 1	

¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas etc

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio unicéntrico, prospectivo y observacional para valorar el efecto de una intervención nutricional con Dieta Mediterránea desde fases tempranas de la gestación en el seguimiento a 2-3 y 6 años sobre el perfil de riesgo cardiometabólico materno y parámetros antropométricos y de salud en su descendencia.

Yo,

(nombre y apellidos)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- He hablado con:

(nombre del investigador)

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- cuando quiera
- sin tener que dar explicaciones
- sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y autorizo a los investigadores a utilizar mis datos en investigación

FECHA

FIRMA DEL PARTICIPANTE

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

Apreciada

Sra:

Se le ha planteado la posibilidad de participar de forma voluntaria en un estudio de investigación titulado: **Interacción Genotipo-Dieta en el desarrollo de Diabetes Mellitus Gestacional y subsecuente riesgo cardiometabólico.**

1. ¿QUÉ PRETENDE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN?

Identificar a las pacientes de alto riesgo para desarrollar diabetes gestacional pero que son capaces de reducirlo con una intervención nutricional con Dieta Mediterránea durante la gestación. Para ello se estudiará la interacción entre el riesgo genético de padecer diabetes gestacional y la adherencia a la Dieta Mediterránea en la probabilidad de desarrollo de diabetes gestacional, otros parámetros materno-fetales perinatales (prematuridad, cesárea, niños pequeños o grandes para su edad gestacional...), y la salud materno-fetal a largo plazo (riesgo cardiovascular en las madres, infecciones y alergias en los niños). Para ello se realizará la valoración de dos cohortes procedentes del estudio: **Incidencia de la diabetes mellitus gestacional con intervención nutricional basada en la dieta mediterránea** y del estudio: **Eficacia de la adherencia a Dieta Mediterránea en el entorno clínico habitual en la reducción de la incidencia de la Diabetes Gestacional**. Usted ha participado previamente en uno de estos dos estudios habiendo dado su consentimiento informado para la futura utilización de las muestras biológicas obtenidas para estudios genéticos. Sin embargo, nuestro objetivo actual es evaluar dicha interacción genotipo-dieta Mediterránea en el seguimiento a 2-3 y 6 años sobre el perfil de riesgo cardiometabólico materno y parámetros antropométricos y de salud en su descendencia.

Se ha demostrado una relación positiva entre la historia previa de diabetes gestacional y el aumento posterior del riesgo cardiovascular que se atenúa en aquellas mujeres que mantenían un estilo de vida más saludable. La detección temprana de riesgo de diabetes gestacional y posterior riesgo cardiometabólico mediante un análisis genético, permitirá identificar a las mujeres con riesgo desde fases tempranas de la gestación y aplicar intervenciones de prevención, mediante la promoción de la correcta alimentación. En cuanto a la descendencia, existe evidencia de que la dieta materna durante la gestación

modula el desarrollo del sistema inmune fetal afectando fundamentalmente a la aparición de procesos alérgicos y asma en la infancia. Las intervenciones prenatales, particularmente aquellas que implican una intervención nutricional en la madre pueden suponer una estrategia eficaz, barata y fácilmente aplicable en el mundo real.

Por ello pretendemos analizar la interacción genotipo-respuesta a una intervención con Dieta Mediterránea lo que permitiría identificar a aquellas mujeres susceptibles de un mayor beneficio con la intervención nutricional tanto durante el embarazo como en el seguimiento post-gestacional a largo plazo y posiblemente traducirse en beneficios de salud en su descendencia.

2. ¿QUÉ PROCEDIMIENTO SE SEGUIRÁ PARA VALORAR SI LA INTERVENCIÓN ES ÚTIL?

Se realizarán dos visitas de seguimiento a largo plazo: una visita entre los 24-36 meses postparto y otra los 66-78 meses postparto. A estas visitas sólo es necesario que acuda la madre. En cada una de ellas se realizará una evaluación del perfil cardiometabólico materno que incluye:

- Parámetros antropométricos: talla, peso, perímetro de cintura, tensión arterial.
- Composición corporal determinada con una sencilla, inocua e indolora técnica llamada impedancia bioeléctrica en la que se colocan unos electrodos en tronco y extremidades para medir el porcentaje de masa magra, masa grasa y agua de nuestro cuerpo.
- Dinamometría de presión manual para medir la fuerza muscular que consiste en que la paciente coge un pequeño aparato llamado dinamómetro con la mano de preferencia y aprieta lo más fuerte que pueda durante unos segundos.

- Analítica de sangre para determinación de perfil lipídico y para valorar el metabolismo de los hidratos de carbono.

- Cuestionarios de alimentación y actividad física.

Además, se evaluarán determinados parámetros de salud de los niños:

- Datos antropométricos (percentil peso y talla) aportados con el libro de salud del niño.

- Datos relacionados con el desarrollo del sistema inmune del niño: número de ingresos hospitalarios por infección, diagnóstico de asma, dermatitis atópica y alergias alimentarias. Además de la información obtenida en la entrevista con las madres se administrará un pequeño cuestionario para que se rellene. También se revisará la historia pediátrica electrónica disponible en el sistema de historia clínica electrónica de la Comunidad de Madrid.

En el caso de aquellas pacientes que no puedan acudir a las visitas de seguimiento a largo plazo (por nuevo embarazo, traslado de domicilio, situación de pandemia o cualquier otro motivo) pero que estén dispuestas a continuar en el estudio se obtendrá la información referente a los niños vía telefónica y asimismo se consultará la historia pediátrica electrónica. En este caso se enviará la hoja de información al paciente y el consentimiento informado vía correo electrónico institucional. El documento firmado se adjuntará y reenviará como fotografía vía correo electrónico.

3. ¿CÚALES SON LAS POSIBLES INCOMODIDADES Y RIESGOS DE LA PARTICIPACIÓN?

No existen riesgos ni incomodidades por obtención de muestras ni por la realización de la impedancia bioeléctrica, salvo aquellas molestias menores derivadas de la venopunción. El análisis de dichas muestras se realizará en el Hospital Clínico San Carlos y una vez finalizado se destruirán.

4. ¿CÚALES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS DE LA PARTICIPACIÓN?

Las pacientes que acudan a la visita presencial obtendrán una evaluación de su perfil de riesgo cardio-metabólico. No existen otros beneficios por participar en el estudio.

5. ¿QUÉ PASARÍA SI DECIDIERA NO PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Nada, se continuaría con su seguimiento habitual. Aunque usted decidiera participar y a mitad del estudio quisiera salir, tampoco pasaría nada. Participar en un estudio de investigación es un acto voluntario.

Todos los datos relativos a usted y a su salud que se recojan durante el transcurso del estudio serán utilizados únicamente para la realización del mismo. El responsable del tratamiento de sus datos es el Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos, que guardará todas las medidas de seguridad necesarias para la protección de sus datos. Puede retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que ello afecte a la licitud del tratamiento previo a su retirada.

Sus datos se gestionarán bajo la confidencialidad más estricta: su nombre y demás datos identificativos se sustituirán por un código. La única persona que tendrá acceso a la clave de códigos es el investigador principal del estudio. Sus datos personales, incluidos los de salud, genéticos y biométricos, no serán comunicados a terceros, salvo cuando ello sea obligatorio por ley o sean requeridos por autoridades competentes en la materia, como la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios o el Comité de Ética del Centro.

Sus datos serán conservados durante la duración del estudio, y una vez finalizado éste, durante los plazos legalmente previstos. Dichos datos también podrán ser utilizados en

estudios futuros relacionados con la misma línea de investigación, previamente aprobados por un Comité de Ética.

De acuerdo con la normativa vigente en Protección de Datos Personales, usted puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, oposición, supresión y limitación del tratamiento de sus datos. También tiene derecho a solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio, en la medida que sean aplicables. Para ejercitar estos derechos, diríjase al investigador principal del estudio (Dr Alfonso Calle Pascual, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínico San Carlos, Tfno: 91-3303281) o al delegado de Protección de Datos del Centro (Comité delegado de Protección de Datos de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid protecciondedatos.sanidad@madrid.org). Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia Española de Protección de Datos si no quedara satisfecho/a. Para obtener información más detallada puede consultar el siguiente enlace: <https://www.aepd.es/sites/default/files/2019-12/guia-pacientes-usuarios-sanidad.pdf>.

Para cualquier duda o aclaración puede consultar con el médico y/o nutricionista responsables del proyecto.

Dra Nuria García de la Torre, Dr Alfonso Calle-Pascual.

NUTRICIONISTAS: Verónica Melero, Johanna Valerio, Laura del Valle.

Telf: 91 330 3281

Article

The Relationship between Serum Adipokines, miR-222-3p, miR-103a-3p and Glucose Regulation in Pregnancy and Two to Three Years Post-Delivery in Women with Gestational Diabetes Mellitus Adhering to Mediterranean Diet Recommendations

Johanna Valerio ^{1,†} , Ana Barabash ^{1,2,3,†}, Nuria Garcia de la Torre ^{1,2,*} , Paz De Miguel ^{1,3}, Verónica Melero ¹, Laura del Valle ¹ , Inmaculada Moraga ¹ , Cristina Familiar ¹, Alejandra Durán ^{1,3}, Maria Jose Torrejón ⁴, Angel Diaz ^{1,3} , Inés Jiménez ¹, Pilar Matia ^{1,3} , Miguel Angel Rubio ^{1,3}  and Alfonso Luis Calle-Pascual ^{1,2,3,*} 

- ¹ Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
 - ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 28040 Madrid, Spain
 - ³ Facultad de Medicina, Medicina II Department, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
 - ⁴ Clinical Laboratory Department, Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
- * Correspondence: nurialobo@hotmail.com (N.G.d.I.T.); acalle.edu@gmail.com (A.L.C.-P.)
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Valerio, J.; Barabash, A.; Garcia de la Torre, N.; De Miguel, P.; Melero, V.; del Valle, L.; Moraga, I.; Familiar, C.; Durán, A.; Torrejón, M.J.; et al. The Relationship between Serum Adipokines, miR-222-3p, miR-103a-3p and Glucose Regulation in Pregnancy and Two to Three Years Post-Delivery in Women with Gestational Diabetes Mellitus Adhering to Mediterranean Diet Recommendations. *Nutrients* **2022**, *14*, 4712. <https://doi.org/10.3390/nu14224712>

Academic Editor: Antoni Sureda

Received: 2 October 2022

Accepted: 4 November 2022

Published: 8 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The San Carlos Gestational Diabetes Mellitus (GDM) prevention study, a nutritional intervention RCT based on a Mediterranean Diet (MedDiet), has been shown to reduce the incidence of GDM. The objective of this study is to investigate the relationship of leptin, adiponectin, interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), insulin and HOMA-IR and circulating miRNAs (miR-29a-3p, miR-103a-3p, miR-132-3p, miR-222-3p) with the appearance of GDM and with MedDiet-based nutritional intervention, at 24–28 gestational weeks (GW), and in glucose regulation 2–3 years post-delivery (PD). A total of 313 pregnant women, 77 with GDM vs. 236 with normal glucose tolerance (NGT), 141 from the control group (CG, MedDiet restricting the consumption of dietary fat including EVOO and nuts during pregnancy) vs. 172 from the intervention group (IG, MedDiet supplemented with extra virgin olive oil (EVOO) and pistachios during pregnancy) were compared at Visit 1 (8–12 GW), Visit 2 (24–28 GW) and Visit 3 (2–3 years PD). Expression of miRNAs was determined by the Exiqon miRCURY LNA RT-PCR system. Leptin, adiponectin, IL-6 and TNF- α , were measured by Milliplex[®] immunoassays on Luminex 200 and insulin by RIA. Women with GDM vs. NTG had significantly higher leptin median (Q1–Q3) levels (14.6 (9.2–19.4) vs. 9.6 (6.0–15.1) ng/mL; $p < 0.05$) and insulin levels (11.4 (8.6–16.5) vs. 9.4 (7.0–12.8) μ UI/mL; $p < 0.001$) and lower adiponectin (12.9 (9.8–17.2) vs. 17.0 (13.3–22.4) μ g/mL; $p < 0.001$) at Visit 2. These findings persisted in Visit 3, with overexpression of miR-222-3p (1.45 (0.76–2.21) vs. 0.99 (0.21–1.70); $p < 0.05$) and higher levels of IL-6 and TNF- α . When the IG is compared with the CG lower levels of insulin, HOMA-IR, IL-6 levels at Visit 2 and 3 and leptin levels only at Visit 2 were observed. An overexpression of miR-222-3p and miR-103a-3p were also observed in IG at Visit 2 and 3. The miR-222-3p and miR103a-3p expression correlated with insulin levels, HOMA-IR, IL-6 and TNF- α at Visit 2 (all $p < 0.05$). These data support the association of leptin, adiponectin and insulin/HOMA-IR with GDM, as well as the association of insulin/HOMA-IR and IL-6 and miR-222-3p and miR-103a-3p expression with a MedDiet-based nutritional intervention.

Keywords: gestational diabetes mellitus; Mediterranean Diet; serum microRNA; adipokines; cytokines; nutritional intervention

1. Introduction

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is defined as any degree of glucose intolerance, which develops and/or is first diagnosed during gestation and has been associated with maternal and offspring adverse events and postnatal Type 2 Diabetes Mellitus [1]. The condition is primarily due to the inability of β -cell function to compensate for the insulin resistance (IR) of late pregnancy [2].

There is increasing interest in understanding the pathophysiology of GDM to find biochemical markers with potential diagnostic and therapeutic utility [3,4]. One of the characteristics of GDM is the presence of a low-grade inflammatory state [5] that can be reduced after adopting healthy dietary patterns early in pregnancy [6]. In fact, our group published that adherence to a Mediterranean Diet (MedDiet) supplemented with extra virgin olive oil (EVOO) and pistachios was associated with a 30% reduction in the incidence of GDM [7,8]. Experimental studies have shown that components of the MedDiet may positively modulate the insulin signalling pathway, reducing inflammatory cytokines and adipokines and modifying some microRNA (miRNA) profiles [9].

Both adiponectin and leptin play a role in glucose regulation in pregnancy. Indeed, it has been observed that leptin levels increase significantly during pregnancy in GDM, and these changes are prior to metabolic modifications and changes in adiposity. Conversely, low adiponectin levels have been associated with IR, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and GDM. In fact, it has been suggested that the presence of low adiponectin levels and/or high leptin levels before gestation or in early pregnancy may be a useful risk marker for GDM and adiposity [10–13].

The proinflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) are secreted by the placenta during pregnancy. Increased levels of both cytokines have been reported in GDM compared to control women [2,14]. In fact, TNF- α has been proposed as a possible marker for IR during pregnancy, together with the aforementioned adipokines [15].

The miRNAs are small endogenous single-stranded RNAs between 18 and 22 nucleotides (nt) in length [16] that regulate gene expression at a translational level. Although miRNAs are mainly located in the cytosol, they can be exported to the circulation and regulate gene expression at a distance in recipient cells [17]. MiR-29a-3p, miR-132-3p, miR-103a-3p and miR-222-3p are involved in pancreatic β cells function, insulin signalling, liver metabolism and glucose regulation [18–25]. These miRNAs may also play a role in GDM and could be reliable predictive biomarkers in the early development of GDM [23]. Furthermore, a relationship of serum miRNAs with inflammatory markers, such as IL-6 and TNF- α , has been observed, supporting the role of miRNAs in inflammation [26].

The hypothesis of the current study is that circulating levels of the aforementioned miRNAs could be associated with the appearance of GDM and postnatal abnormal glucose regulation (AGR), acting through the modification of adipokines and insulin sensitivity. Nutritional intervention based on the Mediterranean Diet may lead to changes in the circulating levels of these miRNAs and adipokines. This study therefore assesses the adipokines (leptin and adiponectin), inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and the serum expression of miRNAs (miR-29a-3p, miR-103a-3p, miR-132-3p and miR-222-3p) at the beginning of gestation (Visit 1, baseline 8–12 GW), at the time of GDM screening (Visit 2: 24–28 GW) and at 2–3 years PD when T2DM is diagnosed (Visit 3).

The objective of this study is to assess whether adipokine circulating miRNA levels differed between women with GDM compared with NGT and whether this pattern may be modified by a nutritional intervention based on the Mediterranean Diet.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

This is a secondary analysis of the St. Carlos GDM prevention study: a prospective, single-centre, randomized pregnancy cohort study designed for the prevention of GDM through early nutritional intervention based on a MedDiet (ISRCTN84389045). It was conducted from

January 2015 to August 2016. For the current study, we included a sub-cohort of women who subsequently attended a follow-up visit at 2–3 years PD between 2017 and 2018.

The study was approved by the Clinical Trials Committee of the Hospital Clínico San Carlos (CI 13/296-E), Madrid, Spain and conducted according to the Declaration of Helsinki. All women signed the informed consent form at the onset of the trial. A detailed description of the ‘St. Carlos GDM prevention study’ has been previously published [8].

2.2. Sample Size Calculation

For the sample size estimate for the primary objective of the current study (miRNAs), a mean in the control group between 8–12 GW of $14.93 \cdot 10^{-5}$ for miR-132-3p, $14.10 \cdot 10^{-5}$ for miR-29a-3p and $3.09 \cdot 10^{-5}$ for miR-222-3p is expected [23]. To achieve a relative increase in the mean of at least 20% in each of the miRNAs in the intervention group for a significance level of 5% and a power of 80%, 144 women in each group would be needed. With this sample size, it would be possible to detect a relative increase in mean adiponectin between the two study groups of more than 12% and a decrease in leptin of 20%, for a significance level of 5% and a power of 80%.

2.3. Subjects

The 874 pregnant women who were evaluated in the St. Carlos GDM prevention study were invited to participate in a follow-up study, with a duration of 2–3 years PD. Women attended their first medical visit between 8 and 12 gestational weeks (GW) (Visit 1, or baseline). At that time, inclusion criteria were age ≥ 18 years and fasting blood glucose (FBG) < 92 mg/dL. Exclusion criteria were having multiple gestations, intolerance/allergy to nuts or EVOO, or any medical conditions or pharmacological therapy that could compromise the follow-up program. From that point, recruited women were randomly separated into a control group (CG) or the intervention group (IG) according to their ethnic origin, their age, their weight and their parity. Women in IG were encouraged to increase the consumption of EVOO and pistachios, while those in CG were advised to restrict all fat intake. In summary, all the women received instructions and recommendations on the Mediterranean Diet from the beginning of pregnancy prior to GW 12. The women included in the intervention group (IG: MedDiet-based supplemented with EVOO and pistachios) were recommended to increase the consumption of EVOO (> 40 mL/day) and pistachios (> 35 g daily), for which they were supplied free of charge with a 5 L carafe of EVOO and 1 Kg of pistachios every 2 months until delivery to guarantee reaching the minimum consumption. The women included in the control group (CG: MedDiet based, with limitation in the consumption of EVOO and nuts) received the same nutritional recommendations except to limit the consumption of EVOO (< 40 mL/day) and nuts of any sort (< 25 g/day). These recommendations were maintained until delivery. After birth, all women received the same nutritional recommendations based on the MedDiet but without restricting the consumption of EVOO or nuts; nor were EVOO or nuts provided free of charge.

Screening for GDM was performed at 24–28 GW, applying the IADPSG criteria (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group) [27] (Visit 2). All women enrolled in the study were followed during pregnancy and were offered inclusion in the follow-up program and evaluated 2–3 years PD (Visit 3). After delivery, all received the same nutritional recommendations based on MedDiet patterns.

A total of 305 women who had initially agreed to participate in the study (175 from CG and 130 from IG) were unable to attend the 2-year follow-up visit, either due to a change of residence, contact difficulties or personal logistic considerations and were therefore excluded from the analysis. A total of 256 women (124/132, CG/IG) had a new pregnancy before the 3rd year of follow-up and were excluded. Finally, a total sub-cohort of 313 women (141 from CG and 172 from IG) attending the 2–3 year follow-up visit with available serum samples obtained at 8–12 GW (baseline), 24–28 GW and 2–3 years PD were selected for this study. Their socio-demographic, clinical and biochemical characteristics at baseline are shown in Table 1.

Table 1. Baseline characteristics at 8–12 GW of women analysed.

	Control Group <i>n</i> = 141	Intervention Group <i>n</i> = 172	<i>p</i>
Age (years)	33.6 ± 4.8	34.5 ± 4.7	0.112
Race/Ethnicity			
Caucasian	85 (61.3)	113 (65.7)	0.020
Hispanic	50 (35.5)	56 (32.6)	
Others	6 (4.2)	3 (1.8)	
Family history of			
Type 2 Diabetes	31 (21.9)	49 (28.5)	0.174
MetS (>2 components)	26 (18.4)	42 (24.4)	
Previous history of			
- Gestational DM	7 (5.0)	6 (3.5)	0.791
- Miscarriages	49 (34.7)	61 (35.5)	
Educational status			
Elementary education	15 (10.6)	9 (5.2)	0.109
Secondary School	67 (47.5)	73 (42.4)	
University Degree	57 (40.4)	89 (51.7)	
UNK	2 (1.4)	1 (0.6)	
Employed	105 (74.5)	140 (81.4)	0.510
Number of pregnancies			
Primiparous	45 (31.9)	60 (35.1)	0.214
Second pregnancy	49 (34.8)	73 (42.4)	
>2 pregnancies	47 (33.3)	39 (22.5)	
Smoker			
Never	77 (54.6)	95 (55.2)	0.701
Current	9 (6.4)	14 (8.1)	
Gestational Age (weeks) at baseline	12.1 ± 0.6	12.1 ± 0.5	0.838
Pre-pregnancy self-reported body Weight (kg)	60.0 (53.5–67.0)	58.2 (54.5–65.9)	0.744
Pregnancy Body Weight at entry, 8–12 GW (kg)	61.6 (55.0–69.0)	60.0 (58.8–68.6)	0.910
Weight gain at 8–12 GW	2.0 (0.5–3.8)	1.7 (0.2–3.1)	0.053
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	22.6 (20.4–25.5)	22.7 (20.5–25.1)	0.927
Systolic BP/Diastolic BP (mm Hg)	105 ± 9/63 ± 8	107 ± 11/66 ± 9	0.415/0.367
Fasting Blood Glucose (mg/dL)	80.9 ± 6.4	80.8 ± 6.2	0.917
HbA1c (%)	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	0.563
Fasting Cholesterol (mg/dL)	175 ± 32	176 ± 27	0.725
Fasting Tryglycerides (mg/dL)	87 ± 39	89 ± 56	0.767
Fasting Plasma Insulin (μUI/mL)	12.3 (8.1–28.1)	11.8 (6.1–21.0)	0.09
HOMA-IR	2.6 (1.6–5.5)	2.3(1.2–4.2)	0.089
Adiponectin (μg/mL)	20.4 (14.1–27.6)	17.7 (13.3–22.5)	0.081
IL-6 (pg/mL)	3.0 (1.5–7.3)	2.0 (0.1–4.9)	0.071
Leptin (ng/mL)	7.3 (4.5–13.2)	6.5 (3.6–10.9)	0.099
TNF-α (pg/mL)	2.9 (2.1–4.4)	2.4 (1.7–3.3)	0.071
TSH mcUI/mL	1.84 ± 1.17	1.98 ± 1.46	0.394
FT4 (pg/dL)	8.68 ± 1.59	8.76 ± 1.35	0.656
MEDAS Score	4.8 ± 1.7	5.1 ± 1.61	0.096
Physical Activity Score	−1.7 ± 1.1	−1.9 ± 1.0	0.251
Nutrition Score	0.9 ± 3.3	0.6 ± 3.2	0.452
GDM at 24–28 GW <i>n</i> (%)	40 (28.4)	37 (21.5)	0.102

Data are given as mean ± SD, median (Q1–Q3) or number (%); control group, MedDiet based, with limitation in the consumption of EVOO and nuts; intervention group, MedDiet-based supplemented with EVOO (>40 mL/day) and pistachios (>35 g/day); MetS: metabolic syndrome; UNK: unknown; BMI: body mass index; GW: gestational weeks; BP: blood pressure; IL-6: interleukin 6; TNFα: tumour necrosis factor-alpha; HOMA-IR, Homeostasis assessment model for insulin resistance; HbA1c, hemoglobin A1c TSH: thyroid stimulating hormone; FT4: free thyroxin 4; MEDAS Score: 14-point Mediterranean Diet adherence screener (MEDAS); physical activity score: (walking daily (>5 days/week) score 0: at least 30 min, score +1, if >60 min, score −1, if <30 min; climbing stairs (floors/day, >5 days a week): score 0: between 4 and 16: score +1, >16, score −1, <4); GDM, gestational diabetes mellitus after IADPSG criteria. HOMA-IR, Homeostasis assessment model for insulin resistance, HbA1c, hemoglobin A1c.

2.4. Data Collection

2.4.1. Demographic Data

The following information was collected at the baseline visit: age at entry, ethnicity, family history of metabolic disorders such as type 2 diabetes mellitus (T2DM), obstetric history (miscarriages and GDM), number of pregnancies, educational level, employment status, smoking habits (registering whether they were currently smoking, or they smoked until they found out they were pregnant), height and gestational age at entry concurring to the first ultrasound. Pregestational body weight (BW) was self-reported, and body mass index (BMI) was calculated as $BW \text{ (kg)} / \text{height}^2 \text{ (m)}$.

2.4.2. Clinical Data

Clinical and anthropometric data measured at each visit included weight (measured without shoes and wearing lightweight clothes) and blood pressure measured with an electronic sphygmomanometer with adequate armlet after resting 10 min in a sitting position (Omron 705IT). Waist circumference and bioimpedance were assessed only in the postpartum evaluation at Visit 3. Bioimpedance was performed with the Medical Body Composition Analyser (SECA mCA515/514, GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany). This bioimpedance machine calculates with SECA scale parameters such as lean mass and skeletal muscle mass, fat mass, total body water and total energy expenditure.

2.4.3. Lifestyle Assessment

The mother's lifestyle was registered at each visit. Adherence to a healthy lifestyle (including physical activity and general healthy eating habits) was evaluated with the Diabetes Nutrition and Complication Trial (DNCT) questionnaire to obtain the nutrition score (NS) and physical activity score. The nutrition score ranges from −12 to 12, and the goal is a value >5. The physical activity score ranges from −3 to 3, and the goal is a value >0. Adherence to the MedDiet was assessed with the 14-point Mediterranean Diet adherence screener questionnaire to obtain the MEDAS score [28]. A more detailed description has been previously published [8,29].

2.4.4. Biochemical and miRNA Analysis

Sample Collection and Biochemical Measurements

A blood sample was obtained between 08.00 and 09.00 a.m. after an overnight fast of at least 10 h at each visit. The following parameters were determined: HbA1c, standardized by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; serum levels of HDL-cholesterol by the enzymatic immunoinhibiting method in an Olympus 5800 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) and serum triglycerides with a colorimetric enzymatic method using glycerol phosphate oxidase *p*-aminophenazone (GPO-PAP). Thyroid stimulating hormone (TSH) was measured by 3rd generation sandwich-chemiluminescence immunoassay with magnetic particles using human TSH mouse monoclonal antibodies in a DXI-800® (Beckman-Coulter) (range for non-pregnant adults 0.38–5.33 $\mu\text{IU/mL}$), and free thyroxine 4 (FT4) was measured by competitive-chemiluminescence immunoassay in 2 steps with paramagnetic particles, in a DXI-800® (Beckman-Coulter) (range for non-pregnant adults is 5.8–16.4 pg/mL). LDL-cholesterol was calculated with the Friedewald formula and the homeostasis assessment model for insulin resistance (HOMA-IR) calculated as $\text{glucose (mmol/L)} \times \text{insulin (}\mu\text{UI/mL)} / 22.5$.

At Visits 2 and 3, a 2 h 75 g OGTT was performed. Fasting glucose, 1 h and 2 h blood samples were drawn and GDM diagnosis was established according to the IADPSGc at Visit 2 (24–28 GW). Fasting glucose and 2 h glucose levels were used to diagnose glucose intolerance according to ADA guidelines at Visit 3 (2–3 year PD). The metabolic syndrome (MetS) was diagnosed in accordance with the harmonized definition using the specific waist circumference (WC) measurements of the Spanish population with 3 or more of the following: waist circumference (cm) ≥ 89.5 , prediabetes (fasting plasma glucose (mg/dL) ≥ 100 and/or 2 h glucose levels >139 mg/dL and/or HbA1c (%) ≥ 5.7), systolic blood

pressure (mmHg) ≥ 130 /diastolic blood pressure (mmHg) ≥ 85 , HDL (mg/dL) < 50 and triglycerides (g/L) ≥ 150 [30].

An external quality guarantee program of the SEQC (Sociedad Española de Química Clínica) evaluates the quality of the methods monthly.

Adipokine and Cytokine Analysis

For the analysis of adipokines, cytokines and miRNA, a blood sample was collected in a serum separator tube. The samples were allowed to clot at room temperature for 10–30 min and were then centrifuged for 10 min at $2500 \times g$ rpm (1125g). The upper phases of serum were transferred into a new tube for a second 5 min centrifugation at $3000 \times g$ at RT. The serum surface was carefully transferred without touching the pellet to separate sterile, nuclease- and pyrogen-free, 1.5-mL vials that were stored immediately. These serum aliquots remained frozen at -80°C until being consecutively thawed for analysis of adipokines, cytokines or miRNAs.

Serum leptin, IL-6 and TNF- α levels were measured simultaneously using the Multiplex ELISA technique with magnetic beads (HADK2MAG-61K, Milliplex Map, Millipore CA) and reading fluorescence in a Luminex 200 system (Luminex corp. Austin, TX, USA). The assays were performed based on the manufacturer's protocol. To determine adiponectin serum values, samples were diluted at 1:500. Adiponectin concentration was measured with a commercially available radioimmunoassay (RIA) Kit (Millipore Corporation, Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA; HADP-61HK). The analytical sensitivity of the method was $0.78 \mu\text{g/mL}$, and the intra-assay and inter-assay variations were 1.8–6.2% and 6.9–9.3%, respectively. Serum insulin concentrations were also assayed by RIA (Diasorin[®]), with a range of 10–200 $\mu\text{U/mL}$, a sensitivity of 3 $\mu\text{U/mL}$ and an intra- and inter-assay coefficient of variation of 5.5% and 9.7%, respectively.

miRNA Isolation and Analysis

Four miRNAs-miR-29a-3p, miR-103a-3p, miR-132-3p and miR-222-3p-were preselected for analysis based on their previously reported association with GDM. For miRNAs extraction, aliquots of stored serum were cold thawed to prevent RNA degradation. A total of 250 μL of serum was transferred to a new collection tube, and it was then centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min. After centrifugation, 200 μL of serum was collected and used for isolation. RNA was isolated using miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol, including the optional step of adding into the sample lysis buffer the bacteriophage MS2 RNA as a carrier to improve RNA isolation yield and three RNA spike-in, UniSP2, UniSP4 and UniSP5 as RNA isolation quality control (miRCURY LNA RNA Spike-in kit; cat.339390; Qiagen, Germany). Each sample was finally eluted in 40 μL of nuclease-free water. The RNA purity was determined based on the relationship between the optical density (OD) measured at 260 and 280 nm (OD_{260/280}) and 260 and 230 nm (OD_{260/230}) in a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). All samples included had values between 1.8 and 2.0. Samples were stored at -80°C in 40 μL aliquots until use in RT-qPCR.

Reverse transcription was performed by using the miRCURY LNA RT Kit (Cat 339340; Qiagen) following the manufacturer's protocol, including U6 (spike-in control) as an internal amplification control and a sample of water instead of RNA (mock) as a negative control. Quantitative PCR reactions were performed using the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Cat.339347; Qiagen) on a 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, USA). All PCRs were performed in triplicate. Two negative controls, water instead of cDNA and the mock sample, which did not generate any signal, were incorporated into the PCR reaction. An interpolate calibrator was also included in each reaction to determine the equal performance of the assay. The presence of hemolysis was analysed by the relationship between the expression of miR-451a and miR-23a-3p. Hemolyzed samples were excluded. The samples were considered positive if the amplification signal occurred at $C_t < 37$ (before the 37th threshold cycle). All primers were purchased from Qiagen (cat 339306;

miRCURY LNA miRNA PCR Assay): miR-222-3p (YP00204551), miR-29a-3p (YP00204698), miR-132-3p (YP00206035), miR-103a-3p (YP00204063), miR-23a-3p (YP00204772), miR-451a (YP02119305), UniSp6 (YP00203954), UniSp5 (YP00203955) UniSp2 (YP00203950) and UniSp4 (YP00203953) (Qiagen, Düsseldorf).

For each miRNA assay, the reaction efficiency of amplification reactions was estimated using the standard curve method analysed using the Pfaffl method [31]. All efficiencies were above 1.99; miR-23a-3p was chosen as the best reference gene for normalization, in agreement with previous publications, as it is known to be relatively stable in serum and plasma and not affected by hemolysis. The relative expression of each miRNA at Visits 2 and 3 was calculated with respect to its expression at Visit 1 using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. We considered a fold-change ≥ 1.5 as the threshold for biologically significant miRNA overexpression.

2.5. Statistical Analysis

Continuous variables with normal distribution were expressed as mean $\pm$ SD and non-normal variables as median (Q1–Q3). The normality of distribution of continuous variables was tested by the Kolmogorov–Smirnov test. Categorical variables are expressed as number and percentage. All primary analyses were performed on an intention-to-treat basis. Comparison between GDM group and NGT group or IG and CG characteristics for categorical variables were evaluated by the χ^2 test. For continuous variables, measures were compared with Student's *t* test or the Mann–Whitney *U* test if distribution of quantitative variables was or was not normal, respectively. Differences in expression levels of miRNA, cytokine and adipokine circulating levels were evaluated by the Mann–Whitney *U* test. Since the distribution of miRNA expression levels in each group did not follow a normal distribution, the expression level was log-transformed, and measures were compared applying the Mann–Whitney *U* test. Correlations between levels of the four miRNAs and biochemical data were assessed using the Spearman's correlation coefficient. The significance level was established at a *p* value < 0.05 . SPSS version 27.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and the Jamovi software (version 1.6.23) [32] were used for statistical analysis.

3. Results

A total of 77 (24.6%) women developed GDM, while 236 (75.4%) were NGT. Women with GDM had a pre-gestational body weight, BMI, sBP values and TNF- α levels significantly higher than NGT women: median [Q1–Q3], (3.2 [2.0–4.7] vs. 2.4 [1.8–3.5] pg/mL; $p < 0.01$. Adiponectin levels were lower in the GDM group than in the NGT (15.3 [11.3–24.9] vs. 20.0 [14.8–26.4] μ g/mL; $p = 0.008$). No statistically significant differences were found in all other baseline characteristics between the two groups (Table 2).

The nutrition score and MedDiet score improved significantly in the intervention group at Visit 2, both in women with NGT and in GDM, when compared to baseline scores, and were still significantly higher at Visit 3. Similarly, the nutrition score and MEDAS score had also improved significantly in women from the control group at Visit 3 vs. baseline. When women from the intervention group were compared with those in the control group, only significant differences were observed at Visit 2, in both women with GDM and NGT. At the third visit, 2–3 years PD, only the difference in the MedDiet score in the IG remained statistically significant compared to the CG. Changes in nutrition patterns and exercise are shown in Table 3.

As expected, women with GDM had higher levels of plasma glucose, HbA1c and FPI and HOMA-IR than women with NGT in Visit 2 and continued to be higher at Visit 3. Similarly, adiponectin levels were significantly lower in women with GDM compared to women with NGT, while leptin levels were higher at both Visits 2 and 3, while IL-6 and TNF- α levels were only significantly increased at Visit 3.

The miRNAs expression was higher in women with GDM compared with NGT, but only miR-222-3p at 2–3 years PD was 1.5-fold higher in GDM than in NGT (1.45 (0.76–2.21)

vs. 0.99 (0.21–1.70); $p < 0.05$). Table 4 displays the clinical and biochemical differences at both 24–28 GW and 2–3 years postpartum between GDM and NGT women.

Table 2. Comparison of baseline (at 8–12 gestational weeks) characteristics of women with gestational diabetes mellitus (GDM) and normal glucose tolerance (NGT) analysed.

	GDM $n = 77$	NGT $n = 236$	p
Age (years)	34.9 $\pm$ 4.6	33.8 $\pm$ 4.8	0.056
Race/Ethnicity			
Caucasian	51 (66.2)	147 (62.3)	0.132
Hispanic	24 (31.2)	82 (34.7)	
Others	2 (2.6)	7 (2.9)	
Family history of			
Type 2 Diabetes	21 (27.3)	59 (25.0)	0.556
MetS (>2 components)	16 (20.8)	52 (22.0)	
Previous history of			
- Gestational DM	4 (5.2)	9 (3.8)	0.513
- Miscarriages	24 (31.2)	87 (36.8)	
Educational status			
Elementary education	8 (10.4)	16 (6.8)	0.303
Secondary School	37 (48.1)	103 (43.7)	
University Degree	31 (40.3)	115 (48.7)	
UNK	1 (1.3)	2 (0.8)	
Employed	64 (83.1)	181 (76.7)	0.453
Number of pregnancies			
Primiparous	29 (37.7)	76 (32.3)	0.760
Second pregnancy	28 (36.4)	94 (40.0)	
>2 pregnancies	20 (25.9)	39 (22.5)	
Smoker			
Never	40 (51.9)	132 (55.9)	0.843
Current	7 (9.1)	16 (6.8)	
Gestational Age (weeks) at baseline	12.2 $\pm$ 0.7	12.1 $\pm$ 0.5	0.135
Pre-pregnancy Body Weight (kg)	62.0 (55.5–70.5)	58.0 (54.0–65.0)	0.017
Pregnancy Body Weight at entry (kg)	62.0 (56.6–72.5)	60.0 (55.0–67.4)	0.047
Weight gain at 8–12 GW	2.0 (0.0–3.0)	2.0 (0.2–3.5)	0.492
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	24.0 (20.8–27.4)	22.2 (20.4–24.8)	0.006
Systolic BP/Diastolic BP (mm Hg)	107 $\pm$ 11/66 $\pm$ 9	105 $\pm$ 9/63 $\pm$ 8	0.020/0.314
Fasting Blood Glucose (mg/dL)	81.9 $\pm$ 6.2	80.5 $\pm$ 6.3	0.084
A1c (%)	5.2 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.1	0.540
Fasting Cholesterol (mg/dL)	179 $\pm$ 35	174 $\pm$ 28	0.329
Fasting Tryglycerides (mg/dL)	96 $\pm$ 44	85 $\pm$ 50	0.139
Fasting Plasma Insulin (μ UI/mL)	11.9 (6.8–24.7)	10.8 (6.6–17.7)	0.322
HOMA-IR	2.5 (1.3–5.0)	2.3 (1.3–3.5)	0.324
Adiponectin (μ g/mL)	15.3 (11.3–24.9)	20.0 (14.8–26.4)	0.008
IL-6 (pg/mL)	3.4 (0.9–7.3)	2.2 (0.1–5.7)	0.092
Leptin (ng/mL)	8.8 (5.2–13.2)	6.4 (3.6–11.6)	0.099
TNF- α (pg/mL)	3.2 (2.0–4.7)	2.4 (1.8–3.5)	0.010
TSH μ UI/mL	1.84 $\pm$ 1.21	1.94 $\pm$ 1.36	0.608
FT4 (pg/mL)	8.60 $\pm$ 1.39	8.76 $\pm$ 1.49	0.471
MEDAS Score	5.1 $\pm$ 1.6	5.0 $\pm$ 1.7	0.665
Physical Activity Score	−1.9 $\pm$ 0.9	−1.8 $\pm$ 1.1	0.605
Nutrition Score	0.9 $\pm$ 3.0	0.7 $\pm$ 3.3	0.517
Intervention Group n (%)	37 (48.1)	135 (57.2)	0.102

Data are mean $\pm$ SD, median (Q1–Q3) or number (%); METS: metabolic syndrome; UNK: unknown; BMI: body mass index; GW: gestational weeks; GDM: gestational diabetes mellitus; NGT: normal glucose tolerance; BP: blood pressure; HOMA-IR: insulin resistance index; IL-6: interleukin 6; TNF- α : tumour necrosis factor- α ; FT4: free thyroxin 4; MEDAS Score, 14-point Mediterranean Diet adherence screener (MEDAS); physical activity score, (walking daily (>5 days/week) score 0, at least 30 min; score +1, if >60 min; score −1, if <30 min; climbing stairs (floors/day, >5 days a week): score 0, between 4 and 16; score +1, >16; score −1: <4); GDM: gestational diabetes mellitus after IADPSG criteria.

Table 3. Lifestyle pattern during gestation and at 2–3 years post-delivery: data by groups and glucose tolerance during gestation.

	Control Group			Intervention Group		
	All	Glucose Regulation		All	Glucose Regulation	
		NGT	GDM		NGT	GDM
N	141	101	40	172	135	37
Pregestational						
Nutrition Score	0.9 ± 3.3	0.7 ± 3.3	1.3 ± 3.4	0.6 ± 3.2	0.6 ± 3.3	0.7 ± 2.6
Phy_Activity_S	−1.7 ± 1.1	−1.7 ± 1.1	−1.8 ± 1.0	−1.9 ± 1.0	−1.9 ± 1.0	−1.9 ± 0.9
MEDAS Score	4.8 ± 1.7	4.8 ± 1.7	4.8 ± 1.8	5.1 ± 1.6	5.1 ± 1.7	5.3 ± 1.3
24–28 GW						
Nutrition Score	1.3 ± 3.5	1.0 ± 3.2	2.2 ± 3.9	4.7 ± 3.0 ^{***a}	4.8 ± 3.2 ^{***a}	4.2 ± 2.4 ^{***a}
Phy_Activity_S	−1.8 ± 1.0	−1.7 ± 1.0	−1.9 ± 1.0	−1.9 ± 0.9	−1.9 ± 0.9	−1.9 ± 0.8
MEDAS Score	4.7 ± 1.7	4.5 ± 1.6	4.9 ± 2.0	6.7 ± 1.8 ^{***a}	6.7 ± 1.8 ^{***a}	6.5 ± 1.7 ^{***a}
2–3 years PD						
Nutrition Score	2.8 ± 3.8 ^b	2.2 ± 3.9 ^b	3.8 ± 3.4 ^b	3.4 ± 3.6 ^b	3.2 ± 3.8 ^b	3.9 ± 3.0 ^b
Phy_Activity_S	−1.6 ± 1.0	−1.6 ± 1.1	−1.7 ± 0.8	−1.7 ± 0.9	−1.7 ± 1.0	−1.9 ± 0.9
MEDAS Score	6.1 ± 1.9 ^b	5.9 ± 1.9 ^b	6.5 ± 1.7 ^b	6.6 ± 1.9 ^a	6.5 ± 1.9 ^a	6.9 ± 2.0 ^a

Data are mean ± SDM or number (%); control group, MedDiet based, with limitation in the consumption of EVOO and nuts; intervention group, MedDiet-based supplemented with EVOO (>40 mL/day) and pistachios (>35 g/day); GW: gestational week; MEDAS score: 14-point Mediterranean Diet adherence screener; Phy_Activity_S: physical activity score; NGT: normal glucose tolerance; GDM: gestational diabetes mellitus; PD: post-delivery; ^{***}, $p < 0.001$, ^{**} $p < 0.01$ and ^{*} $p < 0.05$, denote differences between both cohorts; ^a $p < 0.01$ and ^b $p < 0.05$ denote differences in relation to baseline.

A stratified analysis in CG vs. IG groups showed, as expected, a significant improvement in fasting and 2 h OGTT glucose levels and HbA1c values in the IG compared to CG at 24–28 GW. IL-6 and insulin levels and HOMA-IR values were significantly lower in the IG at this time and remained lower at 2–3 years PD, while leptin levels were only significant at Visit 2. The miRNAs expression was higher in women from IG compared with CG in miR-222-3p and miR-103a-3p at 24–28 GW and 2–3 years PD. There were no differences in other biochemical parameters at either 24–28 GW or 2–3 years PD (Table 5).

The body composition and each metabolic syndrome component at 2–3 years post-delivery are shown in Table 6.

Women in the GDM group in relation to those in the NGT group presented higher BMI and WC and had significantly higher rates of abnormal glucose regulation (AGR) (25 (36.4%) vs. 28 (19.6%); $p < 0.001$); overweight and obesity (44 (57.1%) vs. 100 (42.5%); $p < 0.05$) and metabolic syndrome (18 (23.4%) vs. 26 (11.0%); $p < 0.05$) at 2–3 years postpartum. However, body composition was similar in both groups.

A correlation analysis was performed to explore a link between the serum expression of miR-222-3p and miR-103a-3p, adiposity, inflammation and insulin resistance. The statistically significant correlations (R Spearman's) found in crude or BMI-adjusted analysis are presented in Table 7. After correction for pre-gestational BMI, miR-222-3p showed a negative correlation with insulin, TNF- α and IL-6 levels at 24–28 GW. Serum miR-103a-3p expression at 24–28 GW and at 2–3 PD was negatively correlated with insulin, HOMA-IR, leptin and TNF alpha levels at Visit 2. There is a particularly strong negative correlation ($p < 0.001$) between miR-103a-3p expression and IL-6 levels at all three visits. There was also a strong correlation ($p < 0.001$) between both miR-222-3p and miR-103a-3p expression and the change in insulin, HOMA-IR and leptin levels from Visit 1 to Visit 2. Statistically

significant correlations (R Spearman's) of miR-222-3p and miR-103a-3p with variables are displayed in Table 7.

Table 4. Clinical and laboratory data during pregnancy and 2–3 years post-delivery by groups.

	NGT (<i>n</i> = 236)		GDM (<i>n</i> = 77)	
	24–28 GW	2–3 Years PD	24–28 GW	2–3 Years PD
Body Weight (Kg)	67.4 ± 10.9	63.9 ± 12.9	70.1 ± 11.0	65.4 ± 12.8
FP Glucose (mg/dL)	83.5 ± 5.1	91.9 ± 6.1	92.6 ± 6.7 ***	97.4 ± 7.1 ***
1 h OGTT (mg/dL)	118.8 ± 27.4	n.a.	159.4 ± 33.3 ***	n.a.
2 h OGTT (mg/dL)	104.5 ± 20.8	95.0 ± 19.4	135.1 ± 31.3 ***	108.3 ± 33.4 **
sBP (mm Hg)	104 ± 11	111 ± 12	108 ± 11 *	113 ± 10
dBp (mm Hg)	62 ± 9	71 ± 9	65 ± 8 *	73 ± 8 *
T-Chol. (mg/dL)	255 ± 44	176 ± 29	250 ± 46	183 ± 34
Triglycerides (g/L)	162 ± 55	75 ± 42	168 ± 45	92 ± 55 **
HbA1c-IFCC %	4.9 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.3 ***	5.5 ± 0.3 **
TSH µUI/mL	2.0 ± 1.0	1.9 ± 1.0	2.1 ± 1.0	1.9 ± 1.0
FT4 (pg/mL)	7.1 ± 1.1	8.3 ± 1.1	6.8 ± 1.0	8.1 ± 1.3
FP insulin (µUI/mL)	9.4 (7.0–12.8)	8.7 (6.7–11.9)	11.4 (8.6–16.5) ***	10.5 (8.1–16.3) **
Increase BS	5.8 ± 15.4	6.1 ± 17.5	7.1 ± 7.0 *	11.1 ± 16.9 *
Change (%)	32 ± 8	28 ± 5	30 ± 3	35 ± 4 *
HOMA-IR	1.8 (1.4–2.7)	1.9 (1.5–2.8)	2.3 (1.3–3.9) *	2.5 (1.9–3.9) *
Increase BL	−0.7 ± 4.5	0.4 ± 5.2	0.1 ± 3.2 *	−1.2 ± 4.4 **
Change (%)	7 ± 4	7 ± 2	8 ± 4	20 ± 11 **
Adiponectin (µg/mL)	17 (13–22)	16.9 (12.0–21.8)	12.9 (9.8–17.2) ***	13.7 (9.5–17.3) **
Increase BL	−2.6 ± 7.1	−3.5 ± 7.2	−3.6 ± 6.8	−3.5 ± 6.9
Change (%)	11 ± 4	13 ± 4	20 ± 3	21 ± 3
IL-6 (pg/mL)	2.1 (0.1–5.1)	2.6 (0.1–6.2)	2.8 (1.3–7.3)	3.4 (1.0–10.5) *
Increase BL	0.3 ± 7.0	−0.1 ± 13.3	0.8 ± 4.5	−0.5 ± 7.5
Change (%)	16 ± 48	53 ± 19	24 ± 21	−42 ± 19
Leptin (ng/mL)	9.6 (6.0–15.1)	6.4 (3.4–11.9)	14.6 (9.2–19.4) *	9.9 (5.6–15.3) **
Increase BL	3.6 ± 5.8	0.2 ± 5.1	5.6 ± 6.4 **	1.5 ± 7.3 *
Change (%)	39 ± 9	2 ± 1	41 ± 7	25 ± 4 *
TNF-α (pg/mL)	2.7 (1.8–3.9)	2.8 (1.9–4.2)	3.0 (2.0–4.4)	3.6 (2.5–4.6) *
Increase BL	0.3 ± 2.2	1.8 ± 1.9	1.9 ± 1.4	1.2 ± 1.6
Change (%)	10 ± 9.1	19 ± 8.5	38 ± 3	31 ± 5
miR-222-3p	1.20 (0.28–1.85)	0.99 (0.21–1.70)	1.24 (0.58–2.01)	1.45 (0.76–2.21) *
miR-103a-3p	0.92 (−0.90–2.24)	1.44 (−0.21–2.53)	1.18 (−0.25–1.91)	1.58 (0.21–2.62)
miR-132	0.18 (−0.35–0.85)	0.05 (−0.55–0.75)	0.18 (−0.59–0.96)	0.45 (−0.09–0.94)

Table 4. Cont.

	NGT (<i>n</i> = 236)		GDM (<i>n</i> = 77)	
	24–28 GW	2–3 Years PD	24–28 GW	2–3 Years PD
miR-29a-3p	0.26 (−0.95–1.67)	0.11 (−1.07–1.54)	0.21 (−0.52–2.06)	0.38 (−0.69–1.81)

Data are mean ± SDM, median IQR or number (%); OGTT: oral glucose tolerance test; sBP: systolic blood pressure; dBP: diastolic blood pressure; HbA1c-IFCC: glycated haemoglobin International Federation of Clinical Chemistry; BL: from baseline; TSH: thyroid-releasing hormone; FT4: free thyroxin 4; FP: fasting plasma insulin; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance index; GW: gestational weight; PD: post-delivery; WC: waist circumference, BMI: body mass index; IL-6: interleukin 6; TNFα: tumour necrosis factor-alpha; miR: microRNA; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01 and *** *p* < 0.001 denote differences between both cohorts.

Table 5. Clinical and laboratory during pregnancy and 2–3 years post-delivery data by groups.

	Contral Group (<i>n</i> = 141)		Intervention Group (<i>n</i> = 172)	
	24–28 GW	2–3 Years PD	24–28 GW	2–3 Years PD
Body Weight (Kg)	68.1 ± 11.8	64.4 ± 14.6	68.1 ± 10.3	64.2 ± 11.2
FP Glucose (mg/dL)	86.3 ± 6.7	93.6 ± 6.9	85.3 ± 6.8 *	92.9 ± 6.7
1 h OGTT (mg/dL)	126.8 ± 31.3	n.a.	124.2 ± 33.5 *	n.a.
2 h OGTT (mg/dL)	110.0 ± 27.0	95.0 ± 23.7	109.6 ± 24.5	99.3 ± 25.7
sBP (mm Hg)	104 ± 11	111 ± 12	105 ± 12	112 ± 12
dBP (mm Hg)	62 ± 9	71 ± 8	63 ± 9	71 ± 9
T-Chol. (mg/dL)	250 ± 47	174 ± 29	257 ± 42	180 ± 31
Triglycerides (g/L)	162 ± 52	83 ± 43	164 ± 54	76 ± 49
HbA1c-IFCC %	5.1 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.0 ± 0.3 *	5.3 ± 0.3
TSH μUI/mL	1.9 ± 1.0	1.9 ± 1.1	2.1 ± 0.9	1.9 ± 0.9
FT4 (pg/mL)	7.2 ± 1.1	8.3 ± 1.1	7.0 ± 1.1	8.1 ± 1.3
FP insulin (μUI/mL)	10.8 (8.3–15.7)	10.2 (7.7–14.2)	9.0 (6.8–12.0) ***	8.6 (6.7–11.6) **
Increase BL	6.5 ± 13.2	8.6 ± 20.2	5.9 ± 14.4	6.2 ± 14.9
Change BL	34 ± 6	34 ± 5	29 ± 7	26 ± 4
HOMA-IR	2.3 (1.7–3.3)	2.3 (1.7–3.4)	1.9 (1.4–2.6) *	1.9 (1.5–2.8) *
Increase BL	0.7 ± 4.7	0.1 ± 5.9	0.5 ± 3.9 *	−0.1 ± 4.2 *
Change BL (%)	9 ± 7	5 ± 8	7 ± 3	−6 ± 9 *
Adiponectin(μg/mL)	17.0 (12.1–23.0)	16.2 (11.2–22.6)	15.5 (12.3–18.8)	15.3 (11.2–18.9)
Increase BL	−2.9 ± 7.1	−3.8 ± 7.8	−2.5 ± 6.9	−3.0 ± 6.1
Change BL (%)	−10 ± 3	−10 ± 4	−10 ± 3	−10 ± 3
IL-6 (pg/mL)	2.9 (1.9–7.1)	3.0 (1.7–7.5)	1.3 (0–4.8) ***	1.6 (0.1–6.9) **
Increase BL	0.8 ± 5.7	0.3 ± 8.2	−1.1 ± 7.1	−0.8 ± 15.0
Change BL (%)	16 ± 48.4	36.8 ± 19.3	24 ± 21.4	65 ± 21.7
Leptin (ng/mL)	11.8 (7.6–19.5)	7.5 (3.4–15.3)	9.5 (6.3–14.7) **	7.4 (4.2–11.5)
Increase BL	5.0 ± 6.6	0.5 ± 6.6	3.1 ± 5.2 **	0.6 ± 4.8 *
Change BL (%)	9 ± 2	2 ± 1	8 ± 2	4 ± 10
TNF-α (pg/mL)	2.9 (1.9–4.5)	3.3 (2.2–4.4)	2.7 (1.8–3.6)	2.8 (1.8–4.2)
Increase BL	1.9 ± 2.5	1.1 ± 1.2	0.9 ± 1.9	0.8 ± 2.3

Table 5. Cont.

	Contral Group (<i>n</i> = 141)		Intervention Group (<i>n</i> = 172)	
	24–28 GW	2–3 Years PD	24–28 GW	2–3 Years PD
Change BL (%)	−8 ± 9	−10 ± 6	25 ± 2	27 ± 4
miR-222-3p	1.04 (−0.5–1.93)	0.85 (−0.11–1.64)	1.29 (0.71–1.87) ***	1.11 (0.62–1.98) ***
miR-103a-3p	−0.12 (−1.48–1.20)	0.35 (−0.92–1.80)	1.57 (0.41–2.47) ***	2.02 (0.52–2.80) ***
miR-132-3p	0.25 (−0.2–0.89)	0.34 (−0.1–0.81)	0.17 (−0.51–0.83)	−0.03 (−0.58–0.86)
miR-29a-3p	0.09 (−0.82–1.43)	0.28 (−0.75–1.41)	0.29 (−1.01–1.93)	0.06 (−1.14–1.77)

Data are mean ± SDM, median IQR or number (%); control group, MedDiet based, with limitation in the consumption of EVOO and nuts; intervention group, MedDiet-based supplemented with EVOO (>40 mL/day) and pistachios (>35 g/day); FP: fasting plasma; OGTT: oral glucose tolerance test; sBP: systolic blood pressure; dBP: diastolic blood pressure; HbA1c-IFCC: haemoglobin glycated, International Federation of Clinical Chemistry; BL: from baseline; TSH: thyroid releasing hormone; FT4: free thyroxin 4; FP insulin: fasting plasma insulin; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance index; IL-6: interleukin 6; TNF-α: tumour necrosis factor-alpha; miR: microRNA; GW: gestational week; PD: post-delivery; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ denote differences between both cohort.

Table 6. Body composition and metabolic syndrome components, 2–3 years post-delivery.

	NGT <i>n</i> = 236	GDM <i>n</i> = 77
BMI (Kg/m ²)	24.2 ± 4.6	25.0 ± 4.7 *
WC (cm)	81.4 ± 11.1	84.7 ± 12.8 *
Estimated Resting Energy (Kcal/day)	1385 ± 176	1402 ± 225
Total Energy (Kcal/day)	2343 ± 325	2352 ± 276
Fat Mass (kg)	21.3 ± 9.1	22.7 ± 9.0
Lean mass (kg)	41.4 ± 6.0	41.9 ± 6.4
Skeletal Muscle Mass (kg)	18.9 ± 5.4	19.1 ± 3.4
Body Water (L)	31.2 ± 4.9	32.3 ± 5.9
BMI > 25 (Kg/m ²)	100 (42.5)	44 (57.1) *
WC > 89.5 cm	56 (23.7)	32 (41.6) **
Abnormal Glucose Regulation	28 (10.6)	25 (36.4) ***
IFG	21 (8.9)	24 (31.2) ***
IGT	6 (2.5)	10 (12.5) **
Prediabetes (A1c > 5.7%)	11 (4.8)	15 (19.7) ***
sBP > 130 mm Hg	3 (1.2)	0
dBP > 85 mm Hg	29 (12.4)	11 (13.8)
TG > 150 mg/dL	12 (5.1)	9 (11.7) *
HDL < 45 mg/dL	25 (10.6)	8 (10.5)
Metabolic Syndrome	26 (11.0)	18 (23.4) *

Data are mean ± SDM or number (%); BMI: body mass index; WC: waist circumference; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; sBP: systolic blood pressure; dBP: diastolic blood pressure; TG: triglyceride; HDL: high-density lipoprotein; GDM: gestational diabetes mellitus; NGT: normal glucose tolerance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ denote differences between both cohorts.

Table 7. Statistically significant correlations of miR-222-3p and miR-103a-3p with insulin, HOMA-IR, adipokines and cytokines.

	Crude				Adjusted for 'Pre-Pregnancy BMI (kg/m ²)											
	miR-222-3p				miR-103a-3p				miR-222-3p				miR103a-3p			
	24–28 GW		2–3 Yrs PD		24–28 GW		2–3 Yrs PD		24–28 GW		2–3 Yrs PD		24–28 GW		2–3 Yrs PD	
	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	0.111	0.079	0.155	0.014	0.081	0.198	0.13	0.039								
Insulin μ UI/mL																
FP 24 GW	−0.127	0.044	−0.108	0.091	−0.165	0.008	−0.148	0.018	−0.157	0.013	−0.152	0.018	−0.189	0.003	−0.184	0.003
Change at 24 GW	0.137	0.03	0.087	0.174	0.151	0.016	0.162	0.01	0.151	0.017	0.106	0.1	0.162	0.01	0.179	0.005
Change at 2 yrs PD	0.092	0.146	0.026	0.686	0.111	0.078	0.116	0.066	0.118	0.064	0.057	0.376	0.131	0.037	0.146	0.02
HOMA-IR																
24 GW	−0.119	0.06	−0.098	0.125	−0.152	0.015	−0.133	0.035	−0.153	0.016	−0.147	0.022	−0.179	0.004	−0.173	0.006
Change at 24 GW	0.128	0.043	0.078	0.222	0.149	0.018	0.155	0.014	0.144	0.023	0.099	0.122	0.161	0.01	0.174	0.006
Change at 2 yrs PD	0.079	0.211	0.025	0.701	0.103	0.1	0.108	0.087	0.105	0.099	0.056	0.385	0.124	0.049	0.139	0.028
Leptin (ng/mL)																
12 GW	0.156	0.025	0.193	0.006	0.022	0.75	0.093	0.18	0.08	0.25	0.093	0.188	−0.074	0.283	0.001	0.989
24 GW	−0.028	0.693	0.024	0.732	−0.149	0.03	−0.12	0.083	−0.117	0.093	−0.089	0.209	−0.247	<0.001	−0.226	0.001
2 yrs PD	0.029	0.677	0.09	0.201	−0.02	0.775	0.019	0.786	−0.103	0.143	−0.064	0.37	−0.148	0.032	−0.114	0.099
Change at 24 GW	0.23	<0.001	0.239	<0.001	0.202	0.003	0.269	<0.001	0.2	0.004	0.199	0.005	0.176	0.011	0.242	<0.001
Change at 2 yrs PD	0.154	0.026	0.146	0.038	0.032	0.646	0.098	0.155	0.18	0.01	0.177	0.012	0.049	0.477	0.121	0.081
Adiponectin (μ g/mL)																
2 yrs PD	−0.123	0.104	−0.163	0.032	−0.034	0.649	−0.064	0.394	−0.093	0.221	−0.122	0.112	−0.001	0.989	−0.022	0.772

Table 7. Cont.

	Crude				Adjusted for 'Pre-Pregnancy BMI (kg/m ²)											
	miR-222-3p				miR-103a-3p				miR-222-3p				miR103a-3p			
	24–28 GW		2–3 Yrs PD		24–28 GW		2–3 Yrs PD		24–28 GW		2–3 Yrs PD		24–28 GW		2–3 Yrs PD	
	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value	R	p-Value
TNF- α (pg/mL)																
12GW	−0.075	0.281	0.087	0.217	−0.16	0.02	−0.055	0.424	−0.09	0.198	0.071	0.316	−0.172	0.012	−0.067	0.333
24GW	−0.14	0.044	0.021	0.762	−0.204	0.003	−0.102	0.14	−0.153	0.028	0.005	0.949	−0.215	0.002	−0.111	0.108
IL-6 (pg/mL)																
12 GW	−0.152	0.028	−0.008	0.911	−0.243	<0.001	−0.147	0.033	−0.151	0.031	−0.006	0.935	−0.242	<0.001	−0.145	0.037
24 GW	−0.151	0.029	0	0.995	−0.307	<0.001	−0.156	0.023	−0.165	0.018	−0.016	0.826	−0.318	<0.001	−0.168	0.015
2 yrs PD	−0.092	0.184	−0.003	0.971	−0.238	<0.001	−0.14	0.042	−0.106	0.128	−0.019	0.784	−0.25	<0.001	−0.154	0.026

GW = Gestational week; yrs PD = years post-delivery; IL-6 = interleukin 6; BMI = body mass index; TNF- α = Tumour necrosis factor-alpha; HOMA-IR = Homeostasis model assessment of insulin resistance index; Spearman's rho; change = level change (%) from baseline. **Highlighted in bold p values < 0.001.**

4. Discussion

According to the data found in the current study, women who develop GDM have significantly lower adiponectin values at the beginning of gestation along with higher BMI, sBP and TNF- α when compared to women who remain NGT, suggesting a role for adiponectin/TNF- α in GDM risk. However, the role of adiponectin or TNF- α as a predictor of the risk of developing GDM is substantially less important than that of pre-gestational BMI. Nor were any of the other potential biomarkers studied superior to BMI in their association with GDM.

Adiponectin and leptin are secreted by adipose tissue and the placenta, and both have an effect on glucose homeostasis during pregnancy. Previous studies in pregnant women have shown that as pregnancy progressed, serum levels of leptin increased in women with GDM [11,33]. Some studies related GDM to a placental inflammatory component leading to increased leptin production [34,35]. However, to date there have been very few studies focusing on adipokines with follow-up during pregnancy, with scarce data after delivery.

The metabolic changes observed in our study associated with the appearance of GDM (24–28 GW) were an increase in insulin and leptin levels with a simultaneous decrease in adiponectin levels and in insulin sensitivity. These alterations persisted 2–3 years postpartum and were associated with an over-expression of miR-222-3p and higher levels of IL-6 and TNF- α . These results are in line with a previous prospective study which detected a relationship between leptin, adiponectin and insulin resistance that persisted after pregnancy despite unchanged body fat content and distribution. GDM was associated with subclinical inflammation, and affected women showed increased plasma leptin and lower plasma adiponectin levels independently of the degree of insulin sensitivity or obesity [36].

Can these changes be prevented with a nutritional intervention? We have found that the latter, based on the principles of the Mediterranean Diet, when applied early in pregnancy significantly reduced the elevation of the levels of insulin, IL-6, leptin and HOMA-IR values at the time of screening for GDM and 2–3 years post-delivery, as well as the concomitant over-expression of miR-103a-3p and miR-222-3p. These data indicate that a nutritional intervention based on the Mediterranean Diet result in reduced leptin and insulin levels and over-expression of miR-103a-3p and miR-222-3p. These changes are similar both during gestation and postnatally. These results reinforce the hypothesis that leptin may be involved in both the pathway of GDM and the protective effect of the MedDiet on GDM development, irrespective of body weight.

Serum expression of miR-222-3p and miR-103a-3p were both inversely correlated with TNF- α , IL-6, FPI and HOMA-IR values at 24–28 GW and 2–3 years PD. When controlled for pre-gestational BMI, all correlations in the expression of these miRNAs with insulin, HOMA-IR, leptin, TNF- α and IL-6 as well as with its changes in relation to Visit 1 persisted at 24–28 GW and 2–3 years PD.

Few studies have investigated miRNA expression in sera from women with GDM, and their results are highly contradictory. Shi et al. [37] analyzed omental adipose tissue in women with GDM at 38–39 weeks of gestation and observed increased miR-222-3p expression in serum. The authors suggested that miR-222-3p could play an important role in the development of insulin resistance. In fact, in an experimental assay with rats, miR-222-3p was observed to cause downregulation of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and consequent inactivation of other proteins of the insulin cascade with alteration of glucose transporter 4 (GLUT4) [20]. Ali Tagoma et al. [37] analyzed miRNAs in plasma from 13 pregnant women and observed that out of 84 miRNAs there was an increased expression of miR-195. Some studies have described that miRNAs, such as miR-29a-3p, miR-132-3p and miR-222-3p, show significant differences in their expression in serum in the first weeks of pregnancy [23]. Moreover, Wander et al. [24] observed an increased expression of miR-29a-3p in those women with GDM and male offspring. The accumulated evidence appears to indicate an important role for miR-132-3p and MiR-222-3p expression in glucose homeostasis, regulation of adipose tissue, and GLUT4 [22,37,38]. However,

the data obtained in the present study do not suggest any involvement of miR-29a-3p or miR-132-3p with GDM in our sample.

Some experimental and longitudinal studies associate miR-103a-3p with T2DM and cardiovascular diseases. MiR-103a-3p is found in adipose tissue cells, regulating mRNA expression, and causing insulin resistance by altering GLUT4, IRS-1 and caveolin-1 (cav-1) [39]. As mentioned, in our study group we found a positive correlation between miR-103a-3p and high levels of leptin and TNF- α and low levels of adiponectin in women at 24–28 GW that was maintained 2–3 years postpartum. However, in a recent study evaluating the possibility of using miRNAs as a diagnostic test for fetal hypoxia in plasma at 32 and 37 GW, no significant differences in miR-103a-3p were found [40].

The current study shows that women with GDM when compared with women who remained NGT during pregnancy had a higher BMI and waist circumference at 2–3 years postpartum with higher rates of abnormal glucose regulation (36%) and metabolic syndrome (23%). These data indicate that GDM represents a very important risk factor for glucose dysregulation and cardiovascular disease in the postnatal period. These changes are associated with higher levels of insulin, HOMA-IR, leptin and TNF- α than the NGT group, as well as a significantly greater change and increment of these three variables from their baseline levels.

In summary, the data obtained in this study show that women who will develop GDM (24–28 GW) already have significantly lower levels of adiponectin and higher values of BMI and sBP at the beginning of pregnancy (8–12 GW). The metabolic changes associated with the appearance of GDM are a significantly greater increase in insulin and leptin levels and a reduction in adiponectin levels than what is observed in women not developing GDM. These changes induce an increase in insulin resistance. These data are similar to those found in the postnatal assessment of T2DM and are associated at both times with an overexpression of miR-222-3p.

Nutritional intervention based on the principles of the Mediterranean Diet is accompanied by a significant decrease in the levels of insulin, IL-6 and leptin and in HOMA-IR values at the time of the GDM screening (24–28 GW) associated with an overexpression of miR-103a-3p in addition to miR-222-3p. These changes persist at the time of postnatal screening T2DM (2–3 years PD) except for leptin, which loses its statistical significance. Pistachios and EVOO are rich in unsaturated fatty acids, magnesium, and other phytochemical constituents with potential beneficial effects on insulin sensitivity, fasting glucose levels and inflammation. We hypothesize that their antioxidant capacity, given their high levels of lutein, β -carotene and γ -tocopherol, may enhance miR-103a-3p and miR-222-3p overexpression and improve the inflammatory cytokine profiles linked to GDM development.

Limitations and Strengths

Several limitations were found in our study. First, when MedDiet-based nutritional intervention was assessed, differences in diet between groups may have not been substantial enough to induce changes in sera adipokines and miRNAs. Both groups (IG and CG) received recommendations based on the Mediterranean Diet, reinforced with EVOO and pistachios or restricted consumption of total fats during gestation, and both groups received the same recommendations after delivery. The differences obtained in the score of the questionnaires used between both groups were over two points during pregnancy/after delivery, a difference that can be considered insufficient to detect these effects. On the other hand, differences in the intake of fat-soluble vitamins, which have not been evaluated in the study, could also affect the results. Secondly, the wide methodological ranges in the detected values of adipokines and miRNAs, with SDs values elevated to the point that they can in fact be higher than the calculated means make statistically significant differences more difficult to attain. Another important limitation concerns the location of body fat in body composition. Ectopic fat is more frequent in the presence of low levels of adiponectin. Therefore, our study would probably not have detected significant differences between women with GDM and NGT.

However, in this prospective study, each woman was analysed at three successive times, early in pregnancy (8–12 GW), at the time of screening for GDM (24–28 GW) and at the time of postnatal screening for type 2 diabetes mellitus. This approach permitted analysis of the dynamics of the parameters studied compared to early pregnancy, as well as the differences/similarities of the risk factors involved in GDM and postnatal T2DM. These aspects are the greatest strengths of our study.

5. Conclusions

In conclusion, the nutritional intervention based on the principles of the Mediterranean Diet is associated with an overexpression of miR-222 and miR-103 that correlates with an improvement in insulin sensitivity and in the inflammatory profile of cytokines.

Measurement of these parameters can contribute to early detection of abnormal glucose regulation during pregnancy and in the postnatal period. Furthermore, they underline the importance of strategies directed towards nutritional intervention based on the Mediterranean Diet early in pregnancy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14224712/s1>.

Author Contributions: Conceptualization: A.B., A.L.C.-P., N.G.d.I.T. and J.V.; data curation: A.B., A.L.C.-P., N.G.d.I.T., I.J., L.d.V., V.M. and J.V.; formal analysis: A.B., A.L.C.-P. and N.G.d.I.T.; P.D.M., I.M., C.F. and M.A.R.; funding acquisition: A.L.C.-P. and N.G.d.I.T.; investigation: A.L.C.-P., M.J.T., P.D.M., A.B., I.M., C.F., A.D. (Alejandra Durán), A.D. (Angel Diaz), P.M. and M.A.R.; methodology: A.L.C.-P., N.G.d.I.T., A.D. (Alejandra Durán), C.F., I.J., M.J.T., I.M., P.D.M., P.M., A.B., L.d.V., V.M., J.V. and M.A.R.; supervision: A.L.C.-P., A.B., N.G.d.I.T. and M.A.R.; validation: A.L.C.-P. and A.B.; visualization: A.L.C.-P. and A.B.; writing—original draft: A.L.C.-P., J.V., N.G.d.I.T. and A.B.; writing—review and editing: J.V., A.L.C.-P., A.B., N.G.d.I.T. and M.A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III/MICINN of Spain under grant number PI20/01758, and European Regional Development Fund (FEDER) “A way to build Europe” and Ministerio de Ciencia e Innovación, and Agencia Estatal de Investigación of Spain under grant number PREDIGES RTC2019-007406-1. The design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, and approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication are the responsibilities of the authors alone and independent of the funders.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Clinical Trials Committee of the Hospital Clínico San Carlos (CI 13/296-E), Madrid, Spain and conducted according to the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: All women signed the informed consent form at the onset of the trial.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information File S1 Deidentified dataset.xlsx.

Acknowledgments: We wish to acknowledge our deep appreciation to the administrative personnel and nurses and dieticians from the Laboratory Department (Marisol Sanchez Orta, María Dolores Hermoso Martín, María Victoria Saez de Parayuelo), the Pregnancy and Diabetes Unit and to all members of the Endocrinology and Nutrition and Obstetrics and Gynecology departments of the San Carlos Clinical Hospital.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as directly or indirectly prejudicing the impartiality of the research reported.

References

1. Vounzoulaki, E.; Khunti, K.; Abner, S.C.; Tan, B.K.; Davies, M.J.; Gillies, C.L. Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2020**, *369*, m1361. [CrossRef] [PubMed]
2. Plows, J.F.; Stanley, J.L.; Baker, P.N.; Reynolds, C.M.; Vickers, M.H. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3342. [CrossRef] [PubMed]

3. Filardi, T.; Catanzaro, G.; Mardente, S.; Zicari, A.; Santangelo, C.; Lenzi, A.; Morano, S.; Ferretti, E. Non-Coding RNA: Role in Gestational Diabetes Pathophysiology and Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Abell, S.K.; De Courten, B.; Boyle, J.A.; Teede, H.J. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 13442–13473. [\[CrossRef\]](#)
5. Barbour, L.A.; McCurdy, C.E.; Hernandez, T.L.; Kirwan, J.P.; Catalano, P.M.; Friedman, J.E. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* **2007**, *30* (Suppl. S2), S112–S119. [\[CrossRef\]](#)
6. Ruiz-Gracia, T.; Duran, A.; Fuentes, M.; Rubio, M.A.; Runkle, I.; Carrera, E.F.; Torrejón, M.J.; Bordiú, E.; Valle, L.D.; García de la Torre, N.; et al. Lifestyle patterns in early pregnancy linked to gestational diabetes mellitus diagnoses when using IADPSG criteria. The St Carlos gestational study. *Clin. Nutr.* **2016**, *35*, 699–705. [\[CrossRef\]](#)
7. Barabash, A.; Valerio, J.D.; Garcia de la Torre, N.; Jimenez, I.; Del Valle, L.; Melero, V.; Assaf-Balut, C.; Fuentes, M.; Bordiú, E.; Duran, A.; et al. TCF7L2 rs7903146 polymorphism modulates the association between adherence to a Mediterranean diet and the risk of gestational diabetes mellitus. *Metabol. Open* **2020**, *8*, 100069. [\[CrossRef\]](#)
8. Assaf-Balut, C.; García de la Torre, N.; Durán, A.; Fuentes, M.; Bordiú, E.; Del Valle, L.; Familiar, C.; Ortolá, A.; Jiménez, I.; Herraiz, M.A.; et al. A Mediterranean diet with additional extra virgin olive oil and pistachios reduces the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM): A randomized controlled trial: The St. Carlos GDM prevention study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185873. [\[CrossRef\]](#)
9. Santangelo, C.; Zicari, A.; Mandosi, E.; Scazzocchio, B.; Mari, E.; Morano, S.; Masella, R. Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds? Current knowledge and future perspectives. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1129–1144. [\[CrossRef\]](#)
10. Miehle, K.; Stepan, H.; Fasshauer, M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin. Endocrinol.* **2012**, *76*, 2–11. [\[CrossRef\]](#)
11. Highman, T.J.; Friedman, J.E.; Huston, L.P.; Wong, W.W.; Catalano, P.M. Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1998**, *178*, 1010–1015. [\[CrossRef\]](#)
12. Hedderston, M.M.; Darbinian, J.; Havel, P.J.; Quesenberry, C.P.; Sridhar, S.; Ehrlich, S.; Ferrara, A. Low prepregnancy adiponectin concentrations are associated with a marked increase in risk for development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 3930–3937. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Rabe, K.; Lehrke, M.; Parhofer, K.G.; Broedl, U.C. Adipokines and Insulin Resistance. *Mol. Med.* **2008**, *14*, 741–751. [\[CrossRef\]](#)
14. Chen, J.; Tan, B.; Karteris, E.; Zervou, S.; Digby, J.; Hillhouse, E.W.; Vatish, M.; Rande, H.S. Secretion of adiponectin by human placenta: Differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* **2006**, *49*, 1292–1302. [\[CrossRef\]](#)
15. Xu, J.; Zhao, Y.H.; Chen, Y.P.; Yuan, X.L.; Wang, J.; Zhu, H.; Lu, C.M. Maternal circulating concentrations of tumor necrosis factor- α , leptin, and adiponectin in gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 926932. [\[CrossRef\]](#)
16. Feng, J.; Xing, W.; Xie, L. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1729. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Geekiyanage, H.; Rayatpisheh, S.; Wohlschlegel, J.A.; Brown, R., Jr.; Ambros, V. Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 24213–24223. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhu, H.; Leung, S.W. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: A meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetologia* **2015**, *58*, 900–911. [\[CrossRef\]](#)
19. Gomes, P.R.; Graciano, M.F.; Pantaleão, L.C.; Rennó, A.L.; Rodrigues, S.C.; Velloso, L.A.; Latorraca, M.Q.; Carpinelli, A.R.; Anhe, G.F.; Bordin, S. Long-term disruption of maternal glucose homeostasis induced by prenatal glucocorticoid treatment correlates with miR-29 upregulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2014**, *306*, E109–E120. [\[CrossRef\]](#)
20. Ono, K.; Igata, M.; Kondo, T.; Kitano, S.; Takaki, Y.; Hanatani, S.; Sakaguchi, M.; Goto, R.; Senokuchi, T.; Kawashima, J.; et al. Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191553. [\[CrossRef\]](#)
21. Luo, M.; Xu, C.; Luo, Y.; Wang, G.; Wu, J.; Wan, Q. Circulating miR-103 family as potential biomarkers for type 2 diabetes through targeting CAV-1 and SFRP4. *Acta Diabetol.* **2020**, *57*, 309–322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zhang, Z.; Wu, S.; Muhammad, S.; Ren, Q.; Sun, C. miR-103/107 promote ER stress-mediated apoptosis via targeting the Wnt3a/ β -catenin/ATF6 pathway in preadipocytes. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 843–853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Zhao, C.; Dong, J.; Jiang, T.; Shi, Z.; Yu, B.; Zhu, Y.; Chen, D.; Xu, J.; Huo, R.; Dai, J.; et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23925. [\[CrossRef\]](#)
24. Wander, P.L.; Boyko, E.J.; Hevner, K.; Parikh, V.J.; Tadesse, M.G.; Sorensen, T.K.; Williams, M.A.; Enquobahrie, D.A. Circulating early- and mid-pregnancy microRNAs and risk of gestational diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2017**, *132*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
25. Ibarra, A.; Vega-Guedes, B.; Brito-Casillas, Y.; Wäagner, A.M. Diabetes in Pregnancy and MicroRNAs: Promises and Limitations in Their Clinical Application. *Noncoding RNA* **2018**, *4*, 32. [\[CrossRef\]](#)
26. Mohany, K.M.; Al Rugaie, O.; Al-Wutayd, O.; Al-Nafeesah, A. Investigation of the levels of circulating miR-29a, miR-122, sestrin 2 and inflammatory markers in obese children with/without type 2 diabetes: A case control study. *BMC Endocr. Disord.* **2021**, *21*, 152. [\[CrossRef\]](#)
27. Harreiter, J.; Simmons, D.; Desoye, G.; Corcoy, R.; Adelantado, J.M.; Devlieger, R.; Van Assche, A.; Galjaard, S.; Damm, P.; Mathiesen, E.R.; et al. IADPSG and WHO 2013 Gestational Diabetes Mellitus Criteria Identify Obese Women with Marked Insulin Resistance in Early Pregnancy. *Diabetes Care* **2016**, *39*, e90–e92. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

28. Cruz, A.F.; Calle-Pascual, A.L. Diabetes Nutrition and Complications Trial: Trends in nutritional pattern between 1993 and 2000 and targets of diabetes treatment in a sample of Spanish people with diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 984–987. [\[CrossRef\]](#)
29. Assaf-Balut, C.; García De La Torre, N.; Fuentes, M.; Durán, A.; Bordiú, E.; Del Valle, L.; Valerio, J.; Jiménez, I.; Herraiz, M.; Izquierdo, N.; et al. A High Adherence to Six Food Targets of the Mediterranean Diet in the Late First Trimester is Associated with a Reduction in the Risk of Materno-Foetal Outcomes: The St. Carlos Gestational Diabetes Mellitus Prevention Study. *Nutrients* **2018**, *11*, 66. [\[CrossRef\]](#)
30. Alberti, K.G.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.C.; James, W.P.; Loria, C.M.; Smith, S.C., Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645. [\[CrossRef\]](#)
31. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, e45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. The Jamovi Project. Jamovi (Version 1.6). 2021. Available online: <https://www.jamovi.org> (accessed on 1 January 2022).
33. Bogdanet, D.; Reddin, C.; Murphy, D.; Doheny, H.C.; Halperin, J.A.; Dunne, F.; O'Shea, P.M. Emerging Protein Biomarkers for the Diagnosis or Prediction of Gestational Diabetes—A Scoping Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1533. [\[CrossRef\]](#)
34. Pantham, P.; Aye, I.L.M.H.; Powell, T.L. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta* **2015**, *36*, 709–715. [\[CrossRef\]](#)
35. Lee, S.R.; Choi, W.-Y.; Heo, J.H.; Huh, J.; Kim, G.; Lee, K.-P.; Kwun, H.-J.; Shin, H.-J.; Baek, I.-J.; Hong, E.-J. Progesterone increases blood glucose via hepatic progesterone receptor membrane component 1 under limited or impaired action of insulin. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16316. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Winzer, C.; Wagner, O.; Festa, A.; Schneider, B.; Roden, M.; Bancher-Todesca, D.; Pacini, G.; Funahashi, T.; Kautzky-Willer, A. Plasma Adiponectin, Insulin Sensitivity, and Subclinical Inflammation in Women With Prior Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 1721–1727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Shi, Z.; Zhao, C.; Guo, X.; Ding, H.; Cui, Y.; Shen, R.; Liu, J. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER α expression in estrogen-induced insulin resistance. *Endocrinology* **2014**, *155*, 1982–1990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Deiuliis, J.A. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int. J. Obes.* **2016**, *40*, 88–101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Frias, F.T.; Rocha, K.C.E.; de Mendonça, M.; Murata, G.M.; Araujo, H.N.; de Sousa, L.G.O.; de Sousa, É.; Hirabara, S.M.; Leite, N.C.; Carneiro, E.M.; et al. Fenofibrate reverses changes induced by high-fat diet on metabolism in mice muscle and visceral adipocytes. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 3515–3528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Tagliaferri, S.; Cepparulo, P.; Vinciguerra, A.; Campanile, M.; Esposito, G.; Maruotti, G.M.; Zullo, F.; Annunziato, L.; Pignataro, G. miR-16-5p, miR-103-3p, and miR-27b-3p as Early Peripheral Biomarkers of Fetal Growth Restriction. *Front. Pediatr.* **2021**, *9*, 611112. [\[CrossRef\]](#)



TCF7L2 rs7903146 polymorphism modulates the association between adherence to a Mediterranean diet and the risk of gestational diabetes mellitus

Ana Barabash^{a, b, 1}, Johanna D. Valerio^{a, 1}, Nuria Garcia de la Torre^{a, b}, Inés Jimenez^a, Laura del Valle^a, Verónica Melero^a, Carla Assaf-Balut^a, Manuel Fuentes^c, Elena Bordiu^{a, d}, Alejandra Durán^{a, d}, Miguel A. Herraiz^e, Nuria Izquierdo^e, María J. Torrejón^f, Paz de Miguel^{a, d}, Isabelle Runkle^{a, d}, Miguel A. Rubio^{a, d}, Alfonso L. Calle-Pascual^{a, b, d, *}

^a Endocrinology and Nutrition Department. Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain

^c Preventive Medicine Department. Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del University Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^d Medicina 2 Department, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^e Gynecology and Obstetrics Department. Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^f Clinical Laboratory Department. Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2020

Received in revised form

22 November 2020

Accepted 23 November 2020

Available online 26 November 2020

Keywords:

Gestational diabetes mellitus

Mediterranean diet

Nutritional intervention

TCF7L2 polymorphism

Gene-diet interaction

ABSTRACT

Objective: There is sparse evidence for the impact of gene-diet interaction on gestational diabetes mellitus (GDM) onset. Recent findings have shown that late first-trimester high adherence to a Mediterranean diet (MedDiet) pattern is associated with a GDM risk reduction. The aim of this study was to investigate if this effect could be modulated by TCF7L2 rs7903146 polymorphism.

Research design and methods: A total of 874 pregnant women participants in the St Carlos GDM prevention study, were stratified into three groups defined as “High, 5–6 on targets”, “Moderate, 2–4 on targets” or “Low, 0–1 on targets” adherence to Mediterranean diet according to late first-trimester compliance with six food targets: >12 servings/week of vegetables, >12 pieces/week of fruits, <2 servings/week of juice, >3 servings/week of nuts, >6 days/week and >40 mL/day consumption of extra virgin olive oil. All patients were genotyped for rs7903146 using Taqman technology.

Results: Logistic regression analysis revealed that the risk of developing GDM in those with high adherence versus low adherence was significantly reduced only in carriers of the T-allele (CT + TT), with an adjusted odds ratio of 0.15 (95% CI: 0.05–0.48). This effect was not observed in CC carriers. Interaction analysis yielded significant rs7903146-MedDiet interaction in GDM risk ($p < 0.03$).

Conclusions: Women carrying the rs7903146 T-allele who highly adhere to a MedDiet early in pregnancy have lower risk of developing GDM than CC carriers. This reinforces the importance of identifying patients at risk of GDM who would be especially sensitive to nutritional interventions based on their genetic characteristics.

© 2020 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author. Hospital Clínico San Carlos, Endocrinology and Nutrition Department, Martín Lagos s/n, 1a Sur, E-28040, Madrid, Spain.

E-mail addresses: acalle.edu@gmail.com, alfonsoluis.calle@salud.madrid.org (A.L. Calle-Pascual).

¹ Contributed equally.

1. Introduction

Increasing evidence suggests that dietary patterns during pregnancy have an important role in the development of gestational diabetes mellitus (GDM). Our group has previously reported

that adopting healthy dietary patterns early on in pregnancy reduces the risk of developing GDM. Moreover, the adherence to a Mediterranean Diet (MedDiet) supplemented with extra virgin olive oil (EVOO) and pistachios- or just emphasizing the recommendations of a daily consumption of EVOO and nuts, was associated with a 30% reduction in the incidence of GDM [1–3]. Furthermore, we have recently shown that GDM risk can be modified depending on the degree of adherence to a MedDiet. There seems to be an inverse linear relationship between late first-trimester (>12 gestational week-GW) degree of adherence to a MedDiet pattern and the incidence of GDM, where having a high adherence is associated with a 65% reduction GDM risk [4].

In recent years, nutrigenetic studies have provided growing evidence that genetic variants confer individual differences in response to nutritional interventions and that a gene-diet interaction may modify Type 2 diabetes mellitus (T2DM) risk. Several association studies and meta-analysis have demonstrated that GDM may share the same genetic susceptibilities with T2DM. Genome-wide association (GWA) studies have provided strong evidence that single nucleotide polymorphisms (SNPs) within Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2) gene influence both T2DM and GDM risk [5–8].

The TCF7L2 gene encodes T-cell transcription factor 4 (TCF4) that plays a key role in the Wnt signaling pathway. It is crucial in the beta-cell genesis and function and it is considered as a main regulator of glucose homeostasis. The T-allele of the rs7903146 (C/T) SNP in TCF7L2 has been significantly associated with an increased risk of T2DM and GDM. Although it is an intronic variant it has a functional effect by modulating the transcriptional machinery that regulates the glucose response. In fact, T-allele has been associated with impaired beta-cell function and insulin secretion and lower insulin levels [9].

Some studies have reported that rs7903146 T-allele modifies the beneficial effect of specific foods, like whole-grain intake, on T2DM risk while others have not [10,11]. There are scarce data on the influence of an overall healthy food pattern, such as the MedDiet pattern, in modulating the associations between the rs7903146 polymorphism and T2DM risk. Corella et al. demonstrated that MedDiet significantly interacts with rs7903146 on fasting blood glucose (FBG) at baseline, reporting higher fasting glucose concentrations in TT carriers than CC + CT individuals when adherence to MedDiet was low. Conversely when the adherence was high this increase was not observed [12].

As far as we know, no rs7903146–diet interaction data have been published for GDM. Therefore, the aim of this study was to investigate whether the association between the degree of adherence to a MedDiet pattern – based on six food targets – at the end of the first trimester (<12 GW) and GDM incidence is modulated by a TCF7L2 rs7903146 polymorphism.

2. Research design and methods

2.1. Study design and participants

We included 874 women entering The St. Carlos GDM prevention study [2]. This was a randomized controlled trial aimed to assess the effect of an intervention based on MedDiet supplemented with EVOO and pistachios on the incidence of GDM. This paper is based on a posterior post hoc analysis evaluating the associations of late first-trimester degrees of adherence to the six food targets (high, moderate, and low) with the risk of GDM. The trial was conducted from January 1st to December 31st, 2015 and the follow-up finished on July 2016. Details of these studies have been thoroughly described elsewhere [2,4].

The primary objective of this study is to evaluate the influence of

the TCF7L2 rs7903146 polymorphism on the effect of the different degrees of adherence to the MedDiet on the incidence of GDM.

Briefly, all pregnant women who attended the first gestational visit at 8–12 GWs and had a normal fasting serum glucose level (<92 mg/dL) were invited to participate in this study. Inclusion and exclusion criteria were previously detailed [2,4]. GDM was diagnosed at 24–28 GWs with a single 2-h 75-g oral glucose tolerance test (OGTT), applying International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) criteria.

Participants were randomized at 12–14 GWs to a control or intervention group. Both groups were followed up at baseline (visit 1); GDM screening, performed at 24–28 GWs (visit 2); 36–38 GWs (visit 3); and delivery. The two groups received dietary guidelines, based on MedDiet principles. The intervention group attended a group session where they were instructed to enhance the consumption of EVOO and nuts. Meanwhile, the control group was told to limit the consumption of all types of fats. A semi-quantitative frequency questionnaire based on the Diabetes Nutrition and Complications Trial (DNCT) study and the 14-point Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS), adapted for pregnancy, were used to evaluate lifestyle patterns and applied at each follow-up visit. A detailed description of how lifestyle and diet were evaluated has been published previously [2,4].

For the present post-hoc analysis, the variables were retrieved from the main study database. The study population was treated as a cohort, independent of randomization assignment. The sample was stratified into three groups according to the degree of adherence to the MedDiet in late first trimester (from 12 to 14 to 24–28 GWs) as previously described [4]. Six food targets were chosen from the MedDiet. These were an intake of ≥ 40 mL/day of EVOO, an intake of EVOO >6 times/week, and an intake of >3 servings/week of nuts, >12 servings/week of vegetables, >12 pieces/week of whole fruits, <2 servings/week of juice. A high adherence was set for achieving 5–6 targets; moderate for 2–4 targets; and low for 0–1 targets. The post-hoc analysis of the data verified that the degree of compliance to the six food targets correlated positively with both the MEDAS and Nutrition scores and that the use of these six food-groups could be able to estimate an optimal adherence to MedDiet [4].

The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Clínico San Carlos (July 17, 2013 (CI 13/296-E)) and conducted according to the Helsinki Declaration. All patients signed informed consent.

2.2. Participant's history, anthropometric data and biochemical analysis

A family history of T2DM and metabolic syndrome, obstetric history of GDM and miscarriages, educational status, employment, number of prior pregnancies, smoking habit, and gestational age at entry were recorded at baseline in visit 1. Blood pressure, gestational weight gain, and body mass index (BMI) were evaluated and recorded at 8–12, 24–28 and 36–38 GWs. Pre-gestational body weight (BW) was self-referred and registered at Visit 1. Laboratory tests were scheduled for each visit. Blood was drawn after an overnight fast. Serum levels of glucose, lipids and other parameters were determined using standard automated methods as previously described (4).

2.3. Genotyping

Genomic DNA was extracted with the DNAzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. Genotyping was performed using a predesigned TaqMan assay for rs7903146 (C_29347861_10) using a 7500 Fast

Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A genotyping call rate over 95% per plate, negative sample controls and three well-differentiated genotyping clusters were required to validate results. Intra and interplate duplicates of several DNA samples were included.

2.4. Statistical analysis

Categorical variables were expressed with their frequency distribution and continuous variables as means and standard deviation (SD) or means and 95% confidence interval (CI). The Saphiro–Wilk test was used to verify normal distribution of the data. For continuous variables, the Kruskal–Wallis test or a one-way analysis of variance (ANOVA) were applied. SNPStats software was used to evaluate Hardy–Weinberg equilibrium and the association between SNPs and GDM risk under multiple inheritance models: co-dominant, dominant, recessive, over-dominant and log-additive [13]. For each polymorphism, Odds Ratio (ORs) and 95% CIs were calculated by unconditional logistic regression analysis. Dominant homozygotes were selected as reference. The Chi square for linear trends and unadjusted logistic regression analysis (women with a low adherence as the reference group) was performed, to evaluate the relationship between the different degrees of adherence and GDM and genotype. For the GDM outcomes, a subgroup analysis was conducted, introducing the interaction term between the adherence and the stratification variables. All p-values are 2-tailed at less than 0.050. Analyses were done using SPSS, version 21 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

Table 1 summarizes the socio-demographic, clinical, biochemical, and genetic characteristics of women according to late first-trimester degree of adherence to six food targets. The cohort was ethnically heterogeneous, the majority of Caucasian origin. Most participants were primiparous. As expected, significantly different genotype frequencies between ethnic populations were observed ($p < 0.001$), but not between the adherence groups, considering all the sample or according the different ethnic group. The “others” group was a heterogeneous group mainly composed by African Americans and Asians. There were differences between groups in the distributions of ethnicity, family history of T2DM and metabolic syndrome, education level, and parity.

3.1. Genotype association with GDM

Genotype frequencies did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium expectations. The SNPs was significantly associated with lower OR of having a GDM under codominant, dominant and overdominant models, at the expense of heterozygotes CT in the crude analysis. However, after adjustment for ethnicity, family history of metabolic disorders, parity, and BMI, only the protective effect of heterozygote CT genotype remained significant under overdominant model (Table 2).

TCF7L2 rs7903146-T variant was also significantly associated with mean BMI in all models except the recessive in the crude analysis (Supplementary Table S1). However, after stratifying by BMI there were no differences in GDM risk between groups (obese diabetics vs obese controls, $p = 0.451$; non-obese diabetics vs non-obese controls, $p = 0.169$). Moreover, when we repeated the same analysis adjusted for by age, ethnicity, parity and family history of DM, all significations were lost. Nonetheless, considering the differences found in genotype frequencies between ethnic groups and the genotype association with BMI, data were also adjusted for BMI in all the interaction analyses.

3.2. Associations and interaction between late first-trimester degrees of adherence and GDM risk

Crude logistic regression analysis of the risk of having GDM according to the degree of adherence in the whole sample and stratified by rs7903146 genotype showed that the higher the adherence to the six food targets, the lower the incidence and risk of GDM in all groups, but it seems to be only at the expense of heterozygotes CT or carriers of the T-allele (CT + TT). In carriers of the CC genotype the risk among the three groups is almost unchanged, however none of the TT carriers developed GDM. Considering this, for the following analyses the CT and TT genotypes were grouped together (Supplementary Table S2).

Table 3 shows adjusted analysis of data by age, ethnicity, parity, family history of DM and pregestational BMI. Only in carriers of the T-allele (CT + TT) the risk of developing GDM in those with moderate and high adherence was significantly reduced compared to women with a low adherence, both when taking as the reference group the low adherence group (85% risk reduction) or the low adherence plus C/C genotype group (77% risk reduction). Only a small percentage (7.4%) of carriers of the T-allele that were highly adherent developed GDM, while the majority did not (92.6%). This effect is not observed in carriers of the CC genotype. All the interaction analysis, crude or adjusted yielded significant rs7903146–MedDiet interaction in GDM risk ($p < 0.04$).

We also performed the interaction analysis looking at OGTT glucose levels (Supplementary Table S3). We did not find any rs7903146 modulatory effect on the FBG, but at min 60, women with TT genotype and high adherence to the MedDiet, had lower blood glucose levels (113.67 mg/dl) than those with low adherence (136.33 mg/dl). The interaction disappeared at 120 min. Women carrying the C-allele reached similar blood glucose levels despite degrees of adherence to the MedDiet.

Fig. 1 shows the logistic regression analysis by subgroups for the probability of having GDM according to the level of adherence (in crude and stratified by BMI, age and parity). We have previously reported an interaction between BMI and the level of adherence (high versus low and moderate versus low) for the incidence of GDM ($p = 0.033$) in the way that the protective effect of having a high adherence to the six food targets was higher in women who are overweight and obese than those with a normal weight, both in the crude and adjusted analysis [4]. This effect almost overlaps with that of the T-allele. Overweight/obese women or carriers of the T-allele are those who benefit most from the protective effect of the high adherence to the six food targets (BMI OR 0.04, 95% CI 0.005–0.342, $p = 0.003$; rs7903146-T carriers OR 0.14, 95% CI 0.05–0.46).

4. Discussions

An inverse relationship between high-, moderate-, and low-adherence to six food targets of the MedDiet at the end of the first trimester (>12 GW) and GDM risk has been previously reported. Having a high or moderate adherence has been associated with a 65% or 44% GDM risk reduction respectively (4). The results of the current study demonstrated that TCF7L2 rs7903146 polymorphism may modulate this effect of the MedDiet on the incidence of GDM.

Some studies have reported gene–lifestyle interactions regarding T2DM incidence or GDM development [14], although the strength of evidence is still weak. TCF7L2 rs7903146 has been the most widely associated polymorphism with GDM risk across different populations. Most studies revealed that the rs7903146 T-allele was positively linked with GDM and have reported significant associations with global ORs of up to 1.65 [7,8,15], although some

Table 1

Characteristics of the clinical trial population at baseline according to late first-trimester degree of adherence to the six food targets.

Variables	Groups			p value
	Low adherence (n = 136/15.6%)	Moderate adherence (n = 623/71.3%)	High adherence (n = 115/13.1%)	
Age (years)	31.2 ± 6.0	33.1 ± 4.9	33.9 ± 4.9	0.001
Race/Ethnicity				0.005
Caucasian	79 (58.1)	420 (67.4)	88 (76.5)	
Hispanic	51 (37.5)	188 (30.2)	21 (18.3)	
Others	6 (4.4)	15 (2.4)	6 (5.2)	
TCF7L2 Genotype				
All				0.603
C/C	60 (45.5)	300 (48.4)	50 (47.6)	
C/T	59 (44.7)	259 (41.8)	49 (46.7)	
T/T	13 (9.8)	61 (9.8)	6 (5.7)	
Caucasian				0.291
C/C	26 (34.2)	166 (39.8)	37 (44)	
C/T	40 (52.6)	197 (47.2)	42 (50)	
T/T	10 (13.2)	54 (12.9)	5 [6]	
Hispanic				0.671
C/C	30 (60)	125 (66.5)	10 (58.8)	
C/T	18 [36]	57 (30.3)	7 (41.2)	
T/T	2 (4)	6 (3.2)	0 (0)	
Others				0.460
C/C	4 (66.7)	9 (60)	3 (75)	
C/T	1 (16.7)	5 (33.3)	0 (0)	
T/T	1 (16.7)	1 (6.7)	1 [25]	
Family history of:				0.019
Type 2 diabetes	28 (20.6)	131 (21.0)	21 (18.3)	
MetS (>2 components)	18 (13.2)	135 (21.7)	30 (26.1)	
Previous history of:				0.342
Gestational diabetes	7 (5.1)	15 (2.4)	3 (2.6)	
Miscarriages	45 (33.1)	196 (31.5)	37 (32.2)	
Educational status				0.001
Elementary education	19 (14.0)	54 (8.7)	5 (4.3)	
Secondary school	49 (36.0)	145 (23.3)	18 (15.7)	
University degree	65 (47.8)	420 (67.4)	92 (80.0)	
UNK	3 (2.2)	4 (0.6)	0 (0)	
Employment	100 (73.5)	482 (77.4)	92 (80.0)	0.815
Number of pregnancies				0.017
Primiparous	50 (36.8)	274 (44.0)	54 (47.8)	
Second pregnancy	43 (31.6)	196 (31.5)	42 (36.8)	
>2 pregnancies	43 (31.6)	153 (24.5)	19 (15.4)	
Smoker				0.260
Never	75 (55.1)	334 (53.6)	68 (59.1)	
Current	16 (11.8)	52 (8.3)	4 (3.5)	
Gestational age (weeks) at baseline	12.1 ± 0.7	12.1 ± 0.5	12.0 ± 0.5	0.137
Body Weight (kg)				0.383
Prepregnancy	61.1 ± 11.8	61.0 ± 10.8	59.5 ± 9.3	
At entry	63.3 ± 11.3	63.1 ± 11.1	61.5 ± 8.4	0.356
Weight gain	2.2 ± 3.2	2.0 ± 3.0	2.0 ± 2.7	0.707
BMI (kg/m ²)				0.137
Prepregnancy	23.4 ± 4.1	23.2 ± 3.8	22.5 ± 3.4	
At baseline	24.3 ± 4.3	23.9 ± 3.9	23.3 ± 3.5	0.111
Blood pressure (mm Hg):				0.972
Systolic	107 ± 10	107 ± 11	107 ± 10	
Diastolic	66 ± 15	66 ± 9	66 ± 8	0.809
Fasting blood glucose mg/dL	82 ± 5	81 ± 6	81 ± 7	0.377
HbA1c %	5.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.3	0.436
Cholesterol mg/dL	171 ± 28	175 ± 31	176 ± 25	0.507
Triglycerides mg/dL	82 ± 38	83 ± 42	76 ± 30	0.288
TSH mcIU/mL	1.9 ± 1.2	2.0 ± 1.3	2.1 ± 1.4	0.610
T4L ng/dL	8.6 ± 1.3	8.6 ± 1.6	8.9 ± 1.2	0.144

Data are Mean ± SD or n(%). MetS, Metabolic Syndrome. UNK, unknown. BMI, body mass index; MEDAS Score: Mediterranean Diet Adherence Screener Score. P Differences between groups analysed with ANOVA (continuous variables) and χ^2 test (categorical variables). MetS, Metabolic Syndrome. UNK, unknown. BMI, body mass index).

findings yielded controversial results [6,16–18]. In this study we found that the genotype TT was more frequent in GDM patients (11.1% vs 8.9%) but the difference was not statistically significant. On the contrary, carriers of CT genotypes had around 33% significant

lower risk of developing GDM in both the crude and adjusted analysis. Although, it cannot be ruled out that a true overdominance or advantage of heterozygotes may be the cause of the discrepancy with the published results, it may also be attributed to the fact that

Table 2
TCF7L2 rs7903146 genotype association with GDM.

Model	Genotype	No GDM	GDM	Crude analysis OR (95% CI)	p trend	Adjusted analysis* AIC	OR (95% CI)	p trend	AIC
All (n = 857)									
Codominant	C/C	316 (46.1%)	94 (54.6%)	1.00	0.038	858.8	1.00	0.09	825.3
	C/T	308 (45%)	59 (34.3%)	0.64 (0.45–0.92)			0.69 (0.47–1.01)		
	T/T	61 (8.9%)	19 (11.1%)	1.05 (0.60–1.84)			1.12 (0.62–2.02)		
Dominant	C/C	316 (46.1%)	94 (54.6%)	1.00	0.046	859.4	1.00	0.13	825.7
	C/T+T/T	369 (53.9%)	78 (45.4%)	0.71 (0.51–0.99)			0.76 (0.53–1.08)		
Recessive	C/C–C/T	624 (91.1%)	153 (89%)	1.00	0.4	862.6	1.00	0.33	827.2
	T/T	61 (8.9%)	19 (11.1%)	1.27 (0.74–2.19)			1.33 (0.76–2.35)		
Overdominant	C/C–T/T	377 (55%)	113 (65.7%)	1.00	0.011	856.9	1.00	0.03	823.4
	C/T	308 (45%)	59 (34.3%)	0.64 (0.45–0.91)			0.68 (0.47–0.97)		
Log-additive	–	–	–	0.86 (0.66–1.11)	0.25	862	0.90 (0.69–1.19)	0.47	827.6

Genotype distributions are shown as n(%) and odds ratio 95% CI (OR). CI, confidence interval; GDM, gestational diabetes mellitus; AIC, Values of Akaike's Information Criterion; P-trend values were calculated from adjusted or unadjusted logistic regression analysis for codominant, dominant, and recessive models. *Adjusted logistic regression by age, ethnicity, parity, family history of DM and pregestational BMI.

Table 3
Association between late first-trimester degree of adherence to the six food targets and GDM risk stratified by TCF7L2 rs7903146 genotype. Interaction analysis between genotypes and adherence (n = 856, in crude and adjusted by age, ethnicity, parity, family history of DM and BMI).

		No GDM	GDM	*Crude OR (95% CI)	*Adjusted OR (95% CI)	†Crude OR (95% CI)	†Adjusted OR (95% CI)
rs7903146 C/C	Low adherence	46 (76.6)	14 (23.3)	1.00	1.00	1.00	1.00
	Moderate adherence	231 (77.0)	69 (23.0)	0.98 (0.51–1.89)	0.83 (0.42–1.66)	0.98 (0.51–1.89)	0.83 (0.42–1.64)
	High adherence	39 (78.0)	11 (22.0)	0.93 (0.38–2.27)	1.06 (0.42–2.72)	0.93 (0.38–2.27)	1.06 (0.42–2.72)
rs7903146 C/T + T/T	Low adherence	49 (68.0)	23 (31.9)	1.00	1.00	1.54 (0.71–3.35)	1.53 (0.67–3.47)
	Moderate adherence	269 (84.0)	51 (15.9)	0.40 (0.23–0.72)	0.39 (0.21–0.741)	0.62 (0.32–1.22)	0.60 (0.29–1.21)
	High adherence	50 (92.6)	4 (7.4)	0.17 (0.05–0.52)	0.15 (0.05–0.48)	0.26 (0.08–0.84)	0.23 (0.07–0.77)
p-interaction				0.035	0.025	0.035	0.025

Data are n(%) Logistic regression analysis by genotype subgroups evaluating degree of adherence to the six food targets and risk of GDM; p-interaction: logistic regression analysis evaluating interactions between degree of adherence and genotypes. * Analysis with no GDM and Low adherence as reference; †Analysis with no GDM, Low adherence and C/C genotype as reference.

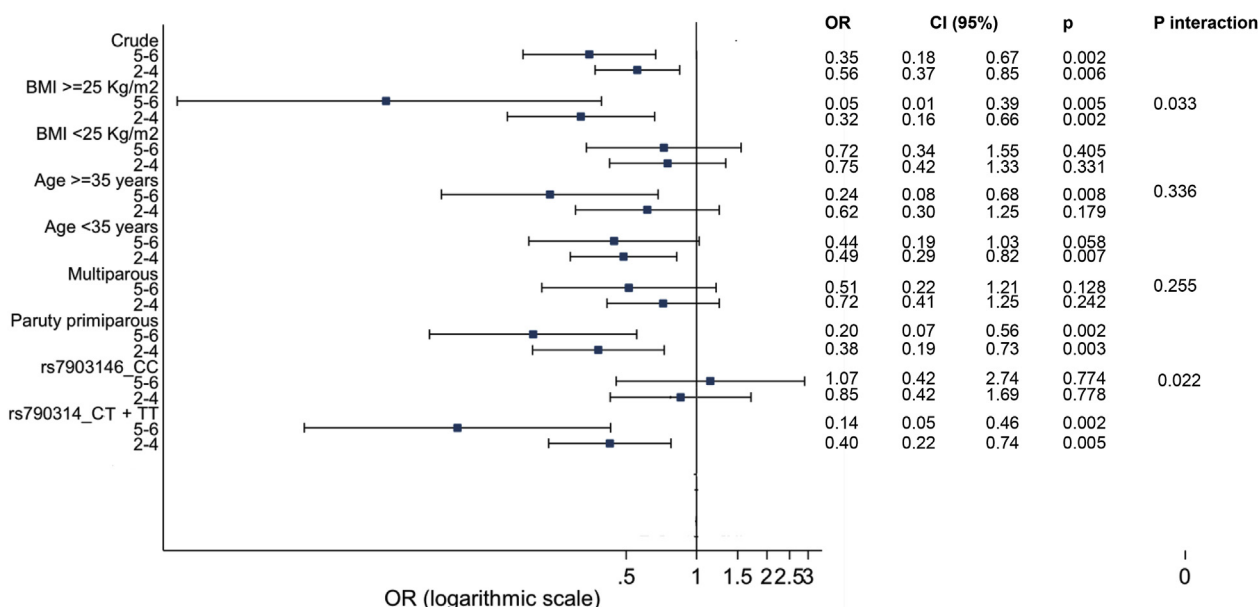


Fig. 1. Logistic regression analysis by subgroups (crude and stratified by BMI, age and parity) evaluating degree of adherence to the six food targets and risk of GDM. p: logistic regression analysis comparing ORs with the group of reference (low adherence group). p-interaction: logistic regression analysis evaluating interactions between degree of adherence and BMI (≥ 25 or < 25 kg/m²), age (≥ 35 or < 35 years), parity (multiparous or primiparous) and rs7903146 (CT + TT or CC). OR: odds ratio; CI: confidence interval; BMI: body mass index. High: high adherence, 5–6 targets; Moderate: moderate adherence, 2–4 targets; Low: low adherence, 0–1 targets.

the sample is not large enough to detect T associated risk, or due to differences in ethnicity, the GDM diagnostic criteria applied or even

the laboratory technique used for the allele detection.

In agreement with the current work, the T-allele was not

significantly associated to GDM in various studies in Spanish and other Caucasian populations, with similar risks obtained to ours [19–22]. Some authors have also found no association between rs7903146 and GDM risks in Euro-Brazilian or in Mexican population [23,24]. It is remarkable that in a recent meta-analysis from the combining results of 24 relevant publications including samples with different ethnicities, Wang et al. describe similar results to ours in the crude analysis in the whole sample, with analogous global ORs in all comparison models [15]. Apart from ethnicity, there is no apparent evidence to support that the diagnostic criteria using different OGTT could influence this association [7]. In agreement with our results, Klein et al. reported that in Caucasian women who were prospectively screened for GDM according to the IADPSG criteria, the T-allele was protective for GDM although the association was not statistically significant [25]. Curiously, Wu et al. have shown in their meta-analysis, that allelic detection of rs7903146 with another technique than the Taqman assays used in our study, was often significantly associated with increased risk of GDM because the T-allele was not properly identified in heterozygotes, consequently the homozygous genotypes were overrepresented [7]. Finally, as negative studies are less likely to be published, non-significant genetic associations might have been underreported, potentially leading to an overestimation of positive effects.

Interestingly, although our data have not been able to demonstrate an association between the presence of the T-allele and the risk of developing GDM, we found a significant gene-lifestyle interaction between rs7903146 and the degree of adherence to a MedDiet in the onset of GDM. We have shown that only in T-carriers the nutritional intervention modified the risk of developing GDM in a manner that women with moderate and high adherence had a reduced GDM risk compared to women with low adherence. This effect became significant when adjusted by age, ethnicity, parity, and gestational BMI and was not observed in carriers of the CC genotype. To the best of our knowledge this is the first time that it has been published a gene-diet interaction study investigating the modulatory influence of rs7903146 in the associations of an overall food pattern, such as the MedDiet, with GDM risk. Only a few studies of gene-lifestyle interactions and their influence on GDM development have been published. Popova et al. [22] and Grotenfelt et al. [26] found respectively an interaction effect of rs10830963-MTNR1B and rs1799884-GCK and the frequency of sausage intake on the risk of developing GDM.

Most nutrient-gene interactions studies have been conducted in T2DM. Opposite to our findings, some publications reported that the protective effect of whole-grain and fiber intake on diabetes risk was inversely associated with diabetes risk exclusively among rs7903146 CC homozygote carriers, whereas subjects carrying the T-allele seemed to benefit less or exhibit no benefit from whole-grain consumption [10,11]. However, other authors have also failed to replicate this interaction [27,28]. The majority of the studies show that T-carriers benefit most from a nutritional intervention. One publication based on data from EPIC-InterAct found a significant interaction between rs12255372, a polymorphism that is strong linkage disequilibrium with rs7903146, and coffee consumption, where the inverse association of coffee intake and T2DM was only present among participants carrying the risk-conferring T-allele [29].

Our results may be in agreement with those of Corella et al. that found a statistically significant interaction between adherence to an overall food pattern—a MedDiet supplemented with EVOO or nuts or low fat- and the rs7903146 polymorphism influencing fasting glucose concentrations. Only in TT carriers, women with low adherence to MedDiet had higher FBG levels than those with high adherence. This effect was not observed in CC + CT carriers where the FBG levels were similar regardless the MedDiet adherence score

[12].

The mechanism by which rs7903146 variant alters diabetes risk remains unknown. TCF7L2, encodes a high mobility group box-containing transcription factor that plays a key role in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Multiple studies have demonstrated that TCF7L2 rs7903146 T-variant is associated with both impaired insulin secretion due to defective β -cell genesis or function and with impaired insulinotropic effect of incretins [9,30,31]. Conversely, some authors have outlined a tendency to develop higher peripheral insulin sensitivity in carriers of the T-allele as compared with the non T-allele group [31] although a compensatory upregulation of insulin sensitivity in response to an inherent β -cell dysfunction cannot be excluded.

It has been recently proven that EVOO and other specific components of MedDiet, reduce β -cell apoptosis, normalize glucose-induced insulin secretion, delay absorption of carbohydrates, improve glucose uptake and metabolic control by lowering insulin resistance, influence incretin response and finally overcome insulin resistance [32]. Considering that maintenance of normal glucose homeostasis in pregnancy is dependent upon the capability of β -cells to increase the secretion of insulin to compensate the insulin resistance in late pregnancy, T-allele variant could affect beta cell proliferation and insulin secretion in response to specific foods and may influence GDM susceptibility. Given this, it would be rational to speculate that the effect of a healthy MedDiet would be more evident in women genetically susceptible by interacting on the same pathways and decreasing the risk of GDM.

Another possible explanation for our results with respect to obtaining higher benefits from the diet by being a carrier of the T-allele could be found in its relationship to BMI. Several authors have reported significant interactions between the MedDiet and rs7903146 influencing BMI, weight, and waist circumference. Their results are in line with ours in that a healthy diet provides a more beneficial effect in subjects carrying the T-allele. A randomized controlled trial with obese participants following a 10-wk intervention with hypoenergetic diets showed that obese individuals with the rs7903146 T-allele had better responses in weight loss and adiposity outcomes [33]. Roswall et al. showed that subjects carrying the T-allele experienced less weight gain when the adherence to the MedDiet was high [34]. Similarly, Sotos-Prieto et al. found in a Hispanic sample that subjects with CT + TT genotypes had lower weight and waist circumference when they score high to MedDiet adherence when compared with CC carriers [35]. Some authors have shown the T-allele was associated with lower BMI only in T2DM patients but not in controls [36]. Moreover, Corella et al. have suggested that the rs7903146–T2DM association had higher effect in lean compared with obese individuals [37]. Finally, other studies have found a negative impact of the rs7903146 T-allele on change in anthropometric measurements during lifestyle intervention [38–40].

Despite these findings, in our case it does not seem that BMI explains the result of the TCF7L2 rs7903146-diet interaction on the incidence of GDM. To explore the effect of BMI, we studied its association with rs7903146 and observed that a statistically significant association existed in all but the recessive model when we analysed the total group in crude. However, when we repeated the same analysis adjusted for age, parity and ethnicity, all significations were lost. Furthermore, there are no differences in BMI pre-pregnancy or at baseline nor in body weight pre-pregnancy, at entry or even in weight gain between the three separate groups according to MedDiet adherence. Furthermore, the interaction with adherence to the diet is maintained after adjusting for BMI and we have not found an interaction between polymorphism and weight gain according to MedDiet adherence levels.

All this suggests that in this case, it is not the interaction of

polymorphism with weight that would explain the results, but rather its effect on the glucose response to nutrient intake. In this respect, we found that during OGTT women who carried the TT genotype and had a high adherence to the MedDiet reached considerably lower blood 1-h glucose levels (113.67 mg/dl) in relation to those with low adherence (136.33 mg/dl). Women carrying the C-allele reached similar glucose concentrations among them. Thus, a direct effect of the T-allele on the glucose regulation cannot be excluded.

Finally, in a previous study based on this sample we reported that the protective effect of having a high adherence to the six food targets was higher in women who were overweight and obese and who were multiparous. Interactions indicated that women BMI with ≥ 25 could benefit the most from improvements in healthier dietary habits in pregnancy followed by multiparous. In this study we have ascertained that women carrying the T-allele benefited from the MedDiet almost as much as overweight/obese women. Only a small percentage (7.4%) of carriers of the T-allele that were high adherents developed GDM while the majority of those did not (92.6%). This effect was not observed in carriers of the CC genotype. Our data suggest that unfavourable genetic predisposition can be compensated by a healthy diet.

There are some limitations in this study. Our results may reflect the sample is not large enough to detect T-associated risks and is heterogeneous. Although the data provided were adjusted by ethnicity, some of the results may be attributable to specific ethnic effects. However, if conducting the analysis separated by ethnicity, each of the subgroups would have even more modest statistical power to demonstrate statistically significant associations or interactions of gene variants with GDM.

5. Conclusion

In conclusion, our results suggest that women carrying the risk T-allele of the TCF7L2 rs7903146 polymorphism who highly adhere to a MedDiet early in pregnancy had a significantly lower risk of developing GDM than women who do not. We have demonstrated that a possible unfavourable genetic predisposition may be counteracted by adopting healthier diets. This reinforces the importance of identifying patients at risk of GDM based on genetic characteristics which are especially sensitive to specific types of diets and the relevance of a prompt nutritional education to pregnant women. Further studies are required to identify diet interactions with population at risk of GDM. This may help to develop more individualized intervention strategies that can contribute to precision medicine.

Funding

This research was funded by grants from Fundación para Estudios Endocrinometabólicos, IdISSC Hospital Clínico San Carlos; the Instituto de Salud Carlos III of Spain under grant number PI17/01442; (Plan Nacional de I + D + I, AES 2013–2016 subvencionado por el ISCIII y cofinanciado and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)). The design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, and approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication are the responsibilities of the authors alone and independent of the funders.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

CRedit authorship contribution statement

Ana Barabash: Writing - original draft. **Johanna D. Valerio:** Writing - original draft. **Nuria Garcia de la Torre:** Supervision, helped in developing the protocol, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Inés Jimenez:** Data curation, Supervision, are delivering the intervention, helped in developing the protocol, building the women and offspring database, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Laura del Valle:** Data curation, Supervision, are delivering the intervention, building the women and offspring database, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Verónica Melero:** Supervision, are delivering the intervention, are delivering the intervention, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Carla Assaf-Balut:** Supervision, are delivering the intervention, are delivering the intervention, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Manuel Fuentes:** Formal analysis, Supervision, designed the statistical analysis plan, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Elena Bordiu:** Supervision, helped in developing the protocol, were in charge of GDM screening, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Alejandra Durán:** Formal analysis, Investigation, Supervision, were in charge of GDM screening, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Miguel A. Herraiz:** Supervision, were in charge of obstetric follow-up, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Nuria Izquierdo:** Supervision, were in charge of obstetric follow-up, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **María J. Torrejón:** Supervision, helped in developing the protocol, were in charge of GDM screening, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Paz de Miguel:** Formal analysis, Investigation, Supervision, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Isabelle Runkle:** Formal analysis, Investigation, Supervision, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for

important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Miguel A. Rubio:** Supervision, helped in developing the protocol, All authors were involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content, material support and study supervision. All authors have seen and agreed with the content of the last version of the manuscript. **Alfonso L. Calle-Pascual:** Writing - original draft.

Declaration of competing interest

There are not competing interests declared.

The main investigator had the overall responsibility to ensure that the participants' anonymity is protected. The trial staff ensured that the participants' anonymity was maintained. The participants were identified only by a participant ID number on the electronic database. All data collected in the study were entered onto a dedicated password-protected electronic database using a secure computer and internet connection. All documents were stored securely and only accessible by trial staff and authorized personnel. We will not publish any data that could lead to the identification of any study participants. The study complied with the Data Protection Legislation which requires data to be anonymized as soon as it is mandatory to do so.

Acknowledgements

We wish to acknowledge our deep appreciation to the administrative personnel and nurses and dieticians from the Laboratory Department (Marisol Sanchez Orta, María Dolores Hermoso Martín, María Victoria Saez de Parayuelo, Luzdivina Fernandez Muñoz) and the Pregnancy and Diabetes Unit (María Luisa Maroto, Reyes Merino, and Georgina Cutillas Dominguez).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.metop.2020.100069>.

References

- [1] Ruiz-Gracia T, Duran A, Fuentes M, Rubio MA, Runkle I, Carrera EF, Torrejon MJ, Bordiu E, Valle LD, Garcia de la Torre N, Bedia AR, Montanez C, Familiar C, Calle-Pascual AL. Lifestyle patterns in early pregnancy linked to gestational diabetes mellitus diagnoses when using IADPSG criteria. The St Carlos gestational study. *Clin Nutr* 2016;35:699–705.
- [2] Assaf-Balut C, Garcia de la Torre N, Duran A, Fuentes M, Bordiu E, Del Valle L, Familiar C, Ortola A, Jimenez I, Herraiz MA, Izquierdo N, Perez N, Torrejon MJ, Ortega MI, Illana FJ, Runkle I, de Miguel MP, Montanez C, Barabash A, Cuesta M, Rubio MA, Calle-Pascual AL. A Mediterranean diet with additional extra virgin olive oil and pistachios reduces the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM): a randomized controlled trial: the St. Carlos GDM prevention study. *PLoS One* 2017;12:e0185873.
- [3] de la Torre NG, Assaf-Balut C, Jimenez Varas I, Del Valle L, Duran A, Fuentes M, Del Prado N, Bordiu E, Valerio JJ, Herraiz MA, Izquierdo N, Torrejon MJ, Cuadrado MA, de Miguel P, Familiar C, Runkle I, Barabash A, Rubio MA, Calle-Pascual AL. Effectiveness of following Mediterranean diet recommendations in the real world in the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM) and adverse maternal-foetal outcomes: a prospective, universal, interventional study with a single group. The st Carlos study. *Nutrients* 2019;11.
- [4] Assaf-Balut C, Garcia de la Torre N, Fuentes M, Duran A, Bordiu E, Del Valle L, Valerio J, Jimenez I, Herraiz MA, Izquierdo N, Torrejon MJ, de Miguel MP, Barabash A, Cuesta M, Rubio MA, Calle-Pascual AL. A high adherence to six food targets of the Mediterranean diet in the late first trimester is associated with a reduction in the risk of maternal-foetal outcomes: the st. Carlos gestational diabetes mellitus prevention study. *Nutrients* 2018;11.
- [5] Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdóttir E, Jonsdóttir T, Gudmundsdóttir T, Gylfason A, Saemundsdóttir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006;38:320–3.
- [6] Ding M, Chavarro J, Olsen S, Lin Y, Ley SH, Bao W, Rawal S, Grunnet LG, Thuesen ACB, Mills JL, Yeung E, Hinkle SN, Zhang W, Vaag A, Liu A, Hu FB, Zhang C. Genetic variants of gestational diabetes mellitus: a study of 112 SNPs among 8722 women in two independent populations. *Diabetologia* 2018;61:1758–68.
- [7] Wu L, Cui L, Tam WH, Ma RC, Wang CC. Genetic variants associated with gestational diabetes mellitus: a meta-analysis and subgroup analysis. *Sci Rep* 2016;6:30539.
- [8] Lin PC, Lin WT, Yeh YH, Wung SF. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) rs7903146 polymorphism as a risk factor for gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *PLoS One* 2016;11:e0153044.
- [9] Jin T. Current understanding on role of the Wnt signaling pathway effector TCF7L2 in glucose homeostasis. *Endocr Rev* 2016;37:254–77.
- [10] Fisher E, Boeing H, Fritsche A, Doering F, Joost HG, Schulze MB. Whole-grain consumption and transcription factor-7-like 2 (TCF7L2) rs7903146: gene-diet interaction in modulating type 2 diabetes risk. *Br J Nutr* 2009;101:478–81.
- [11] Hindy G, Sonestedt E, Ericson U, Jing XJ, Zhou Y, Hansson O, Renstrom E, Wirfalt E, Orho-Melander M. Role of TCF7L2 risk variant and dietary fibre intake on incident type 2 diabetes. *Diabetologia* 2012;55:2646–54.
- [12] Corella D, Carrasco P, Sorli JV, Estruch R, Rico-Sanz J, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, Covas MI, Coltell O, Aros F, Lapetra J, Serra-Majem L, Ruiz-Gutierrez V, Warnberg J, Fiol M, Pinto X, Ortega-Azorin C, Munoz MA, Martinez JA, Gomez-Gracia E, Gonzalez JL, Ros E, Ordovas JM. Mediterranean diet reduces the adverse effect of the TCF7L2-rs7903146 polymorphism on cardiovascular risk factors and stroke incidence: a randomized controlled trial in a high-cardiovascular-risk population. *Diabetes Care* 2013;36:3803–11.
- [13] Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928–9.
- [14] Dietrich S, Jacobs S, Zheng JS, Meidtnier K, Schwingshackl L, Schulze MB. Gene-lifestyle interaction on risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Obes Rev* 2019;20:1557–71.
- [15] Wang B, Xue X. Investigations of associations between seven gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus: evidence from a meta-analysis. *Gynecol Obstet Invest* 2020;1–8.
- [16] Huerta-Chagoya A, Vazquez-Cardenas P, Moreno-Macias H, Tapia-Maruri L, Rodriguez-Guillen R, Lopez-Vite E, Garcia-Escalante G, Escobedo-Aguirre F, Parra-Covarrubias A, Cordero-Brieno R, Manzo-Carrillo L, Zacarias-Castillo R, Vargas-Garcia C, Aguilar-Salinas C, Tusie-Luna T. Genetic determinants for gestational diabetes mellitus and related metabolic traits in Mexican women. *PLoS One* 2015;10:e0126408.
- [17] Franzago M, Fraticelli F, Nicolucci A, Celentano C, Liberati M, Stuppia L, Vitacolonna E. Molecular analysis of a genetic variants panel related to nutrients and metabolism: association with susceptibility to gestational diabetes and cardiometabolic risk in affected women. *J Diabetes Res* 2017;2017:4612623.
- [18] Fritsche L, Sarief M, Wagner R, Stefan N, Lehmann R, Haring HU, Grallert H, Fritsche A, Lechner A. Genetic variation in TCF7L2 rs7903146 and history of GDM negatively and independently impact on diabetes-associated metabolic traits. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;146:251–7.
- [19] Vcelak J, Vejrazkova D, Vankova M, Lukasova P, Bradnova O, Halkova T, Bestak J, Andelova K, Kvasnickova H, Hoskovicova P, Vondra K, Vrbikova J, Bendlova B. T2D risk haplotypes of the TCF7L2 gene in the Czech population sample: the association with free fatty acids composition. *Physiol Res* 2012;61:229–40.
- [20] Pagan A, Sabater-Molina M, Olza J, Prieto-Sanchez MT, Blanco-Carnero JE, Parrilla JJ, Gil A, Larque E. A gene variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;180:77–82.
- [21] Michalak-Wojnowska M, Gorczyca-Siadak D, Gorczyca T, Mosiewicz B, Kwasniewska A, Filip A, Mosiewicz J. Association between rs7901695 and rs7903146 polymorphisms of the TCF7L2 gene and gestational diabetes in the population of Southern Poland. *Ginek Pol* 2016;87:745–50.
- [22] Popova PV, Klyushina AA, Vasilyeva LB, Tkachuk AS, Bolotko YA, Gerasimov AS, Pustozero EA, Kravchuk EN, Predeus A, Kostareva AA, Grineva EN. Effect of gene-lifestyle interaction on gestational diabetes risk. *Oncotarget* 2017;8:112024–35.
- [23] de Melo SF, Frigeri HR, dos Santos-Weiss IC, Rea RR, de Souza EM, Alberton D, Gomes de Moraes Rego F, Picheth G. Polymorphisms in FTO and TCF7L2 genes of Euro-Brazilian women with gestational diabetes. *Clin Biochem* 2015;48:1064–7.
- [24] Reyes-Lopez R, Perez-Luque E, Malacara JM. Metabolic, hormonal characteristics and genetic variants of TCF7L2 associated with development of gestational diabetes mellitus in Mexican women. *Diabetes Metab Res Rev* 2014;30:701–6.
- [25] Klein K, Haslinger P, Bancher-Todesca D, Leipold H, Knofler M, Handisurya A, Kautzky-Willer A, Woda C. Transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:1783–6.
- [26] Grotenfelt NE, Wasenius NS, Rono K, Laivuori H, Stach-Lempinen B, Orho-Melander M, Schulz CA, Kautiainen H, Koivusalo SB, Eriksson JG. Interaction between rs10830963 polymorphism in MTNR1B and lifestyle intervention on occurrence of gestational diabetes. *Diabetologia* 2016;59:1655–8.
- [27] Li SX, Imamura F, Ye Z, Schulze MB, Zheng J, Ardanaz E, Arriola L, Boeing H, Dow C, Fagherazzi G, Franks PW, Agudo A, Grioni S, Kaaks R, Katzke VA,

- Key TJ, Khaw KT, Mancini FR, Navarro C, Nilsson PM, Onland-Moret NC, Overvad K, Palli D, Panico S, Quiros JR, Rolandsson O, Sacerdote C, Sanchez MJ, Slimani N, Sluijs I, Spijkerman AM, Tjønneland A, Tumino R, Sharp SJ, Riboli E, Langenberg C, Scott RA, Forouhi NG, Wareham NJ. Interaction between genes and macronutrient intake on the risk of developing type 2 diabetes: systematic review and findings from European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-InterAct. *Am J Clin Nutr* 2017;106:263–75.
- [28] Lopez-Ortiz MM, Garay-Sevilla ME, Tejero ME, Perez-Luque EL. Analysis of the interaction between transcription factor 7-like 2 genetic variants with nopal and wholegrain fibre intake: effects on anthropometric and metabolic characteristics in type 2 diabetes patients. *Br J Nutr* 2016;116:969–78.
- [29] InterAct C. Investigation of gene-diet interactions in the incretin system and risk of type 2 diabetes: the EPIC-InterAct study. *Diabetologia* 2016;59:2613–21.
- [30] Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D, Diabetes Prevention Program Research G. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006;355:241–50.
- [31] Faerch K, Pilgaard K, Knop FK, Hansen T, Pedersen O, Jorgensen T, Holst JJ. Incretin and pancreatic hormone secretion in Caucasian non-diabetic carriers of the TCF7L2 rs7903146 risk T allele. *Diabetes Obes Metabol* 2013;15:91–5.
- [32] Jurado-Ruiz E, Alvarez-Amor L, Varela LM, Berna G, Parra-Camacho MS, Oliveras-Lopez MJ, Martinez-Force E, Rojas A, Hmadcha A, Soria B, Martin F. Extra virgin olive oil diet intervention improves insulin resistance and islet performance in diet-induced diabetes in mice. *Sci Rep* 2019;9:11311.
- [33] Grau K, Cauchi S, Holst C, Astrup A, Martinez JA, Saris WH, Blaak EE, Oppert JM, Arner P, Rossner S, Macdonald IA, Klimcakova E, Langin D, Pedersen O, Froguel P, Sorensen TI. TCF7L2 rs7903146-macronutrient interaction in obese individuals' responses to a 10-wk randomized hypoenergetic diet. *Am J Clin Nutr* 2010;91:472–9.
- [34] Roswall N, Angquist L, Ahluwalia TS, Romaguera D, Larsen SC, Ostergaard JN, Halkjaer J, Vimalaswaran KS, Wareham NJ, Bendinelli B, Palli D, Boer JM, van der AD, Boeing H, Loos RJ, Sorensen TI, Tjønneland A. Association between Mediterranean and Nordic diet scores and changes in weight and waist circumference: influence of FTO and TCF7L2 loci. *Am J Clin Nutr* 2014;100:1188–97.
- [35] Sotos-Prieto M, Smith CE, Lai CQ, Tucker KL, Ordovas JM, Mattei J. Mediterranean diet adherence modulates anthropometric measures by TCF7L2 genotypes among Puerto Rican adults. *J Nutr* 2020;150:167–75.
- [36] Cauchi S, Choquet H, Gutierrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proenca C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sorensen TI, Charpentier G, Meyre D, Froguel P. Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. *Obesity* 2008;16:476–82.
- [37] Corella D, Coltell O, Sorli JV, Estruch R, Quiles L, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, Castaner O, Aros F, Ortega-Calvo M, Serra-Majem L, Gomez-Gracia E, Portoles O, Fiol M, Diez Espino J, Basora J, Fito M, Ros E, Ordovas JM. Polymorphism of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) interacts with obesity on type-2 diabetes in the PREDIMED study emphasizing the heterogeneity of genetic variants in type-2 diabetes risk prediction: time for obesity-specific genetic risk scores. *Nutrients* 2016;8.
- [38] Nasreddine L, Akika R, Mailhac A, Tamim H, Zgheib NK. The interaction between genetic polymorphisms in FTO and TCF7L2 genes and dietary intake with regard to body mass and composition: an exploratory study. *J Personalized Med* 2019;9.
- [39] Haupt A, Thamer C, Heni M, Ketterer C, Machann J, Schick F, Machicao F, Stefan N, Claussen CD, Haring HU, Fritsche A, Staiger H. Gene variants of TCF7L2 influence weight loss and body composition during lifestyle intervention in a population at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 2010;59:747–50.
- [40] Fisher E, Meidtnier K, Angquist L, Holst C, Hansen RD, Halkjaer J, Masala G, Ostergaard JN, Overvad K, Palli D, Vimalaswaran KS, Tjønneland A, van der AD, Wareham NJ, Sorensen T, Loos RJ, Boeing H. Influence of dietary protein intake and glycemic index on the association between TCF7L2 HapA and weight gain. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1468–76.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Sen Li,
Beijing University of Chinese Medicine,
China

REVIEWED BY

Lin Han,
The Affiliated Hospital of Qingdao
University, China
Lixin Guo,
Beijing Hospital, Peking University,
China

*CORRESPONDENCE

Alfonso L. Calle-Pascual
acallepascual@hotmail.com
Nuria García de la Torre
nuriatlobo@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Clinical Diabetes,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

RECEIVED 03 September 2022

ACCEPTED 20 September 2022

PUBLISHED 13 October 2022

CITATION

Ramos-Levi A, Barabash A, Valerio J,
García de la Torre N, Mendizabal L,
Zulueta M, de Miguel MP, Díaz A,
Duran A, Familiar C, Jimenez I,
del Valle L, Melero V, Moraga I,
Herraiz MA, Torrejon MJ, Arregi M,
Simón L, Rubio MA and Calle-
Pascual AL (2022) Genetic variants
for prediction of gestational diabetes
mellitus and modulation of
susceptibility by a nutritional
intervention based on a
Mediterranean diet.
Front. Endocrinol. 13:1036088.
doi: 10.3389/fendo.2022.1036088

Genetic variants for prediction of gestational diabetes mellitus and modulation of susceptibility by a nutritional intervention based on a Mediterranean diet

Ana Ramos-Levi^{1†}, Ana Barabash^{2,3,4†}, Johanna Valerio²,
Nuria García de la Torre^{2,4*}, Leire Mendizabal⁵,
Mirella Zulueta⁵, Maria Paz de Miguel^{2,3}, Angel Diaz^{2,3},
Alejandra Duran^{2,3}, Cristina Familiar², Inés Jimenez²,
Laura del Valle², Veronica Melero², Inmaculada Moraga²,
Miguel A. Herraiz⁶, María José Torrejon⁷, Maddi Arregi⁵,
Laureano Simón⁵, Miguel A. Rubio^{2,3}
and Alfonso L. Calle-Pascual^{2,3,4*}

¹Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ²Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, ³Facultad de Medicina, Medicina II Department, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain, ⁵Patia Europe, Clinical Laboratory, San Sebastián, Spain, ⁶Gynecology and Obstetrics Department, Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, ⁷Clinical Laboratory Department Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Hypothesis: Gestational diabetes mellitus (GDM) entails a complex underlying pathogenesis, with a specific genetic background and the effect of environmental factors. This study examines the link between a set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with diabetes and the development of GDM in pregnant women with different ethnicities, and evaluates its potential modulation with a clinical intervention based on a Mediterranean diet.

Methods: 2418 women from our hospital-based cohort of pregnant women screened for GDM from January 2015 to November 2017 (the San Carlos Cohort, randomized controlled trial for the prevention of GDM ISRCTN84389045 and real-world study ISRCTN13389832) were assessed for evaluation. Diagnosis of GDM was made according to the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) criteria. Genotyping was performed by IPLEX MassARRAY PCR using the Agena platform (Agena Bioscience, San Diego, CA). 110 SNPs were selected for analysis based on selected literature references. Statistical analyses regarding

patients' characteristics were performed in SPSS (Chicago, IL, USA) version 24.0. Genetic association tests were performed using PLINK v.1.9 and 2.0 software. Bioinformatics analysis, with mapping of SNPs was performed using STRING, version 11.5.

Results: Quality controls retrieved a total 98 SNPs and 1573 samples, 272 (17.3%) with GDM and 1301 (82.7%) without GDM. 1104 (70.2%) were Caucasian (CAU) and 469 (29.8%) Hispanic (HIS). 415 (26.4%) were from the control group (CG), 418 (26.6%) from the nutritional intervention group (IG) and 740 (47.0%) from the real-world group (RW). 40 SNPs (40.8%) presented some kind of significant association with GDM in at least one of the genetic tests considered. The nutritional intervention presented a significant association with GDM, regardless of the variant considered. In CAU, variants rs4402960, rs7651090, IGF2BP2; rs1387153, rs10830963, MTNR1B; rs17676067, GLP2R; rs1371614, DPYSL5; rs5215, KCNJ1; and rs2293941, PDX1 were significantly associated with an increased risk of GDM, whilst rs780094, GCKR; rs7607980, COBLL1; rs3746750, SLC17A9; rs6048205, FOXA2; rs7041847, rs7034200, rs10814916, GLIS3; rs3783347, WARS; and rs1805087, MTR, were significantly associated with a decreased risk of GDM. In HIS, variants significantly associated with increased risk of GDM were rs9368222, CDKAL1; rs2302593, GIPR; rs10885122, ADRA2A; rs1387153, MTNR1B; rs737288, BACE2; rs1371614, DPYSL5; and rs2293941, PDX1, whilst rs340874, PROX1; rs2943634, IRS1; rs7041847, GLIS3; rs780094, GCKR; rs563694, G6PC2; and rs11605924, CRY2 were significantly associated with decreased risk for GDM.

Conclusions: We identify a core set of SNPs in their association with diabetes and GDM in a large cohort of patients from two main ethnicities from a single center. Identification of these genetic variants, even in the setting of a nutritional intervention, deems useful to design preventive and therapeutic strategies.

KEYWORDS

genetic risk variants, genetic polymorphisms, gestational diabetes mellitus, single nucleotide polymorphisms, SNPs, Mediterranean diet, nutritional intervention

Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM), defined as diabetes newly diagnosed in the second or third trimester of pregnancy, and was not clearly overt diabetes prior to gestation (1), is a frequent gestational metabolic complication that has become a major public health issue. Its prevalence has significantly increased in parallel with increasing rates of obesity, older age at pregnancy, and the implementation of the International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups criteria (IADPSG criteria) (2). GDM is associated with adverse maternal and neonatal outcomes and an increased risk for the future development of type 2 diabetes both in the mother and the offspring (1, 2), so strategies for early detection and

prevention, and interventions to control maternal glucose levels have become a priority.

The complex underlying pathogenesis of GDM includes a specific genetic background and the effect of environmental factors. Although there is still much to be known regarding the underlying mechanisms responsible for the development of GDM, several modifiable and non-modifiable factors have been acknowledged; for instance, increased adiposity, lifestyle, ethnicity, increased maternal age, polycystic ovary syndrome or a family history for type 2 diabetes. Regarding the genetic background, several genetic polymorphisms have been identified as potentially associated with an increased risk of developing GDM, most of them overlapping with those associated with the risk of type 2 diabetes. However, there is still controversy on the

true impact of genetic polymorphisms on the risk of these metabolic alterations, and whether this increased risk could be modulated by clinical interventions such as diet. In previous studies (3, 4) we found that an early nutritional intervention with a supplemented Mediterranean diet (MedDiet) reduces the incidence of GDM and, consequently, our hospital recommended the adoption of this nutritional intervention to all pregnant women.

The objective of this study is to examine the link between a set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with diabetes and GDM, according to different bibliographical references, and the development of GDM in pregnant women of different ethnicities, in the setting of a clinical intervention based on the MedDiet.

Methods

Study population

The study population originates from our hospital-based cohort of pregnant women screened for GDM from January 2015 to November 2017 (the San Carlos Cohort, randomized controlled trial (RCT) for the prevention of GDM registered December 4, 2013 at ISRCTN84389045 (DOI 10.1186/ISRCTN84389045) and real-world study, registered October 11th, 2016 at ISRCTN13389832 (DOI 10.1186/ISRCTN13389832) (3, 4) with approval by the Clinical Trials Committee of the Hospital Clínico San Carlos (July 17, 2013, CI 13/296-E and October 1st, 2016, CI16/442-E, respectively), and compliance with the Declaration of Helsinki). The central location of our hospital and its relatively large reference healthcare population of around 445,000 implied that our study sample could adequately represent the population living in our country.

Figure 1 shows the CONSORT 2010 flowchart of our study population. From January 2015 to November 2017, a total of 2418 women who attended their first gestational visit (at 8 ± 2 gestational weeks (GW), in which the first ultrasound is performed and analytical screening for chromosomal alterations is carried out), with fasting plasma glucose (FPG) < 92 mg/dL, were assessed for the clinical trial. Inclusion criteria were ≥ 18 years old, singleton gestation, and willingness to participate in the study. Exclusion criteria comprised gestational age at entry > 14 weeks, pre-gestational diabetes, diseases affecting carbohydrate metabolism, intolerance to nuts or extra-virgin olive oil (EVOO), and medical conditions or pharmacological therapy that could compromise the effect of the intervention and/or the follow-up program. All patients included signed a written informed consent.

A sample of 1000 women was selected and randomly divided into two groups of the same size, control group (CG) and

intervention group (IG), according to two nutritional intervention models. The same basic MedDiet and daily exercise habits were recommended for both groups. Participants allocated to IG received lifestyle guidance from dietitians one week after inclusion in a unique 1-hour group session. The key IG recommendation was a daily consumption of at least 40 mL of EVOO and a handful (25–30g) of pistachios. To ensure the consumption of the minimum amount recommended, women were provided with 20 L of EVOO and 4 Kg of roasted pistachios. Women in the CG were advised by midwives to restrict consumption of dietary fat, including EVOO and nuts. These recommendations are provided in local antenatal clinics as part of the available guidelines in pregnancy standard care (5). The first woman was included on January 2nd, 2015 and the last one was included on December 27th, 2015. The follow up until delivery on July 2016. The study was completed by 874 women (440/434, CG/IG). This group is the initial sub-cohort of this paper.

The aforementioned RCT concluded that an early nutritional intervention with a supplemented MedDiet reduces the incidence of GDM (3). Based on these results, our hospital recommended the adoption of this nutritional intervention (i.e., MedDiet enriched with EVOO and nuts), without providing these specific products, to all pregnant women, from the beginning of gestation, in real word (4). Thus, from November 2016 onwards, every pregnant woman who attended the first gestational visit were invited to participate in our study based on the implementation of the RCT results in clinical practice. The last woman included on November 30, 2017 was follow up until delivery on July 2018. In accordance with the inclusion and exclusion criteria indicated above, a new sub-cohort (real-world group, RW) was defined, with 768 samples that are included in this study.

Ethnicity of participants includes mainly Caucasian and Hispanic, as well as some minority ethnicities (Chinese, African and others). Given the characteristics of this study, samples corresponding to these minority ethnic groups were excluded. Therefore, samples from 1586 pregnant women were available and were used for this study. The characteristics of patients included in the study are displayed in Table 1.

Patient data collection

Data regarding clinical, demographic and anthropometric characteristics was collected from medical records and follow-up visits. Specifically, we collected information on maternal age, ethnicity, gestational week at the time of the oral glucose tolerance test (OGTT), body mass index, family history of type 2 diabetes, past medical history of GDM, past obstetric history and parity, gestational weight gain, associated comorbidities, and the newborn's birthweight.

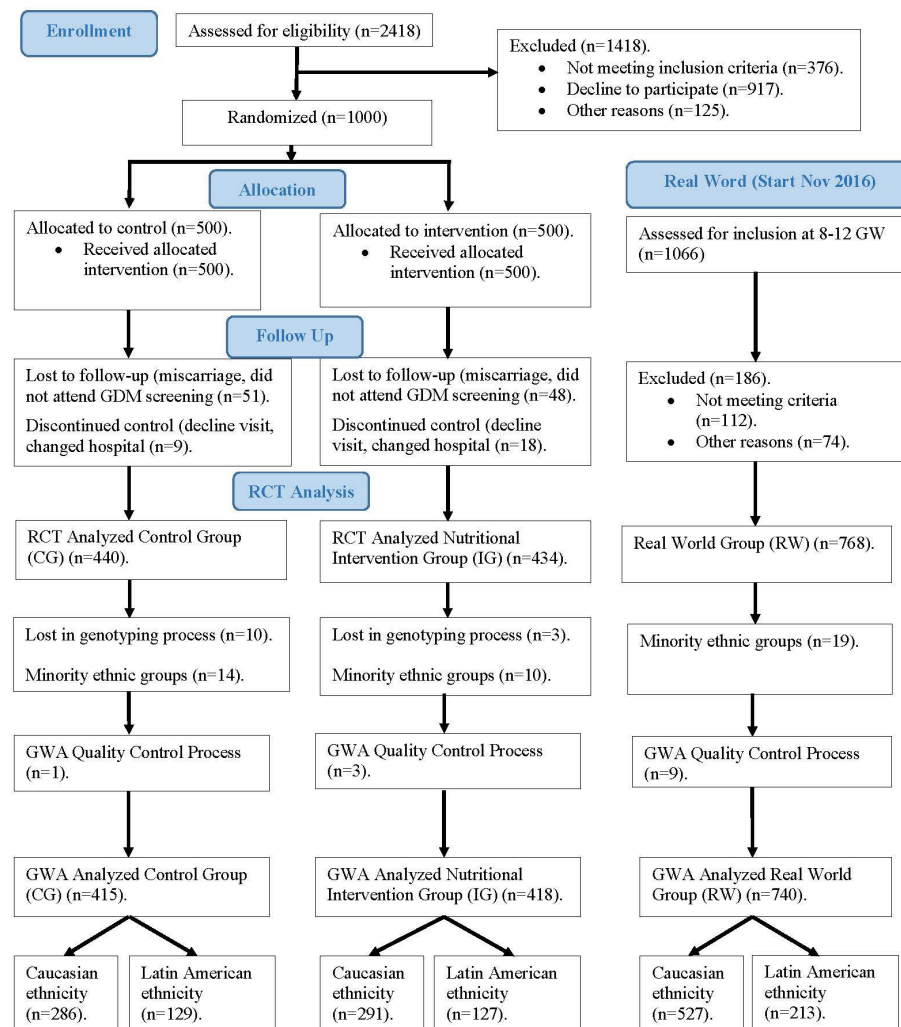


FIGURE 1
Flow diagram of women included in our study.

Diagnosis of gestational diabetes mellitus

A 2-hour OGTT with 75-g glucose was performed at 24–28 weeks of gestation. FPG levels were determined by the glucose oxidase method in fresh plasma samples. The International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) criteria were used for the diagnosis of GDM (2).

Genotype analysis

Genomic DNA was extracted from EDTA-stabilized blood samples taken during the OGTT using the Maxwell RSC instrument (Promega, Dubendorf, Switzerland).

Genotyping was performed by IPLEX MassARRAY PCR using the Agena platform (Agena Bioscience, San Diego, CA). IPLEX

MassARRAY PCR and extension primers were designed from sequences containing each target SNP and 150 upstream and downstream bases with AssayDesign Suite (<http://agenabio.com/assay-design-suite-20-software>) using the default settings. Single base extension reactions were performed on the PCR reactions with the iPLEX Gold Kit (AgenaBioscience) and 0.8 µl of the custom UEP pool. The kit contains mass modified terminator nucleotides that increase the mass difference between extended UEPs, allowing for greater accuracy in genotyping. The mass difference with unmodified terminator nucleotides ranges from 9 to 40 kDa, depending on the two nucleotides compared. With the mass-modified terminator nucleotides the mass difference increases to 16–80 kDa. The single base extension reactions were cycled with a nested PCR protocol that used five cycles of annealing and extension nested with a denaturation step in a cycle that was repeated 40 times for a total of 200 annealing and extension

TABLE 1 Main characteristics of patients included in the study.

		Gestational diabetes mellitus	
		NO N (%)	YES N (%)
Ethnicity	Caucasian	915 (70.3)	189 (69.5)
	Hispanic	386 (29.7)	83 (30.5)
	Total	1301 (100)	272 (100)
Intervention nutritional group	Control (CG)	319 (24.5)	96 (35.3)
	Intervention (IG)	349 (26.8)	69 (25.4)
	Real Word (RW)	633 (48.7)	107 (39.3)
	Total	1301 (100)	272 (100)
Age (years)		33 ± 5	34 ± 5
Prior body weight (kg)		59.4 ± 9.72	62.82 ± 10.99
Prior BMI		22.47 ± 3.43	23.99 ± 4.01
Parity	1	567 (43.6)	117 (43.0)
	2	394 (30.3)	86 (31.6)
	3	203 (15.6)	41 (15.1)
	≥ 4	129 (9.9)	28 (10.3)
	NA	8 (0.6)	0 (0)
	Total	1301 (100)	272 (100)
Obstetric history	None	804 (61.8)	162 (59.6)
	Abortion	422 (32.4)	85 (31.2)
	GDM	28 (2.2)	10 (3.7)
	HT	14 (1.1)	1 (0.4)
	Other	33 (2.5)	14 (5.1)
	Total	1301 (100)	272 (100)

Data are presented as number and percentage for categorical values and mean ± standard deviation for quantitative values

steps. The goal was to extend nearly all of the UEPs. Following single base extension, the reactions were diluted with 16 µl of water and deionized with 6 ng of resin. After deionizing for 20 min the reactions were dispensed onto SpectroChipArrays with a Nanodispenser (Agena Bioscience). The speed of dispensation was optimized to deliver an average of 20 nl of each reaction to a matrix pad on the SpectroChip. An Agena Bioscience Compact MassArray Spectrometer was used to perform MALDI-TOF mass spectrometry according to the iPLEX Gold Application Guide. The Typer 4 software package (Agena Bioscience) was used to analyze the resulting spectra and the composition of the target bases was determined from the mass of each extended oligo. These panels were designed in collaboration with PATIA and Genotyping was performed at the Agena platform located at the Epigenetics and Genotyping laboratory, Central Unit for Research in Medicine (UCIM), Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

Selection of SNPs

The 110 single-nucleotide polymorphisms were based on literature references (6–12). Specifically, SNPs were prioritized

according to the results of large meta-analysis of genome-wide association studies (GWAS) performed in European and other populations, and with the presumption that their effects can be extrapolated and generalized, and that large sample sizes allow solid estimations of the true size effect. Allele frequencies were considered to maximize the SNPs' predictive power (effect size x allele frequency). In addition, significant SNPs identified in smaller association studies were also included. As a result, the selected SNPs for analysis fulfilled the following criteria: odds ratio (OR) >1.2, Rare Allele Frequency (RAF) >0.20 and Association Statistical Significance of $p < 1 \times 10^{-5}$ (Supplementary Table 1).

GWA quality control

Quality control steps removed participants with a high missing genotype rate (MIND >5%, 13 samples), removed SNPs with a high missing genotype data (GENO > 5%, 1 variant), removed SNPs due to Hardy-Weinberg exact test (HWE, $p < 1 \times 10^{-6}$, 7 variants), and removed SNPs due to allele low frequency threshold (MAF < 5%, 4 variants). As a result, our data warehouse included 1573 women

and 98 SNPs, with a total genotyping rate of 0.996544 (Supplementary Table 1).

Statistical analysis

Statistical analyses regarding patients' characteristics were performed in SPSS (Chicago, IL, USA) version 24.0. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation or median and interquartile range according to the normality of their distribution. χ^2 test was used to compare qualitative characteristics and quantitative characteristics were assessed with Student's t-test. A two-sided p -value <0.05 was considered statistically significant.

The association between each SNP and GDM risk was evaluated by genetic binary logistic regression models. All genetic association tests were performed using PLINK v.1.9 and 2.0 software (13). Specifically, we used the following models and tests: ADDITIVE model – test ADD; DOMINANT model – test DOM; RECESSIVE model – test REC and HETHOM model -test HOM and HET.

In all the logistic regression models, a variable was added to represent the nutritional intervention group [GROUP]. We defined this variable with values 1, 2 and 3 corresponding respectively to the CG, IF and RW groups of Figure 1. The reference group for the logistic regression model was the CG group.

The analysis was carried out by stratifying the sample by ethnicity, according to the two categories present in the data: Caucasian (CAU) and Hispanic (HIS). The allele indicated in the previous literature was taken as the reference allele (REF). In the logistic regression models, the minor allele (A1) was always taken as the base category, meaning that it can be a risk allele when $OR > 1$ or a protective allele when $OR < 1$. For each test of a model, the corresponding p -value was obtained using the PLINK software. As false discovery rate control (FDR), we started with the set of p -values and then we calculated the q -values (i.e. minimum FDR incurred when calling a test significant) and lfd -values (*local false discovery rate*, i.e. the empirical Bayesian posterior probability that the null hypothesis is true, conditional on the observed p -value) using the $qvalue$ package (version 2.24.0) of R software (version 4.1.2) (14), with smoother method option and adjustment of lambda parameter in the interval 0.01-0.95 with increment of 0.01 (14). As association significance criteria we used the following thresholds: p -value ≤ 0.05 , q -value ≤ 0.05 , lfd -value ≤ 0.1 .

Bioinformatics analysis

We mapped each SNP to its nearest corresponding protein-coding gene and then we performed gene ontology (GO) enrichment analysis and protein–protein interaction (PPI) analysis for the set of SNPs that reached significance in any of

the criteria indicated above. The analysis was performed using STRING, version 11.5 (15).

Results

Patient data and SNP data

Quality controls retrieved a total 98 SNPs and 1573 samples, 272 (17.3%) with GDM and 1301 (82.7%) without GDM. 1104 (70.2%) were Caucasian (CAU) and 469 (29.8%) Hispanic (HIS). 415 (26.4%) were from the control group (CG), 418 (26.6%) from the nutritional intervention group (IG) and 740 (47.0%) from the real-world group (RW). Women's main demographic and anthropometric characteristics are represented in Table 1. Table 2a CAU and 2b HIS show the main characteristics of the variants for the Caucasian and Hispanic ethnicities, respectively.

Supplementary Tables 2 CAU-2HIS show, respectively, for each ethnicity, logistic regression analysis performed for the 98 SNPs and 1573 samples. Tables 3a CAU and 3b HIS extract, respectively, the main relevant findings for the two ethnic strata considered; specifically, these tables show the SNPs for which a discovery (p -value ≤ 0.05 , or q -value ≤ 0.05 , or lfd ≤ 0.1) was obtained in at least one of the SNP genetic tests performed.

General findings and effect of the nutritional intervention

Of a total of 110 variants included in the study, 98 (89.1%) passed the quality control. Of these, 40 (40.8%) presented some kind of significant association with GDM in at least one of the genetic tests considered, that is, the corresponding threshold was reached in some assessment criteria, with the following distribution by ethnicity: 13 (32.5%) only in the Caucasian ethnic stratum, 19 (47.5%) only in the Hispanic ethnic stratum and 8 (20.0%) in both ethnic strata (Table 3a CAU, 3b HISP). The nutritional intervention presented a significant association with GDM, regardless of the variant considered; we obtained an $OR < 1$ for GROUP variable in favor of MedDiet, with all the significance criteria satisfied in practically all the tests of each model (Supplementary Tables 1CAU and 1HIS).

Caucasian ethnicity findings

Table 3a CAU summarizes the most relevant findings for Caucasian pregnant women. The genetic variants significantly associated with increased risk of GDM were rs4402960, rs7651090, IGF2BP2; rs1387153, rs10830963, rs10830962, MTNR1B; rs17676067, GLP2R, rs1371614, DPYSL5; rs5215, KCNJ11; and rs2293941, PDX1. Variants significantly associated with decreased risk of GDM were rs780094, GCKR; rs7607980, COBLL1; rs3746750, SLC17A9; rs6048205, FOXA2; rs7041847, rs7034200, rs10814916, GLIS3; rs3783347, WARS; and rs1805087, MTR.

TABLE 2 CAU Characteristics of variants. CAUCASIAN.

CHROM	LOCUS	POS	ID	REF	ALT	A1	A1_CT	ALLELE_CT	A1_CASE_CT	A1_CTRL_CT	CASE_ALLELE_CT	CTRL_ALLELE_CT	CASE_NON_A1_CT	CASE_HET_A1_CT	CASE_HOM_A1_CT	CTRL_NON_A1_CT	CTRL_HET_A1_CT	CTRL_HOM_A1_CT	A1_FREQ	A1_CASE_FREQ	A1_CTRL_FREQ	OBS_CT
1	MTTHR	11794419	rs1801131	T	G	G	630	2172	103	527	374	1798	95	81	11	437	397	65	0.290	0.275	0.293	1086
1	MTTHR	11796321	rs1801133	G	A	A	847	2204	157	690	376	1828	63	93	32	339	460	115	0.384	0.418	0.377	1102
1	PROX1	213985913	rs40874	T	C	T	1065	2206	185	880	376	1830	51	89	48	236	478	201	0.483	0.492	0.481	1103
1	LYPLAL1	219527177	rs2785980	T	C	C	717	2202	77	107	376	1826	96	77	15	396	424	93	0.326	0.285	0.334	1101
1	MTR	236885200	rs1805087	A	G	G	397	2204	54	343	378	1826	137	50	2	600	283	30	0.180	0.143	0.188	1102
2	DPYSL5	26930006	rs1371614	C	T	T	572	2204	111	461	378	1826	87	93	9	521	323	69	0.260	0.294	0.252	1102
2	GCKR	27518370	rs780094	T	C	T	1043	2208	153	890	378	1830	69	87	33	251	438	226	0.472	0.405	0.486	1104
2	MAP3K19	134998059	rs1530559	A	G	A	765	2202	139	626	374	1828	73	89	25	391	420	103	0.347	0.372	0.342	1101
2	RBMS1	160460949	rs6742799	A	C	C	389	2200	62	327	374	1826	130	52	5	618	263	32	0.177	0.166	0.179	1100
2	FIGN	163641436	rs2119289	C	G	C	284	2204	44	240	378	1826	149	36	4	686	214	13	0.129	0.116	0.131	1102
2	COBLL1	164694691	rs7607980	T	C	C	318	2204	41	277	378	1826	151	35	3	655	239	19	0.144	0.108	0.152	1102
2	G6PC2	168906638	rs560887	T	C	T	581	2208	88	493	378	1830	114	62	13	491	355	69	0.263	0.233	0.269	1104
2	G6PC2	168917561	rs563694	C	A	C	679	2194	110	569	378	1816	94	80	15	419	409	80	0.309	0.291	0.313	1097
2	IRS1	226203364	rs2943634	A	C	A	673	2176	112	561	374	1802	88	86	13	424	393	84	0.309	0.299	0.311	1088
2	IRS1	226795828	rs1801278	C	T	T	188	2206	39	149	376	1830	151	35	2	770	141	4	0.085	0.104	0.081	1103
3	PPARG	12348985	rs17036328	T	C	C	205	2208	31	174	378	1830	161	25	3	752	152	11	0.093	0.082	0.095	1104
3	PPARG	12351626	rs1801282	C	G	G	194	2208	29	165	378	1830	163	23	3	759	147	9	0.088	0.077	0.090	1104
3	UBE2E2	23413299	rs1496653	A	G	G	394	2208	62	332	378	1830	135	46	8	611	276	28	0.178	0.164	0.181	1104
3	AMT	49417897	rs11715915	C	T	T	713	2188	128	585	376	1812	83	82	23	422	383	101	0.326	0.340	0.323	1094
3	ADCY5	123346931	rs11708067	A	G	G	359	2192	70	289	376	1816	124	58	6	636	255	17	0.164	0.186	0.159	1096
3	SLC2A2	170999732	rs11920090	T	A	A	352	2204	57	295	376	1828	136	47	5	644	245	25	0.160	0.152	0.161	1102
3	IGF2BP2	185793899	rs4402960	G	T	T	695	2208	148	547	378	1830	68	94	27	441	401	73	0.315	0.392	0.299	1104
3	IGF2BP2	185795604	rs7651090	A	G	G	696	2208	147	549	378	1830	67	97	25	436	409	70	0.315	0.389	0.300	1104
3	ADIPOQ	186853103	rs2241766	T	G	G	400	2206	70	330	378	1828	126	56	7	608	282	24	0.181	0.185	0.181	1103
4	WFS1	6288259	rs4458523	T	G	T	825	2194	140	685	372	1822	73	86	27	361	415	135	0.376	0.376	0.376	1097
4	FAM13A	88820118	rs3822072	G	A	A	1065	2196	189	876	374	1822	43	99	45	230	486	195	0.485	0.505	0.481	1098
4	TET2	105160479	rs9884482	T	C	C	870	2196	142	728	374	1822	75	82	30	319	456	136	0.396	0.380	0.400	1098
4	PDGFC	156798972	rs4691380	C	T	T	827	2204	145	682	376	1828	69	93	26	353	440	121	0.375	0.386	0.373	1102
5	IRX1	4355595	rs17272202	T	C	C	165	2208	27	138	378	1830	162	27	0	779	134	2	0.075	0.071	0.075	1104
5	ANKRD55	56510924	rs459193	A	G	A	663	2208	105	558	378	1830	100	73	16	451	370	94	0.300	0.278	0.305	1104
5	ZBED3	77130042	rs7708285	G	A	G	658	2208	128	530	378	1830	84	82	23	460	380	75	0.298	0.339	0.290	1104
5	PCSK1	96207022	rs13179048	C	A	A	623	2208	99	524	378	1830	102	75	12	454	398	63	0.282	0.262	0.286	1104
5	PCSK1	96295001	rs17085593	C	G	G	637	2204	103	534	376	1828	99	75	14	443	408	63	0.289	0.274	0.292	1102
5	PCSK1	96393194	rs6235	C	G	G	565	2200	88	477	374	1826	107	72	8	481	387	45	0.257	0.235	0.261	1100
6	RRB1	7212967	rs17762454	C	T	T	615	2188	95	520	372	1816	102	73	11	462	372	74	0.281	0.255	0.286	1094
6	RREB1	7231610	rs9379084	G	A	A	332	2208	66	266	378	1830	130	52	7	668	228	19	0.150	0.175	0.145	1104
6	CDKAL1	20679478	rs7756992	A	G	G	549	2192	86	463	374	1818	108	72	7	503	349	57	0.250	0.230	0.255	1096
6	CDKAL1	20686765	rs9368222	C	A	A	522	2206	80	442	378	1828	115	68	6	523	340	51	0.237	0.212	0.242	1103
6	RSP03	127131790	rs2743553	C	T	T	1075	2206	177	898	378	1828	52	97	40	240	450	224	0.487	0.468	0.491	1103
7	DGKB	15024684	rs2191349	G	T	G	987	2202	175	812	376	1826	56	89	43	286	442	185	0.448	0.465	0.445	1101
7	GCK	44189469	rs1799884	C	T	T	424	2208	77	347	378	1830	119	63	7	599	285	31	0.192	0.204	0.190	1104
7	GCK	44196069	rs4607517	G	A	A	409	2184	74	335	378	1806	120	64	5	597	277	29	0.187	0.196	0.185	1092
7	GRB10	50690548	rs933360	C	T	C	530	2196	91	439	374	1822	108	67	12	523	337	51	0.241	0.243	0.241	1098
7	GRB10	50723882	rs6943153	T	C	T	602	2184	102	500	372	1812	98	74	14	469	374	63	0.276	0.274	0.276	1092
7	HIP1	75546898	rs1167800	A	G	G	974	2208	156	818	378	1830	62	98	29	281	450	184	0.441	0.413	0.447	1104
8	PPP1R3B	9326086	rs4841132	A	G	A	135	2208	22	113	378	1830	167	22	0	809	99	7	0.061	0.058	0.062	1104
8	PPP1R3B	9330085	rs7004769	A	G	A	407	2204	63	344	378	1826	131	53	5	609	264	40	0.185	0.167	0.188	1102
8	ANK1	41651740	rs12549902	G	A	G	1025	2198	175	850	378	1820	54	95	40	238	494	178	0.466	0.463	0.467	1099
8	SLC0A8	117172544	rs13266634	C	T	T	581	2208	98	483	378	1830	104	72	13	485	377	53	0.263	0.259	0.264	1104
8	SLC0A8	117172786	rs3802177	G	A	A	567	2208	95	472	378	1830	106	71	12	490	378	47	0.257	0.251	0.258	1104
8	SLC0A8	117173494	rs11558471	A	G	G	601	2206	99	502	378	1828	103	73	13	466	394	54	0.272	0.262	0.275	1103
9	GLIS3	4287466	rs7041847	A	G	G	1034	2202	167	867	376	1826	63	83	42	245	469	199	0.470	0.444	0.475	1101

(Continued)

TABLE 2 Continued

CHROM	LOCUS	POS	ID	REF	ALT	A1	A1_CT	ALLELE_CT	A1_CASE_CT	A1_CTRL_CT	CASE_ALLELE_CT	CTRL_ALLELE_CT	CASE_NON_A1_CT	CASE_HET_A1_CT	CASE_HOM_A1_CT	CTRL_NON_A1_CT	CTRL_HET_A1_CT	CTRL_HOM_A1_CT	A1_FREQ	A1_CASE_FREQ	A1_CTRL_FREQ	OBS_CT
9	GLIS3	4289050	rs7034200	C	A	C	1092	2206	180	912	378	1828	60	78	51	225	466	223	0.495	0.476	0.499	1103
9	GLIS3	4293150	rs10814916	A	C	A	1043	2194	171	872	378	1816	63	81	45	234	476	198	0.475	0.452	0.480	1097
9	CDKN2B	22134095	rs10811661	T	C	C	423	2188	73	350	374	1814	122	57	8	592	280	35	0.193	0.195	0.193	1094
9	SARDH	133734024	rs573904	C	T	T	626	2206	120	506	378	1828	85	88	16	479	364	71	0.284	0.317	0.277	1103
10	CDC123	12265895	rs11257655	C	T	T	503	2208	93	410	378	1830	107	71	11	545	330	40	0.228	0.246	0.224	1104
10	CDC123	12286011	rs12779790	A	G	G	433	2208	78	355	378	1830	120	60	9	587	301	27	0.196	0.206	0.194	1104
10	CURN	17114152	rs1801222	A	G	A	607	2198	114	493	376	1822	90	82	16	488	353	70	0.276	0.303	0.271	1099
10	HKDC1	69223185	rs4746822	C	T	C	968	2204	161	807	378	1826	60	97	32	276	467	170	0.439	0.426	0.442	1102
10	HHEX	92722319	rs7923866	C	T	T	783	2206	132	651	378	1828	75	96	18	374	429	111	0.355	0.349	0.356	1103
10	ADRA2A	111282335	rs10885122	T	G	T	292	2206	48	244	376	1830	144	40	4	687	212	16	0.132	0.128	0.133	1103
10	TCF7L2	112994312	rs34872471	T	C	C	759	2208	140	619	378	1830	72	94	23	394	423	98	0.344	0.370	0.338	1104
10	TCF7L2	112996282	rs4506565	A	T	T	819	2204	147	672	378	1826	68	95	26	356	442	115	0.372	0.389	0.368	1102
10	TCF7L2	112998590	rs7903146	C	T	T	774	2206	144	630	378	1828	73	88	28	387	424	103	0.351	0.381	0.345	1103
11	DUSP8	1675619	rs2334499	C	T	T	967	2180	172	795	376	1804	50	104	34	279	451	172	0.444	0.457	0.441	1090
11	KCNJ11	17387083	rs5215	C	T	C	772	2200	146	626	376	1824	66	98	24	396	406	110	0.351	0.388	0.343	1100
11	CRY2	45851540	rs11605924	A	C	C	1096	2208	178	918	378	1830	52	96	41	238	436	241	0.496	0.471	0.502	1104
11	MALD	47314769	rs7944584	A	T	T	711	2204	110	601	378	1826	92	84	13	412	401	100	0.323	0.291	0.329	1102
11	OR4S1	48311808	rs11483121	G	A	A	340	2204	53	287	378	1826	139	47	3	640	259	14	0.154	0.140	0.157	1102
11	FADS1	61804006	rs174550	T	C	C	675	2196	118	557	378	1818	88	84	17	432	397	80	0.307	0.312	0.306	1098
11	ARA1	72721940	rs11603334	G	A	A	283	2208	43	240	378	1830	149	37	3	691	208	16	0.128	0.114	0.131	1104
11	MTNR1B	92940662	rs1387153	C	T	T	646	2206	136	510	378	1828	75	92	22	470	378	66	0.293	0.360	0.279	1103
11	MTNR1B	92965261	rs10830962	C	G	G	935	2196	180	755	374	1822	47	100	40	310	447	154	0.426	0.481	0.414	1098
11	MTNR1B	92975544	rs10830963	C	G	G	607	2204	132	475	378	1826	78	90	21	504	343	66	0.275	0.349	0.260	1102
12	GLS2	56471554	rs2657879	A	G	G	473	2206	83	390	378	1828	113	69	7	568	302	44	0.214	0.220	0.213	1103
12	IGF1	102481791	rs35767	A	G	A	346	2202	54	292	378	1824	139	46	4	650	232	30	0.157	0.143	0.160	1101
12	HNFI1A	121022883	rs7957197	T	A	A	464	2200	71	393	376	1824	125	55	8	560	311	41	0.211	0.189	0.215	1100
12	P2RX2	132465032	rs10747083	G	A	G	769	2206	130	639	378	1828	87	74	28	373	443	98	0.349	0.344	0.350	1103
13	PDX1	27917061	rs2293941	G	A	A	534	2204	103	431	378	1826	97	81	11	538	319	56	0.242	0.272	0.236	1102
13	KL	32980164	rs576674	G	A	G	504	2192	83	421	376	1816	112	69	7	524	347	37	0.230	0.221	0.232	1096
14	WARS	100372924	rs3783347	G	T	T	383	2208	53	330	378	1830	141	43	5	609	282	24	0.173	0.140	0.180	1104
15	C2CD4A	62090956	rs4502156	T	C	C	1011	2202	174	837	378	1824	57	90	42	264	459	189	0.459	0.460	0.459	1101
15	C2CD4B	62141763	rs11071657	A	G	G	875	2208	156	719	378	1830	61	100	28	328	455	132	0.396	0.413	0.393	1104
16	FTO	53767042	rs1421085	T	C	C	914	2204	149	765	376	1828	65	97	26	303	457	154	0.415	0.396	0.418	1102
16	FTO	53782363	rs8050136	C	A	A	896	2194	154	742	376	1818	66	90	32	317	442	150	0.408	0.410	0.408	1097
16	CTRB2	75211105	rs9921586	G	T	T	281	2208	47	234	378	1830	143	45	1	693	210	12	0.127	0.124	0.128	1104
17	GLP2R	9888058	rs17676067	T	C	C	598	2206	120	478	376	1830	90	76	22	498	356	61	0.271	0.319	0.261	1103
17	HNFI1B	37738049	rs4430796	A	G	A	1009	2206	169	840	378	1828	63	83	43	269	450	195	0.457	0.447	0.460	1103
19	CILP2	19547663	rs16996148	G	T	T	171	2208	26	145	378	1830	163	26	0	774	137	4	0.077	0.069	0.079	1104
19	PEPD	33408159	rs731839	G	A	G	762	2196	136	626	376	1820	75	90	23	383	428	99	0.347	0.362	0.344	1098
19	GIPR	45693376	rs2302593	C	G	G	1082	2198	188	894	378	1820	43	104	42	235	456	219	0.492	0.497	0.491	1099
20	FOXA2	22578963	rs6048205	A	G	G	110	2208	10	100	378	1830	179	10	0	819	92	4	0.050	0.026	0.055	1104
20	TOP1	41115265	rs6072275	G	A	A	336	2206	54	282	378	1828	138	48	3	654	238	22	0.152	0.143	0.154	1103
20	ZHX3	41203988	rs17265513	T	C	C	406	2204	68	338	378	1826	127	56	6	609	270	34	0.184	0.180	0.185	1102
20	SLC17A9	62967547	rs3746750	A	G	A	759	2200	111	648	376	1824	94	77	17	362	452	98	0.345	0.295	0.355	1100
21	BACE2	41209710	rs737288	G	T	T	773	2188	130	643	374	1814	74	96	17	373	425	109	0.353	0.348	0.354	1094
21	BACE2	41211811	rs6517656	G	A	A	458	2208	78	380	378	1830	118	64	7	573	304	38	0.207	0.206	0.208	1104

Main characteristics of the variants for the Caucasian (CAU) ethnicity.

CHROM, Chromosome code; LOCUS, Locus/Gen; POS, Base-pair coordinate [GRCh38]; ID, Variant ID; REF, Reference allele; ALT, Alternate allele; A1, Counted allele in logistic regression; A1_CT, Total A1 allele count; ALLELE_CT, Allele observation count; A1_CASE_CT, A1 count in cases; A1_CTRL_CT, A1 count in controls; CASE_ALLELE_CT, Case allele observation count; CTRL_ALLELE_CT, Control allele observation count; CASE_NON_A1_CT, Case genotypes with 0 copies of A1; CASE_HET_A1_CT, Case genotypes with 1 copy of A1; CASE_HOM_A1_CT, Case genotypes with 2 copies of A1; CTRL_NON_A1_CT, Control genotypes with 0 copies of A1; CTRL_HET_A1_CT, Control genotypes with 1 copy of A1; CTRL_HOM_A1_CT, Control genotypes with 2 copies of A1; A1_FREQ, A1 allele frequency; A1_CASE_FREQ, A1 allele frequency in cases; A1_CTRL_FREQ, A1 allele frequency in controls; OBS_CT, Number of samples in the regression.

TABLE 2 HIS Characteristics of variants. HISPANIC.

CHROM	LOCUS	POS	ID	REF	ALT	A1	A1_CT	ALLELE_CT	A1_CASE_CT	A1_CTRL_CT	CASE_ALLELE_CT	CTRL_ALLELE_CT	CASE_NON_A1_CT	CASE_HET_A1_CT	CASE_HOM_A1_CT	CTRL_NON_A1_CT	CTRL_HET_A1_CT	CTRL_HOM_A1_CT	A1_FREQ	A1_CASE_FREQ	A1_CTRL_FREQ	OBS_CT
1	MTTHR	11794419	rs1801131	T	G	G	137	930	25	112	166	764	59	23	1	279	94	9	0.147	0.151	0.147	465
1	MTTHR	11796321	rs1801133	G	A	A	373	936	65	308	166	770	30	41	12	139	184	62	0.399	0.392	0.400	468
1	PROX1	213985913	rs340874	T	C	C	330	936	50	280	166	770	44	28	11	155	180	50	0.353	0.301	0.364	468
1	LYPELAL1-AS1	219527177	rs2785980	T	C	T	406	936	78	295	166	770	29	30	24	145	152	88	0.434	0.470	0.426	468
1	MTR	236885200	rs1805087	A	G	G	195	938	33	162	166	772	54	25	4	240	130	16	0.208	0.199	0.210	469
2	DPYSL5	26930006	rs1371614	C	T	T	396	934	80	316	164	770	21	42	19	145	164	76	0.424	0.488	0.410	467
2	GCKR	27518370	rs780094	T	C	T	308	930	48	260	164	766	44	28	10	164	178	41	0.331	0.293	0.339	465
2	MAP3K19	134998059	rs1530559	A	G	A	308	934	49	259	164	770	41	33	8	174	163	48	0.330	0.299	0.336	467
2	RBMS1	160460949	rs6742799	A	C	C	130	928	22	108	166	762	62	20	1	279	96	6	0.140	0.133	0.142	464
2	FIGN	163641436	rs2119289	C	G	C	99	938	22	77	166	772	61	22	0	311	73	2	0.106	0.133	0.100	469
2	COBL1	164694691	rs7607980	T	C	C	65	938	12	53	166	772	71	12	0	335	49	2	0.069	0.072	0.069	469
2	G6PC2	168906638	rs560887	T	C	T	94	938	12	82	166	772	72	10	1	307	76	3	0.100	0.072	0.106	469
2	G6PC2	168917561	rs563694	C	A	C	119	938	15	104	166	772	70	11	2	286	96	4	0.127	0.090	0.135	469
2	IRS1	226203364	rs2943634	A	C	A	190	932	25	165	164	768	61	17	4	247	109	28	0.204	0.152	0.215	466
2	IRS1	226795828	rs1801278	C	T	T	60	938	8	52	166	772	75	8	0	338	44	4	0.064	0.048	0.067	469
3	PPARG	12348985	rs17036328	T	C	C	146	938	21	125	166	772	64	17	2	273	101	12	0.156	0.127	0.162	469
3	PPARG	12351626	rs1801282	C	G	G	123	938	17	106	166	772	67	15	1	291	84	11	0.131	0.102	0.137	469
3	UBE2E2	23413299	rs1496653	A	G	G	107	938	13	94	166	772	71	11	1	299	80	7	0.114	0.078	0.122	469
3	AMT	49417897	rs11715915	C	T	T	140	938	30	110	166	772	58	20	5	289	84	13	0.149	0.181	0.142	469
3	ADCY5	123346931	rs11708067	A	G	G	335	936	54	281	166	770	39	34	10	154	181	50	0.358	0.325	0.365	468
3	SLC2A2	170999732	rs11920090	T	A	A	129	938	19	110	166	772	64	19	0	288	86	12	0.138	0.114	0.142	469
3	IGFBP2	185793899	rs4402960	G	T	T	237	938	51	186	166	772	41	33	9	222	142	22	0.253	0.307	0.241	469
3	IGFBP2	185795604	rs7651090	A	G	G	232	934	50	182	166	768	41	34	8	221	144	19	0.248	0.301	0.237	467
3	ADIPOQ	186853103	rs2241766	T	G	G	168	938	32	166	166	772	54	26	3	259	118	9	0.179	0.193	0.176	469
4	WFS1	6288259	rs4458523	T	G	T	292	926	46	246	162	764	38	40	3	174	170	38	0.315	0.284	0.322	463
4	FAM13A	88820118	rs3822072	G	A	A	401	934	72	329	166	768	26	42	15	121	197	66	0.429	0.434	0.428	467
4	TET2	105160479	rs9884482	T	C	C	398	934	62	336	166	768	33	38	12	123	186	75	0.426	0.373	0.438	467
4	PDGFC	156798972	rs4691380	C	T	T	325	932	64	261	166	766	34	34	15	171	163	49	0.349	0.386	0.341	466
5	IRX1	4355595	rs17727202	T	C	C	40	938	5	35	166	772	78	5	0	351	35	0	0.043	0.030	0.045	469
5	ANKRD55	56510924	rs459193	A	G	A	219	934	47	172	166	768	46	27	10	235	126	23	0.234	0.283	0.224	467
5	ZBED3	77130042	rs7708285	G	A	G	338	938	62	276	166	772	30	44	9	164	168	54	0.360	0.373	0.358	469
5	PCSK1	96207022	rs13179048	C	A	A	173	936	25	148	166	770	59	23	1	253	116	16	0.185	0.151	0.192	468
5	PCSK1	96295001	rs17085593	C	G	G	182	938	27	155	166	772	57	25	1	248	121	17	0.194	0.163	0.201	469
5	PCSK1	96393194	rs6235	C	G	G	182	938	27	155	166	772	56	27	0	251	115	20	0.194	0.163	0.201	469
6	RRB1	7212967	rs17762454	C	T	T	360	936	70	290	166	770	29	38	16	148	184	53	0.385	0.422	0.377	468
6	RREB1	7231610	rs9379084	G	A	A	51	938	7	44	166	772	76	7	0	344	40	2	0.054	0.042	0.057	469
6	CDKAL1	20679478	rs7736992	A	G	G	288	934	57	231	166	768	36	37	10	190	157	37	0.308	0.343	0.301	467
6	CDKAL1	20686765	rs9368222	C	A	A	212	938	48	164	166	772	40	38	5	241	126	19	0.226	0.289	0.212	469
6	RSP03	127131790	rs2745353	C	T	C	376	938	60	316	166	772	35	36	12	125	206	55	0.401	0.361	0.409	469
7	DGKB	15024684	rs2191349	G	T	T	384	936	78	306	166	770	20	48	15	132	200	53	0.410	0.470	0.397	468
7	GCK	44189469	rs1799884	C	T	T	180	936	38	142	166	770	51	26	6	258	112	15	0.192	0.229	0.184	468
7	GCK	44196069	rs4607517	G	A	A	168	928	32	136	162	766	54	22	5	261	108	14	0.181	0.198	0.178	464
7	GRB10	50690548	rs933360	C	T	C	341	936	72	269	166	770	29	36	18	166	169	50	0.364	0.434	0.349	468
7	GRB10	50723882	rs6943153	T	C	C	460	932	76	384	166	766	24	42	17	94	194	95	0.494	0.458	0.501	466
7	HIP1	75546898	rs1167800	A	G	G	285	938	50	235	166	772	42	32	9	186	165	35	0.304	0.301	0.304	469
8	PPP1R3B	9326086	rs4841132	A	G	A	226	936	39	187	164	772	49	27	6	219	147	20	0.241	0.238	0.242	468
8	PPP1R3B	9330085	rs7004769	A	G	A	367	938	63	304	166	772	30	43	10	135	198	53	0.391	0.380	0.394	469
8	ANK1	41651740	rs12549902	G	A	G	387	932	72	315	164	768	27	38	17	124	205	55	0.415	0.439	0.410	466
8	SLC30A8	117172544	rs13266634	C	T	T	235	936	43	192	166	770	48	27	8	219	140	26	0.251	0.259	0.249	468
8	SLC30A8	117172786	rs3802177	G	A	A	232	938	41	191	166	772	49	27	7	222	137	27	0.247	0.247	0.247	469
8	SLC30A8	117173494	rs11558471	A	G	G	244	938	44	200	166	772	47	28	8	216	140	30	0.260	0.265	0.259	469
9	GLIS3	4287466	rs7041847	A	G	G	394	936	57	337	166	770	37	35	11	121	191	73	0.421	0.343	0.438	468

(Continued)

TABLE 2 Continued

CHROM	LOCUS	POS	ID	REF	ALT	A1	A1_CT	ALLELE_CT	A1_CASE_CT	A1_CTRL_CT	CASE_ALLELE_CT	CTRL_ALLELE_CT	CASE_NON_A1_CT	CASE_HET_A1_CT	CASE_HOM_A1_CT	CTRL_NON_A1_CT	CTRL_HET_A1_CT	CTRL_HOM_A1_CT	A1_FREQ	A1_CASE_FREQ	A1_CTRL_FREQ	OBS_CT
9	GLIS3	4289050	rs7034200	C	A	C	461	936	71	390	166	770	27	41	15	93	194	98	0.493	0.428	0.506	468
9	GLIS3	4293150	rs10814916	A	C	A	433	932	66	367	166	766	28	44	11	105	189	89	0.465	0.398	0.479	466
9	CDKN2B	22134095	rs10811661	T	C	C	119	934	24	95	166	768	60	22	1	295	83	6	0.127	0.145	0.124	467
9	SARDH	133734024	rs573904	C	T	T	201	934	36	165	166	768	51	28	4	234	135	15	0.215	0.217	0.215	467
10	CDC123	12265895	rs11257635	C	T	T	245	938	46	199	166	772	44	32	7	213	147	26	0.261	0.277	0.258	469
10	CDC123	12286011	rs12779790	A	G	G	135	936	23	112	166	770	61	21	1	282	94	9	0.144	0.139	0.145	468
10	CUBN	17114152	rs1801222	A	G	A	245	936	39	206	166	770	51	25	7	200	164	21	0.262	0.235	0.268	468
10	HKDC1	69223185	rs4746822	C	T	T	457	936	84	373	166	770	22	38	23	105	187	93	0.488	0.506	0.484	468
10	HHEX	92722319	rs7923866	C	T	C	466	936	90	376	166	770	17	42	24	104	186	95	0.498	0.542	0.488	468
10	ADRA2A	111282335	rs10885122	T	G	T	172	938	37	135	166	772	54	21	8	262	113	11	0.183	0.223	0.175	469
10	TCF7L2	112994312	rs34872471	T	C	C	192	938	29	163	166	772	58	21	4	240	129	17	0.205	0.175	0.211	469
10	TCF7L2	112996282	rs4506565	A	T	T	215	936	38	177	166	770	52	24	7	228	137	20	0.230	0.229	0.230	468
10	TCF7L2	112998590	rs7903146	C	T	T	190	936	30	160	166	770	57	22	4	240	130	15	0.203	0.181	0.208	468
11	DUSP8	1675619	rs2334499	C	T	T	425	934	85	340	166	768	23	35	25	123	182	79	0.455	0.512	0.443	467
11	KCNJ11	17387083	rs5215	C	T	C	294	932	55	239	166	766	36	39	55	185	157	41	0.315	0.331	0.312	466
11	CRY2	45851540	rs11605924	A	C	C	468	938	72	396	166	772	23	48	12	95	186	105	0.499	0.434	0.513	469
11	MADD	47314769	rs7944584	A	T	T	138	938	24	114	166	772	60	22	1	283	92	11	0.147	0.145	0.148	469
11	OR4S1	48311808	rs1483121	G	A	A	57	938	14	43	166	772	70	12	1	344	41	1	0.061	0.084	0.056	469
11	FAIS1	61804006	rs174550	T	C	T	359	928	62	297	164	764	37	28	17	160	147	75	0.387	0.378	0.389	464
11	ARAP1	72721940	rs11603334	G	A	A	71	936	8	63	166	770	76	6	1	326	55	4	0.076	0.048	0.082	468
11	MTNR1B	92940662	rs1387153	C	T	T	163	936	38	125	166	770	50	28	5	270	105	10	0.174	0.229	0.162	468
11	MTNR1B	92965261	rs10830962	C	G	G	309	938	62	247	166	772	34	36	13	182	161	43	0.329	0.373	0.320	469
11	MTNR1B	92975544	rs10830963	C	G	G	124	938	27	97	166	772	56	27	0	294	87	5	0.132	0.163	0.126	469
12	GLS2	56471554	rs2657879	A	G	G	234	938	34	200	166	772	53	26	4	212	148	26	0.249	0.205	0.259	469
12	IGF1	102481791	rs35767	A	G	A	239	936	50	189	166	770	39	38	6	219	143	23	0.255	0.301	0.245	468
12	HNFA1	121022883	rs7957197	T	A	A	106	938	18	88	166	772	66	16	1	310	64	12	0.113	0.108	0.114	469
12	P2RX2	132465032	rs10747083	G	A	G	243	938	37	206	166	772	52	25	6	201	164	21	0.259	0.223	0.267	469
13	PDX1	27917061	rs2293941	G	A	A	277	938	53	224	166	772	35	43	5	206	136	44	0.295	0.319	0.290	469
13	KL	32980164	rs576674	G	A	G	344	934	60	284	164	770	31	42	9	161	164	60	0.368	0.366	0.369	467
14	WARS	100372924	rs3783347	G	T	T	96	938	14	82	166	772	69	14	0	308	74	4	0.102	0.084	0.106	469
15	C2CD4A	62090956	rs4502156	T	C	T	289	936	50	239	166	770	43	30	10	184	163	38	0.309	0.301	0.310	468
15	C2CD4B	62141763	rs11071657	A	G	A	393	936	65	328	166	770	34	33	16	138	166	81	0.420	0.392	0.426	468
16	PTO	53767042	rs1421085	T	C	C	151	938	22	129	166	772	61	22	0	267	109	10	0.161	0.133	0.167	469
16	PTO	53782363	rs8050136	C	A	A	195	938	31	164	166	772	54	27	2	240	128	18	0.208	0.187	0.212	469
16	CTRB2	75211105	rs9921586	G	T	T	118	938	19	99	166	772	65	17	1	298	77	11	0.126	0.114	0.128	469
17	GLP2R	9888058	rs17676067	T	C	C	109	936	23	86	166	770	62	19	2	301	82	2	0.116	0.139	0.112	468
17	HNFB1B	37738049	rs4430796	A	G	G	322	938	66	256	166	772	32	36	15	181	154	51	0.343	0.398	0.332	469
19	CILP2	19547663	rs16996148	G	T	T	57	938	13	44	166	772	71	11	1	343	42	1	0.061	0.078	0.057	469
19	PEPD	33408159	rs731839	G	A	G	416	934	78	338	164	770	22	42	18	118	196	71	0.445	0.476	0.439	467
19	GIPR	45693376	rs2302593	C	G	C	387	934	83	304	166	768	21	41	21	146	172	66	0.414	0.500	0.396	467
20	FOXA2	22578963	rs6048205	A	G	G	50	938	12	38	166	772	72	10	1	352	30	4	0.053	0.072	0.049	469
20	TOP1	41115265	rs6072275	G	A	A	118	938	20	98	166	772	65	16	2	293	88	5	0.126	0.120	0.127	469
20	ZHX3	41203988	rs17265513	T	C	C	72	938	15	57	166	772	69	13	1	330	55	1	0.077	0.090	0.074	469
20	SLC17A9	62967547	rs3746750	A	G	A	314	934	63	251	164	770	30	41	11	167	185	33	0.336	0.384	0.326	467
21	BACE2	41209710	rs737288	G	T	T	194	934	39	155	164	770	52	21	9	246	123	16	0.208	0.238	0.201	467
21	BACE2	41211811	rs6517656	G	A	A	167	936	36	131	166	770	55	20	8	270	99	16	0.178	0.217	0.170	468

Main characteristics of the variants for the Hispanic (HIS) ethnicity.

CHROM, Chromosome code; LOCUS, Locus/Gene; POS, Base-pair coordinate [GRCh38]; ID, Variant ID; REF, Reference allele; ALT, Alternate allele; A1, Counted allele in logistic regression; A1_CT, Total A1 allele count; ALLELE_CT, Allele observation count; A1_CASE_CT, A1 count in cases; A1_CTRL_CT, A1 count in controls; CASE_ALLELE_CT, Case allele observation count; CTRL_ALLELE_CT, Control allele observation count; CASE_NON_A1_CT, Case genotypes with 0 copies of A1; CASE_HET_A1_CT, Case genotypes with 1 copy of A1; CASE_HOM_A1_CT, Case genotypes with 2 copies of A1; CTRL_NON_A1_CT, Control genotypes with 0 copies of A1; CTRL_HET_A1_CT, Control genotypes with 1 copy of A1; CTRL_HOM_A1_CT, Control genotypes with 2 copies of A1; A1_FREQ, A1 allele frequency; A1_CASE_FREQ, A1 allele frequency in cases; A1_CTRL_FREQ, A1 allele frequency in controls; OBS_CT, Number of samples in the regression.

TABLE 3 CAU (SNP + GROUP) MODELS. SIGNIFICANT SNPs. CAUCASIAN.

CHROM	LOCUS	POS	ID	REF	ALT	A1	A1_FREQ	OBS_CT	ADDITIVE				DOMINANT				RECESSIVE				HETHOM							
									ADD	pvalue	qvalue	lfr	DOM	pvalue	qvalue	lfr	REC	pvalue	qvalue	lfr	HOM	pvalue	qvalue	lfr	HET	pvalue	qvalue	lfr
1	LYPLAL1	219527177	rs2785980	T	C	C	0.326	1101	0.79 (0.62-1.01)	0.062	0.037	0.224	0.74 (0.54-1.02)	0.064	0.036	0.231	0.74 (0.42-1.31)	0.308	0.219	0.997	0.65 (0.36-1.18)	0.161	0.196	0.865	0.76 (0.55-1.06)	0.110	0.141	0.714
1	MTR	236885200	rs1805087	A	G	G	0.180	1102	0.73 (0.53-1.00)	0.050	0.030	0.169	0.75 (0.53-1.06)	0.098	0.054	0.383	0.31 (0.08-1.22)	0.095	0.081	0.512	0.29 (0.07-1.24)	0.096	0.125	0.645	0.79 (0.56-1.13)	0.205	0.235	0.926
2	DPYSL5	26930006	rs1371614	C	T	T	0.260	1102	1.21 (0.95-1.54)	0.132	0.076	0.488	1.33 (1.12-2.10)	0.008	0.006	0.020	0.59 (0.29-1.20)	0.145	0.118	0.744	0.75 (0.36-1.57)	0.448	0.385	0.981	1.70 (1.23-2.35)	0.001	0.015	0.014
2	GCKR	27518370	rs780094	T	C	T	0.472	1104	0.74 (0.59-0.92)	0.007	0.006	0.019	0.67 (0.48-0.93)	0.016	0.010	0.042	0.66 (0.44-0.99)	0.042	0.037	0.196	0.54 (0.35-0.86)	0.009	0.015	0.051	0.73 (0.51-1.04)	0.080	0.107	0.549
2	COBLL1	164694691	rs7607980	T	C	C	0.144	1102	0.67 (0.47-0.95)	0.023	0.014	0.066	0.63 (0.43-0.92)	0.016	0.010	0.041	0.73 (0.24-2.28)	0.594	0.344	1.000	0.66 (0.20-2.15)	0.489	0.406	0.981	0.62 (0.42-0.93)	0.020	0.029	0.117
3	IGFBP2	185793899	rs4402960	G	T	T	0.315	1104	1.54 (1.21-1.95)	0.000	0.006	0.004	1.66 (1.20-2.30)	0.002	0.006	0.008	1.89 (1.18-3.04)	0.008	0.008	0.033	2.37 (1.42-3.95)	0.001	0.015	0.012	1.53 (1.09-2.15)	0.015	0.022	0.085
3	IGFBP2	185795604	rs7651090	A	G	G	0.315	1104	1.52 (1.20-1.94)	0.001	0.006	0.004	1.67 (1.20-2.31)	0.002	0.006	0.008	1.79 (1.10-2.92)	0.020	0.018	0.078	2.27 (1.34-3.85)	0.002	0.015	0.019	1.56 (1.11-2.19)	0.011	0.016	0.062
5	ZBED3	77130042	rs7708285	G	A	G	0.298	1104	1.24 (0.98-1.57)	0.078	0.046	0.292	1.24 (0.90-1.70)	0.180	0.097	0.623	1.52 (0.92-2.50)	0.099	0.084	0.536	1.63 (0.97-2.76)	0.066	0.090	0.460	1.16 (0.83-1.62)	0.376	0.361	0.976
9	GLIS3	4287466	rs7041847	A	G	G	0.470	1101	0.87 (0.69-1.09)	0.228	0.119	0.663	0.71 (0.51-1.00)	0.048	0.028	0.156	1.02 (0.70-1.49)	0.924	0.444	1.000	0.80 (0.52-1.23)	0.311	0.316	0.973	0.67 (0.47-0.97)	0.033	0.047	0.210
9	GLIS3	4289050	rs7034200	C	A	C	0.495	1103	0.90 (0.72-1.13)	0.363	0.169	0.769	0.68 (0.49-0.96)	0.030	0.018	0.086	1.14 (0.80-1.62)	0.485	0.300	1.000	0.84 (0.55-1.27)	0.401	0.368	0.980	0.61 (0.42-0.89)	0.010	0.016	0.059
9	GLIS3	4293150	rs10814916	A	C	A	0.475	1097	0.87 (0.70-1.10)	0.244	0.126	0.681	0.67 (0.48-0.94)	0.021	0.013	0.055	1.10 (0.76-1.59)	0.621	0.346	1.000	0.81 (0.53-1.24)	0.335	0.331	0.976	0.61 (0.43-0.89)	0.009	0.015	0.053
9	SARDH	133734024	rs573904	C	T	T	0.284	1103	1.20 (0.94-1.53)	0.140	0.081	0.512	1.32 (0.96-1.81)	0.083	0.047	0.318	1.08 (0.62-1.90)	0.786	0.392	1.000	1.24 (0.69-2.24)	0.475	0.400	0.981	1.34 (0.96-1.86)	0.084	0.111	0.574
11	KCNJ11	17387083	rs5215	C	T	C	0.351	1100	1.24 (0.98-1.56)	0.071	0.042	0.262	1.45 (1.04-2.01)	0.027	0.016	0.073	1.09 (0.68-1.75)	0.722	0.372	1.000	1.35 (0.81-2.26)	0.251	0.282	0.956	1.48 (1.05-2.08)	0.026	0.038	0.158
11	MTNR1B	92940662	rs1387153	C	T	T	0.293	1103	1.49 (1.17-1.89)	0.001	0.006	0.006	1.63 (1.18-2.24)	0.003	0.006	0.009	1.71 (1.02-2.85)	0.040	0.036	0.185	2.12 (1.23-3.65)	0.007	0.015	0.041	1.54 (1.10-2.16)	0.011	0.017	0.065
11	MTNR1B	92965261	rs10830962	C	G	G	0.426	1098	1.31 (1.05-1.64)	0.019	0.012	0.053	1.55 (1.08-2.21)	0.017	0.010	0.042	1.31 (0.88-1.93)	0.182	0.144	0.854	1.69 (1.06-2.69)	0.028	0.040	0.172	1.50 (1.03-2.18)	0.036	0.050	0.232
11	MTNR1B	92975544	rs10830963	C	G	G	0.275	1102	1.51 (1.19-1.91)	0.001	0.006	0.005	1.73 (1.26-2.37)	0.001	0.006	0.004	1.60 (0.96-2.67)	0.072	0.063	0.378	2.04 (1.18-3.51)	0.010	0.016	0.060	1.67 (1.20-2.33)	0.003	0.015	0.022
13	PDX1	27917061	rs2293941	G	A	A	0.242	1102	1.20 (0.93-1.54)	0.154	0.086	0.545	1.36 (0.99-1.87)	0.055	0.031	0.187	0.90 (0.46-1.75)	0.750	0.382	1.000	1.04 (0.52-2.05)	0.920	0.542	0.982	1.42 (1.03-1.97)	0.035	0.049	0.222
14	WARS	100372924	rs3783347	G	T	T	0.173	1104	0.73 (0.53-1.01)	0.057	0.034	0.200	0.68 (0.47-0.97)	0.032	0.018	0.091	0.99 (0.37-2.63)	0.981	0.455	1.000	0.88 (0.33-2.36)	0.802	0.507	0.982	0.66 (0.45-0.95)	0.027	0.040	0.168
17	GLP2R	9888058	rs17676067	T	C	C	0.271	1103	1.30 (1.02-1.65)	0.035	0.022	0.110	1.27 (0.92-1.74)	0.140	0.077	0.533	1.80 (1.07-3.01)	0.027	0.024	0.111	1.92 (1.12-3.29)	0.018	0.027	0.107	1.16 (0.83-1.62)	0.396	0.368	0.980
20	FOXA2	22578963	rs6048205	A	G	G	0.050	1104	0.47 (0.24-0.90)	0.023	0.014	0.065	0.47 (0.24-0.91)	0.026	0.016	0.072	0.50 (0.02-13.38)	0.682	0.362	1.000	0.48 (0.02-12.67)	0.658	0.456	0.982	0.51 (0.26-0.99)	0.045	0.063	0.301
20	SLC17A9	62967547	rs3746750	A	G	A	0.345	1100	0.73 (0.57-0.94)	0.015	0.009	0.039	0.65 (0.47-0.89)	0.008	0.006	0.019	0.78 (0.45-1.34)	0.369	0.255	1.000	0.63 (0.36-1.11)	0.109	0.140	0.706	0.65 (0.47-0.91)	0.012	0.019	0.071

Table that summarizes the most relevant results of the analysis of SNPs + Group models in Caucasian (CAU) ethnicity. ADD, Additive model; DOM, dominant model; REC, recessive model; HETHOM, heterozygous-homozygous model; CHROM, Chromosome code; LOCUS, Locus/Gene; POS, Base-pair coordinate [GRCh38]; ID, Variant ID; REF, Reference allele; ALT, Alternate allele; A1, Counted allele in logistic regression; A1_FREQ, minor allele frequency; OBS_CT, Number of samples in the regression; OR_CI95, odds ratio with 95% confidence interval.

TABLE 3 HIS (SNP + GROUP) MODELS. SIGNIFICANT SNPs. HISPANIC.

CHROM	LOCUS	POS	ID	REF	ALT	A1	A1_FREQ	OBS_CT	ADDITIVE				DOMINANT				RECESSIVE				HETHOM				HET			
									ADD				DOM				REC				HOM				HET			
									OR_CI95	pvalue	qvalue	lidr	OR_CI95	pvalue	qvalue	lidr	OR_CI95	pvalue	qvalue	lidr	OR_CI95	pvalue	qvalue	lidr	OR_CI95	pvalue	qvalue	lidr
1	PROX1	213985913	rs340874	T	C	C	0.353	468	0.78 (0.54-1.12)	0.177	0.139	0.594	0.62 (0.38-1.00)	0.049	0.023	0.079	1.06 (0.52-2.15)	0.869	0.219	0.643	0.81 (0.39-1.70)	0.585	0.371	0.858	0.56 (0.33-0.95)	0.032	0.044	0.120
2	DPYSL5	26930006	rs1371614	C	T	T	0.424	467	1.36 (0.98-1.88)	0.069	0.064	0.229	1.77 (1.03-3.03)	0.039	0.019	0.060	1.28 (0.72-2.27)	0.407	0.129	0.521	1.79 (0.90-3.55)	0.096	0.108	0.368	1.76 (0.99-3.12)	0.054	0.069	0.202
2	GCKR	27518370	rs780094	T	C	T	0.331	465	0.80 (0.55-1.16)	0.241	0.172	0.745	0.63 (0.39-1.02)	0.063	0.029	0.107	1.20 (0.57-2.53)	0.627	0.175	0.605	0.93 (0.43-2.01)	0.852	0.443	0.858	0.57 (0.34-0.96)	0.033	0.045	0.125
2	G6PC2	168917561	rs563694	C	A	C	0.127	469	0.64 (0.36-1.14)	0.132	0.111	0.460	0.54 (0.29-1.00)	0.051	0.024	0.083	2.25 (0.55-9.11)	0.258	0.093	0.417	1.96 (0.35-11.06)	0.447	0.325	0.849	0.48 (0.24-0.95)	0.034	0.046	0.126
2	IRS1	226203364	rs2943634	A	C	A	0.204	466	0.65 (0.42-1.01)	0.053	0.051	0.168	0.57 (0.33-0.98)	0.041	0.020	0.064	0.61 (0.21-1.80)	0.371	0.119	0.501	0.52 (0.18-1.56)	0.247	0.223	0.730	0.58 (0.32-1.04)	0.069	0.082	0.260
3	UBE2E2	23413299	rs1496653	A	G	G	0.114	469	0.60 (0.33-1.09)	0.095	0.084	0.330	0.56 (0.29-1.05)	0.073	0.033	0.130	0.60 (0.12-2.92)	0.526	0.158	0.573	0.54 (0.07-4.50)	0.569	0.371	0.858	0.56 (0.28-1.11)	0.097	0.108	0.371
3	IGFBP2	185793899	rs4402960	G	T	T	0.253	469	1.39 (0.96-2.01)	0.085	0.077	0.291	1.36 (0.85-2.18)	0.197	0.076	0.379	2.07 (0.95-4.51)	0.067	0.030	0.114	2.26 (0.96-5.29)	0.061	0.076	0.230	1.23 (0.74-2.04)	0.428	0.314	0.845
3	IGFBP2	185795604	rs7651090	A	G	G	0.248	467	1.38 (0.94-2.02)	0.096	0.084	0.333	1.35 (0.84-2.18)	0.215	0.081	0.403	2.08 (0.87-4.97)	0.099	0.043	0.180	2.28 (0.93-5.58)	0.073	0.086	0.277	1.23 (0.75-2.04)	0.412	0.311	0.841
4	WFS1	6288259	rs4458523	T	G	T	0.315	463	0.80 (0.54-1.17)	0.250	0.176	0.764	0.92 (0.57-1.49)	0.730	0.198	0.632	0.31 (0.09-1.05)	0.060	0.027	0.101	0.32 (0.09-1.11)	0.073	0.086	0.278	1.06 (0.65-1.74)	0.820	0.438	0.858
5	ANKRD55	56510924	rs459193	A	G	A	0.234	467	1.35 (0.94-1.94)	0.108	0.094	0.378	1.29 (0.80-2.09)	0.304	0.108	0.485	2.18 (0.99-4.80)	0.054	0.025	0.089	2.26 (1.00-5.11)	0.050	0.064	0.185	1.11 (0.66-1.88)	0.695	0.405	0.858
5	PCSK1	96393194	rs6235	C	G	G	0.194	469	0.74 (0.48-1.16)	0.196	0.149	0.641	0.85 (0.51-1.42)	0.539	0.162	0.595	0.10 (0.01-1.79)	0.118	0.049	0.218	0.10 (0.01-1.80)	0.118	0.125	0.447	1.01 (0.61-1.69)	0.965	0.468	0.858
6	CDKAL1	20866765	rs9368222	C	A	A	0.226	469	1.50 (1.03-2.20)	0.036	0.035	0.107	1.81 (1.13-2.90)	0.014	0.011	0.022	1.17 (0.46-2.99)	0.746	0.199	0.627	1.50 (0.55-4.15)	0.430	0.314	0.846	1.86 (1.13-3.05)	0.015	0.032	0.063
6	RSPO3	127131790	rs2745353	C	T	C	0.401	469	0.80 (0.55-1.15)	0.223	0.164	0.705	0.65 (0.40-1.05)	0.081	0.036	0.149	1.00 (0.52-1.92)	0.996	0.245	0.666	0.76 (0.37-1.57)	0.465	0.331	0.852	0.62 (0.37-1.05)	0.073	0.086	0.279
7	DGKB	15024684	rs2191349	G	T	T	0.410	468	1.42 (0.99-2.03)	0.058	0.054	0.184	1.71 (0.99-2.96)	0.056	0.026	0.092	1.39 (0.74-2.62)	0.308	0.106	0.459	1.93 (0.91-4.07)	0.085	0.097	0.324	1.65 (0.93-2.92)	0.085	0.097	0.324
7	GRB10	50690548	rs933360	C	T	C	0.364	468	1.38 (0.99-1.93)	0.061	0.056	0.197	1.38 (0.84-2.27)	0.201	0.077	0.386	1.81 (0.99-3.31)	0.056	0.026	0.092	1.99 (1.02-3.90)	0.045	0.059	0.167	1.20 (0.70-2.05)	0.504	0.349	0.857
9	GLIS3	4287466	rs7041847	A	G	G	0.421	468	0.70 (0.49-1.00)	0.051	0.049	0.159	0.59 (0.36-0.96)	0.034	0.017	0.052	0.72 (0.36-1.44)	0.356	0.117	0.491	0.55 (0.26-1.15)	0.112	0.121	0.425	0.61 (0.36-1.02)	0.058	0.074	0.220
9	GLIS3	4293150	rs10814916	A	C	A	0.465	466	0.74 (0.52-1.04)	0.085	0.077	0.290	0.76 (0.46-1.26)	0.291	0.105	0.476	0.54 (0.27-1.05)	0.707	0.031	0.121	0.50 (0.24-1.04)	0.064	0.078	0.244	0.88 (0.52-1.50)	0.633	0.387	0.858
10	CUBN	17114152	rs1801222	A	G	A	0.262	468	0.83 (0.55-1.24)	0.366	0.233	1.000	0.68 (0.41-1.10)	0.116	0.050	0.231	1.57 (0.64-3.84)	0.326	0.112	0.472	1.28 (0.51-3.21)	0.594	0.374	0.858	0.60 (0.35-1.01)	0.054	0.069	0.201
10	ADRA2A	111282335	rs10885122	T	G	T	0.183	469	1.31 (0.87-1.96)	0.195	0.149	0.639	1.09 (0.67-1.79)	0.718	0.197	0.631	3.69 (1.52-8.95)	0.004	0.010	0.011	3.54 (1.38-9.07)	0.009	0.032	0.045	0.86 (0.50-1.50)	0.605	0.375	0.858
11	DUSP8	1675619	rs2334499	C	T	T	0.455	467	1.33 (0.96-1.85)	0.090	0.080	0.309	1.28 (0.75-2.17)	0.370	0.124	0.526	1.71 (1.00-2.91)	0.050	0.024	0.082	1.77 (0.93-3.36)	0.080	0.093	0.305	1.06 (0.60-1.90)	0.836	0.443	0.858
11	CRY2	45851540	rs11605924	A	C	C	0.499	469	0.72 (0.51-1.01)	0.057	0.054	0.182	0.84 (0.50-1.41)	0.505	0.158	0.584	0.45 (0.24-0.84)	0.012	0.010	0.022	0.46 (0.22-0.98)	0.044	0.059	0.164	1.05 (0.60-1.84)	0.863	0.443	0.858
11	MTNR1B	92940662	rs1387153	C	T	T	0.174	468	1.61 (1.06-2.43)	0.025	0.025	0.074	1.65 (1.00-2.71)	0.049	0.023	0.078	2.53 (0.84-7.68)	0.101	0.043	0.183	2.91 (0.94-8.97)	0.063	0.078	0.238	1.53 (0.91-2.58)	0.109	0.120	0.415
12	P2RX2	132465032	rs10747083	G	A	G	0.259	469	0.80 (0.53-1.21)	0.298	0.198	0.868	0.67 (0.41-1.10)	0.113	0.049	0.226	1.40 (0.54-3.62)	0.482	0.147	0.556	1.16 (0.44-3.04)	0.762	0.423	0.858	0.61 (0.36-1.03)	0.065	0.078	0.245
13	PDX1	27917061	rs2293941	G	A	A	0.295	469	1.09 (0.76-1.54)	0.647	0.364	1.000	1.50 (0.92-2.43)	0.103	0.045	0.201	0.46 (0.17-1.20)	0.110	0.047	0.203	0.61 (0.22-1.65)	0.325	0.264	0.802	1.79 (1.09-2.96)	0.022	0.033	0.086
19	GIPR	45693376	rs2302593	C	G	C	0.414	467	1.48 (1.06-2.07)	0.020	0.021	0.061	1.79 (1.04-3.07)	0.034	0.017	0.051	1.62 (0.92-2.85)	0.096	0.042	0.173	2.18 (1.11-4.28)	0.024	0.035	0.091	1.64 (0.92-2.91)	0.091	0.102	0.346
21	BACE2	41209710	rs737288	G	T	T	0.208	467	1.21 (0.82-1.79)	0.329	0.212	0.934	1.04 (0.63-1.72)	0.869	0.227	0.634	2.56 (1.07-6.08)	0.034	0.016	0.054	2.43 (1.01-5.86)	0.049	0.064	0.181	0.84 (0.48-1.46)	0.540	0.361	0.858
21	BACE2	41211811	rs6517656	G	A	A	0.178	468	1.24 (0.84-1.84)	0.277	0.190	0.824	1.15 (0.69-1.92)	0.584	0.171	0.608	2.13 (0.87-5.23)	0.100	0.043	0.182	2.12 (0.85-5.27)	0.107	0.118	0.408	0.98 (0.56-1.73)	0.951	0.466	0.858

Table that summarizes the most relevant results of the analysis of SNPs + Group models in Hispanic (HIS) ethnicity. ADD, Additive model; DOM, dominant model; REC, recessive model; HETHOM, heterozygous-homozygous model; CHROM, Chromosome code; LOCUS, Locus/Gene; POS, Base-pair coordinate [GRCh38]; ID, Variant ID; REF, Reference allele; ALT, Alternate allele; A1, Counted allele in logistic regression; A1_FREQ, minor allele frequency; OBS_CT, Number of samples in the regression; OR_CI95, odds ratio with 95% confidence interval.

Hispanic ethnicity findings

Table 3b HIS summarizes the most relevant findings for Hispanic pregnant women. The genetic variants significantly associated with increased risk of GDM were rs9368222, CDKAL1; rs2302593, GIPR; rs10885122, ADRA2A; rs1387153, MTNR1B; rs737288, BACE2; rs1371614, DPYSL5; and rs2293941, PDX1. Variants significantly associated with decreased risk for GDM were rs340874, PROX1; rs2943634, IRS1; rs7041847, GLIS3; rs780094, GCKR; rs563694, G6PC2; and rs11605924, CRY2.

OR and *p* and *q*-values can be seen in the tables.

Additional findings

There are some variants for which some indication of association with GDM was obtained, but the results were not conclusive. Specifically, for CAU we can point to variants rs2785980 (LYPLAL1), rs7708285 (ZBED3) and rs573904 (SARDH), while for HIS we can point to variants rs1496653 (UBE2E2), rs4402960 (IGF2BP2), rs7651090 (IGF2BP2), rs4458523 (WFS1), rs459193 (ANKRD55), rs6235 (PCSK1), rs2745353 (RSPO3), rs2191349 (DGKB), rs933360 (GRB10), rs10814916 (GLIS3), rs1801222 (CUBN), rs2334499 (DUSP8), rs10747083 (P2RX2) and rs6517656 (BACE2) (**Table 3a** CAU and **Table 3b** HISP).

Bioinformatics analysis results

The 40 variants that presented some type of association with GDM were mapped to the closest gene/locus, resulting in a total of 34 encoding proteins that were used as STRING input data (**Supplementary Table 3**). Basic settings of analysis were: full STRING network, edges indicate both functional and physical protein associations, evidence as meaning of network edges, all active interaction sources, medium confidence (0.400) as minimum required interaction score. The complete results provided by the software can be found in **Supplementary Table 4**. The aspects that were considered most relevant to the objective of the work were selected by inspection so that **Supplementary Table 5**. **Table 4** displayed the bioinformatic analysis of relevant results, and the graph in **Figure 2** were obtained.

Discussion

In this study, we have evaluated the association of 98 susceptibility genetic variants with the diagnosis of GDM in a large population of pregnant women from two ethnic groups, from a single center, living in Spain, in the setting of an ongoing nutritional intervention program. To our knowledge, this is the first time that a large relevant set of SNPs has been analyzed in such a large sample of GDM patients, and with a close follow-up regarding their diet and lifestyle.

We have observed that the nutritional intervention presented a significant association with GDM, regardless of the variant considered, $OR < 1$ ($p < 0.05$, $q < 0.05$, $lfd_r < 0.1$), in practically all models for both ethnicities [**Supplementary Table 2** CAU-2HIS], confirming the protective effect of the MedDiet for GDM, as previously reported (3, 4, 16, 17) and, at the same time, confirming the significance of the observed SNPs. The variable of the logistic regression model that represents the nutritional group [GROUP] provided relevant information to assess the association of the genetic variants with GDM. The analysis showed that the SNP-GDM association tests identified as significant, when adjusted by the GROUP variable, had a lower FDR, that is, the discoveries have a low proportion of false significant identified associations, evaluated by *q*-values, and a low local false discovery rate, evaluated by *lfd_r*-values. Furthermore, *q*-values indicate that it is possible to qualify as discovery a null hypothesis with a *p*-value greater than the usual threshold of 0.05, increasing the set of variants that deserve further investigation, without significantly increasing the false discovery rate.

Although case-control-based GWAS usually refer to the additive model, it is currently recommended to also consider other genetic models (18) for a better understanding of the variant-disease relationship. Our study includes four genetic models that provide joint information on this relationship, aiding in the understanding of genetic analysis and providing further strengths to our findings. We can point out that, with some minor exceptions, when a significant association is observed for a given SNP in several models, the corresponding OR verify $OR_{ADD} < OR_{DOM} < OR_{REC} < OR_{HOM}$, when minor allele is a risk allele or $OR_{ADD} > OR_{DOM} > OR_{REC} > OR_{HOM}$ when minor allele is protective (**Table 3a** CAU-**3b** HIS).

Logistic regression results are consistent with information collected on STRING databases relative to PPI, both known and predicted, or associations identified by co-expression, protein homology, or text mining. The most significant variants in genetic tests are located in locus/genes encoding proteins annotated in the knowledge database as associated with biological processes related to diabetes and GDM (**Table 4**). Most of the nodes in **Figure 2** have the name of a locus/gene that are well referenced in the literature because several SNPs with a significant association with diabetes and GDM are located nearby. Specifically, the nodes located in the central core of the graph, MNTR1B (rs1387153, rs10830962, rs10830963), IGF2BP2 (rs4402960, rs7651090), KCNJ11 (rs5215), GCKR (rs780094), CDKAL1 (rs9368222), IRS1 (rs2943634), ADRA2A (rs10885122), CRY2(rs11605924), DGKB (rs2191349), G6PC2 (rs563694), GLIS3 (rs7041847, rs7034200, rs10814916), GIPR (rs2302593), WFS1 (rs4458523), ZBED3 (rs7708285), PROX1 (rs340874), FOXA2 (rs6048205), PDX1 (rs2293941), PCSK1 (rs6235), have been referred in various GWAS as associated to diabetes (6, 19–25), GDM (26–34) or both (35, 36).

TABLE 4 Bioinformatic analysis relevant results.

QueryIndex	QueryItem	StringId	Disease	Diabetes Mellitus	Gestational Diabetes	Regulation of Biological Quality	Regulation of cell Communication	Glucose Homeostasis	Regulation of Insulin Secretion	Cobalamin
1	ADRA2A	9606.ENSPO0000280155	✓			✓	✓	✓	✓	
2	ANKRD55	9606.ENSPO0000342295	✓							
3	BACE2	9606.ENSPO0000332979				✓		✓		
4	CDKAL1	9606.ENSPO0000274695	✓	✓	✓					
5	COBLL1	9606.ENSPO0000341360								
6	CRY2	9606.ENSPO0000478187	✓			✓	✓	✓		
7	CUBN	9606.ENSPO0000367064	✓			✓				✓
8	DGKB	9606.ENSPO0000385780				✓	✓			
9	DPYSL5	9606.ENSPO0000288699	✓							
10	DUSP8	9606.ENSPO0000380530					✓			
11	FOXA2	9606.ENSPO0000400341				✓	✓		✓	
12	G6PC2	9606.ENSPO0000364512				✓	✓	✓	✓	
13	GCKR	9606.ENSPO0000264717	✓			✓		✓		
14	GIPR	9606.ENSPO0000467494				✓	✓		✓	
15	GLIS3	9606.ENSPO0000371398	✓	✓						
16	GLP2R	9606.ENSPO0000262441	✓							
17	GRB10	9606.ENSPO0000381793	✓			✓	✓			
18	IGF2BP2	9606.ENSPO0000371634	✓	✓	✓	✓				
19	IRS1	9606.ENSPO0000304895	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
20	KCNJ11	9606.ENSPO0000345708	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
21	LYPLAL1	9606.ENSPO0000355895								
22	MTNR1B	9606.ENSPO0000257068	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
23	MTR	9606.ENSPO0000355536	✓							✓
24	P2RX2	9606.ENSPO0000343339	✓			✓	✓			
25	PCSK1	9606.ENSPO0000308024	✓			✓				
26	PDX1	9606.ENSPO0000370421	✓	✓		✓	✓	✓	✓	
27	PROX1	9606.ENSPO0000355925	✓							
28	RSPO3	9606.ENSPO0000349131					✓			
29	SARDH	9606.ENSPO0000360938								
30	SLC17A9	9606.ENSPO0000359376	✓							
31	UBE2E2	9606.ENSPO0000379931								
32	WARS	9606.ENSPO0000347495	✓							
33	WFS1	9606.ENSPO0000226760	✓	✓		✓	✓	✓		
34	ZBED3	9606.ENSPO0000255198				✓	✓			

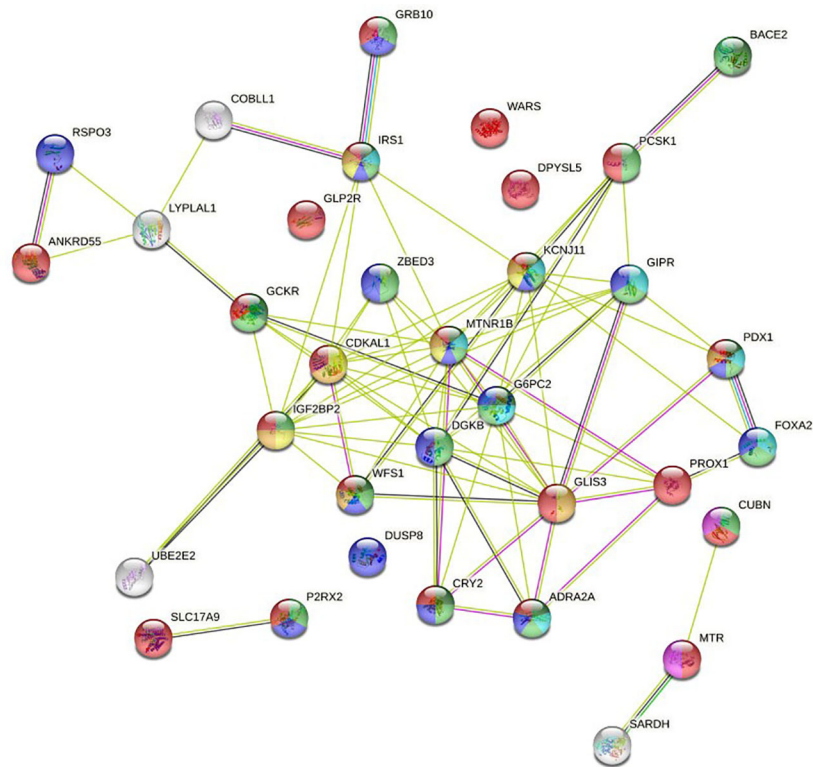


FIGURE 2

Full STRING network of both functional and physical protein associations. The edges indicate both functional and physical protein associations.

We can observe a subnetwork made up of the RSPO3 (rs2745353), ANKRD55 (rs459193), LYPLAL1 (rs2785980) and COBLL1 (RS7607980) nodes. Although this is not annotated in STRING gene ontology, the revised literature reports that all of them are related to fasting insulin and show a significant association with diabetes and GDM (6, 19, 21–23, 35, 36).

In addition to the central core, where the nodes with the highest intensity of interaction are located, the network has three terminal nodes, four isolated nodes, and two isolated subnetworks, one made up of two nodes and the other made up of three nodes.

BACE2 (rs737288, rs6517656) node has been associated with GDM in some studies (8, 37), but not in others (28, 38). It is related to higher fasting C-peptide levels. As can be seen in the graph, it has a close interaction with PCSK1. In our work, the association for the Hispanic ethnic stratum is significant. GRB10 (rs933360) node has strong interaction with the IRS1 node, an insulin receptor substrate 1 that may mediate the control of various cellular processes by insulin. It is associated with diabetes in some studies (32–34), and with both diabetes and GDM in other (35, 36). We have found an association with GDM in the Hispanic ethnic stratum. UBE2E2 (rs1496653) node

is an ubiquitin-conjugating enzyme associated with diabetes in some reports (20, 21, 25), and with GDM in other studies (27, 35, 36). In our work, it shows interaction with IGF2BP2, but it barely reaches significance in the Hispanic ethnicity.

DPYSL5 (rs1371614) has been associated with diabetes (6, 23, 24) and GDM (35, 36). It is a dihydropyrimidinase-related protein that has been linked with fasting glucose. In our study, we found an association in some models for both ethnic groups. WARS (rs3783347) is a shear stress-responsive gene that has been associated with diabetes (19, 22–24). In our study, it is significant in some models for Caucasian ethnicity. DUSP8 (rs2334499), dual specificity protein phosphatase 8, has phosphatase activity with synthetic phosphatase substrates and negatively regulates mitogen-activated protein kinase activity. Some studies (20, 21) report association with diabetes, while others (27, 36) do so with GDM. Our work shows association in a model for Hispanics. GLP2R (rs17676067) is a receptor for glucagon-like peptide 2, which has been reported as associated with diabetes (21). Our work shows association in the ADD, REC and HOM models for Caucasian ethnicity.

SLC17A9 (rs3746750), Solute Carrier Family 17 Member 9, is a protein coding gene related with transporter activity and

involved in vesicular storage and exocytosis of ATP. It has been related to purinergic signaling and diabetes (39, 40). In our work, it shows a significant association in the ADD, DOM and HET models for Caucasian ethnicity. In the graph, we can see a strong association of SLC17A9 with P2RX2 (rs10747083), purinoceptor 2, ion channel gated by extracellular ATP involved in a variety of cellular responses. It is included in some studies as associated with diabetes (19, 22, 23) and GDM (36). In our study, it hardly reaches significance in the DOM model of the Hispanic ethnicity.

The CUBN (rs18001222), MTR (rs1805087), and SARDH (rs573904) proteins define a subnetwork in the graph that play a role in one-carbon metabolism with functions in many cellular processes. Also, genetic variants in the transport and metabolism of folate modify glycemic control and risk of GDM, and the effect of folic acid on homocysteine levels is modulated by CUBN (rs1801222) (41). CUBN, cubilin, is a cotransporter which plays a role in lipoprotein, vitamin and iron metabolism; serves as transporter in several absorptive epithelia, including embryonic yolk sac. In a study by Böger et al. (42) it is described as “*a gene locus for albuminuria*”, an idea that is reiterated in subsequent works (43). It has also been associated with type 2 diabetes in an elderly population (44). In our work, it is in the limits of significance in the DOM and HET model in the Hispanic ethnicity. MTR, 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase, catalyzes the transfer of a methyl group from methyl-cobalamin to homocysteine; belongs to the vitamin-B12 dependent methionine synthase family, and has been associated with various biological processes related to pregnancy (45). In our work, it has been significant in the ADD model for Caucasian ethnicity.

It should be noted that some studies are partially in disagreement with the most widely accepted results, that is, they report no association with diabetes or GDM in some of the variants mentioned above. In this regard, the following works can be consulted (9, 38, 46–49). As an example, in our study some SNPs included in the initial list of variants and clearly identified in the literature, such as TCFL2, KCNQ1, HNFA1A, SCL30A8, have not reached a level of significance in any association model with GDM. This could be related to the complex genetic and epigenetic architecture, with both similarities and differences between diabetes and GDM, which deserves further investigation.

The idea of considering the evaluation of the impact of diet and lifestyle on the significance of SNPs in their association with GDM is currently attracting the interest of investigators (50). In this regard, we remark that our study has been performed with a meticulous evaluation of lifestyle habits, showing the protective effect of a healthy MedDiet, and that significant SNPs remained as such, after performing a rigorous genetic and statistical bioinformatic analysis.

Conclusion

Identifying the potential susceptibility genetic variants that could be associated with developing GDM and their modulation due to a nutritional intervention seems useful to design preventive and therapeutic strategies, especially in the setting of the increasing prevalence of GDM. In this study, we have examined a set of 98 SNPs in a large cohort of patients from two main ethnicities from a single center, and in the setting of an ongoing clearly beneficial nutritional intervention. The study confirms previous works that promote the therapeutic recommendation of Mediterranean Diet to all pregnant women to prevent GDM. In addition, we have confirmed a core set of SNPs reported in the literature as associated with diabetes and GDM. However, our statistical models, that include the nutritional intervention as an additional variable, highlight and reinforce the significance of the association effects, reducing the FDR levels. This means that a safer tool is available to control the risk of GDM based on the genomic profile of the individual. Therefore, genotypic analysis of women of child-bearing age and recommending a MedDiet, will assist the prompt identification and management of GDM.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#). Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Clinical Trials Committee of the Hospital Clínico San Carlos. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

Conceptualization and design: AR-L, AB, AC-P, NT, ADu, MH, MR, LM, MZ, PM, ADi, LV, VM, JV. Data curation, and analysis and interpretation of data: AR-L, AB, AC-P, NT, ADu, CF, IJ, LV, VM, IM, JV. Funding acquisition: AC-P, NT. Investigation: AC-P, MT, PM, ADi, AB, MA, LS, LM, MZ, MR, MT. Methodology: AC-P, NT, ADu, CF, IJ, MH, MT, IM, PM, MA, LS, LM, MZ, AB, LV, VM, JV. MR. Software: AR-L. Supervision, Validation and Visualization: AC-P, AR-L, AB, NT, MR. Writing – original draft: AC-P, AR-L, AB, NT. Writing – review & editing: AR-L, AC-P, AB, NT, ADu, MR, MA, LS, LM, MZ. All authors have seen and agree with the content of the full last version of manuscript.

Funding

This research was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III/MICINN of Spain under grant number PI20/01758, and European Regional Development Fund (FEDER) "A way to build Europe" and Ministerio de Ciencia e Innovación, and Agencia Estatal de Investigación of Spain under grant number PREDIGES RTC2019-007406-1. The design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, and approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication are the responsibilities of the authors alone and independent of the funders.

Acknowledgments

We wish to acknowledge our deep appreciation to the administrative personnel and nurses and dieticians from the Laboratory Department (Marisol Sanchez Orta, María Dolores Hermoso Martín, María Victoria Saez de Parayuelo), the Pregnancy and Diabetes Unit and to all members of the Endocrinology and Nutrition and Obstetrics and Gynecology departments of the San Carlos Clinical Hospital and the Central Unit for Research in Medicine (UCIM), University of Valencia, Valencia, Spain.

References

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee. Management of diabetes in pregnancy: Standards of medical care in diabetes—2022. *Diabetes Care* (2022) 45(Supplement_1):S232–43. doi: 10.2337/dc22-S015
2. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups consensus panel. international association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* (2010) 33:676–82. doi: 10.2337/dc10-0719
3. Assaf-Balut C, García de la Torre N, Durán A, Fuentes M, Bordiú E, del Valle L, et al. A Mediterranean diet with additional extra virgin olive oil and pistachios reduces the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM): A randomized controlled trial: The st. carlos GDM prevention study. *PLoS One* (2017) 12(10): e0185873. doi: 10.1371/journal.pone.0185873
4. García de la Torre N, Assaf-Balut C, Jimenez-Varas I, del Valle L, Durán A, Fuentes M, et al. Effectiveness of following Mediterranean diet recommendations in the real world in the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM) and adverse maternal-foetal outcomes: A prospective, universal, interventional study with a single group. the St carlos study. *Nutrients* (2019) 11:1210. doi: 10.3390/nu11061210
5. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Protocolos asistenciales en obstetricia. *Control prenatal. del embarazo norm* (2010) Available at: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, Pº de la Habana, 190 Bajo (28036) Madrid. E-mail: sego@sego.es | Fax: 34 91 350 98 18.
6. Manning AK, Hivert MF, Scott RA, Grimsby JL, Bouatia-Naji N, Chen H, et al. DIABetes genetics replication and meta-analysis (DIAGRAM) consortium, multiple tissue human expression resource (MUTHER) consortium. a genome-wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance. *Nat Genet* (2012) 44:659–69. doi: 10.1038/ng.2274
7. Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E, et al. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum Reprod Update* (2013) 19(4):376–90. doi: 10.1093/humupd/dmt013
8. Hayes MG, Urbanek M, Hivert MF, Armstrong LL, Morrison J, Guo C, et al. Identification of HKDC1 and BACE2 as genes influencing glycemic traits during

Conflict of interest

LM, MZ, LS, MA are employees of Patia Europe.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.1036088/full#supplementary-material>

- pregnancy through genome-wide association studies. *Diabetes*. (2013) 62(9):3282–91. doi: 10.2337/db12-1692
9. Huerta-Chagoya A, Vázquez-Cárdenas P, Moreno-Macías H, Tapia-Maruri L, Rodríguez-Guillén R, López-Vite E, et al. Genetic determinants for gestational diabetes mellitus and related metabolic traits in Mexican women. *PLoS One* (2015) 10(5):e0126408. doi: 10.1371/journal.pone.0126408
 10. Lowe WL Jr, Scholtens DM, Sandler V, Hayes MG. Genetics of gestational diabetes mellitus and maternal metabolism. *Curr Diabetes Rep* (2016) 16(2):15. doi: 10.1007/s11892-015-0709-z
 11. Wu L, Cui L, Tam WH, Ma RC, Wang CC. Genetic variants associated with gestational diabetes mellitus: a meta-analysis and subgroup analysis. *Sci Rep* (2016) 6:30539. doi: 10.1038/srep30539
 12. Ding M, Chavarro J, Olsen S, Lin Y, Ley SH, Bao W, et al. Genetic variants of gestational diabetes mellitus: a study of 112 SNPs among 8722 women in two independent populations. *Diabetologia*. (2018) 61(8):1758–68. doi: 10.1007/s00125-018-4637-8
 13. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. (2015) 4:7. doi: 10.1186/s13742-015-0047-8
 14. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genome-wide experiments. *Proc Natl Acad Sci* (2003) 100:9440–5. doi: 10.1073/pnas.1530509100
 15. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(D1):D607–13. doi: 10.1093/nar/gky1131
 16. Assaf-Balut C, García de la Torre N, Fuentes M, Durán A, Bordiú E, Del Valle L, et al. A high adherence to six food targets of the Mediterranean diet in the late first trimester is associated with a reduction in the risk of maternal-foetal outcomes: The st. carlos gestational diabetes mellitus prevention study. *Nutrients* (2019) 11:66. doi: 10.3390/nu11010066
 17. Melero V, Assaf-Balut C, García de la Torre N, Jiménez I, Bordiú E, del Valle L, et al. Benefits of adhering to a Mediterranean diet supplemented with extra virgin olive oil and pistachios in pregnancy on the health of offspring at 2 years of age.

results of the San carlos gestational diabetes mellitus prevention study. *J Clin Med* (20) 9:1454. doi: 10.3390/jcm9051454

18. Liu HM, Zheng JP, Yang D, Liu ZF, Li Z, Hu ZZ, et al. Recessive/dominant model: Alternative choice in case-control-based genome wide association studies. *PLoS One* (2021) 16(7):e0254947. doi: 10.1371/journal.pone.0254947

19. Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME, Luan J, et al. Large-Scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet* (2012) 44(9):991–1005. doi: 10.1038/ng.2385

20. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segrè AV, Steinthorsdottir V, et al. Large-Scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet* (2012) 44(9):981–90. doi: 10.1038/ng.2383

21. Mahajan A, Go MJ, Zhang W, Below JE, Gaulton KJ, Ferreira T, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet* (2014) 46(3):234–44. doi: 10.1038/ng.2897

22. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, Kaakinen M, et al. An expanded genome-wide association study of type 2 diabetes in europeans. *Diabetes* (2017) 66(11):2888–902. doi: 10.2337/db16-1253

23. Bien SA, Pankow JS, Haessler J, Lu Y, Pankratz N, Rohde RR, et al. Transethnic insight into the genetics of glycaemic traits: fine-mapping results from the population architecture using genomics and epidemiology (PAGE) consortium. *Diabetologia* (2017) 60(12):2384–98. doi: 10.1007/s00125-017-4405-1

24. Chen J, Spracklen CN, Marenne G, Varshney A, Corbin LJ, Luan J, et al. The trans-ancestral genomic architecture of glycemic traits. *Nat Genet* (2021) 53(6):840–60. doi: 10.1038/s41588-021-00852-9

25. Sabiha B, Bhatti A, Fan KH, John P, Aslam MM, Ali J, et al. Assessment of genetic risk of type 2 diabetes among pakistanis based on GWAS-implicated loci. *Gene* (2021) 783:145563. doi: 10.1016/j.gene.2021.145563

26. Cho YM, Kim TH, Lim S, Choi SH, Shin HD, Lee HK, et al. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia* (2009) 52(2):253–61. doi: 10.1007/s00125-008-1196-4

27. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich T, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton K, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* (2016) 536(7614):41–7. doi: 10.1038/nature18642

28. Kleinberger JW, Maloney KA, Pollin TI. The genetic architecture of diabetes in pregnancy: Implications for clinical practice. *Am J Perinatol* (2016) 33(13):1319–26. doi: 10.1055/s-0036-1592078

29. Rosta K, Al-Aissa Z, Hadarits O, Harreiter J, Nádasdi Á, Kelemen F, et al. Association study with 77 SNPs confirms the robust role for the rs10830963/G of MTNR1B variant and identifies two novel associations in gestational diabetes mellitus development. *PLoS One* (2017) 12(1):e0169781. doi: 10.1371/journal.pone.0169781

30. Guo F, Long W, Zhou W, Zhang B, Liu J, Yu B. FTO, GCKR, CDKAL1 and CDKN2A/B gene polymorphisms and the risk of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* (2018) 298(4):705–15. doi: 10.1007/s00404-018-4857-7

31. Lin Z, Wang Y, Zhang B, Jin Z. Association of type 2 diabetes susceptible genes GCKR, SLC30A8, and FTO polymorphisms with gestational diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *Endocrine* (2018) 62:34–45. doi: 10.1007/s12020-018-1651-z

32. Bai Y, Tang L, Li L, Li L. The roles of ADIPOQ rs266729 and MTNR1B rs10830963 polymorphisms in patients with gestational diabetes mellitus: A meta-analysis. *Gene* (2020) 730:144302. doi: 10.1016/j.gene.2019.144302

33. Dalfrà MG, Burlina S, Del Vecovo GG, Lapolla A. Genetics and epigenetics: New insight on gestational diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2020) 11:602477. doi: 10.3389/fendo.2020.602477

34. Benny P, Ahn HJ, Burlingame J, Lee MJ, Miller C, Chen J, et al. Genetic risk factors associated with gestational diabetes in a multi-ethnic population. *PLoS One* (2021) 16(12):e0261137. doi: 10.1371/journal.pone.0261137

35. Prasad RB, Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)* (2015) 6(1):87–123. doi: 10.3390/genes6010087

36. Powe CE, Nodzenski M, Talbot O, Allard C, Briggs C, Leya MV, et al. Genetic determinants of glycemic traits and the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes* (2018) 67(12):2703–9. doi: 10.2337/db18-0203

37. Tan YX, Hu SM, You YP, Yang GL, Wang W. Replication of previous genome-wide association studies of HKDC1, BACE2, SLC16A11 and TMEM163 SNPs in a gestational diabetes mellitus case-control sample from han Chinese population. *Diabetes Metab Syndr Obes* (2019) 12:983–9. doi: 10.2147/DMSO.S207019

38. Kawai VK, Levinson RT, Adefurin A, Kurnik D, Collier SP, Conway D, et al. A genetic risk score that includes common type 2 diabetes risk variants is associated with gestational diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2017) 87(2):149–55. doi: 10.1111/cen.13356

39. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, et al. Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci Rep* (2014) 4:6689. doi: 10.1038/srep06689

40. Moriyama Y, Hiasa M, Sakamoto S, Omote H, Nomura M. Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal* (2017) 13(3):387–404. doi: 10.1007/s11302-017-9568-1

41. Hazra A, Kraft P, Lazarus R, Chen C, Chanock SJ, Jacques P. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. *Hum Mol Genet* (2009) 18(23):4677–87. doi: 10.1093/hmg/ddp428

42. Böger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Köttgen A, de Boer IH, et al. CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol* (2011) 22(3):555–70. doi: 10.1681/ASN.2010060598

43. Ahluwalia TS, Schulz CA, Waage J, Skaaby T, Sandholm N, van Zuydam N, et al. A novel rare CUBN variant and three additional genes identified in europeans with and without diabetes: results from an exome-wide association study of albuminuria. *Diabetologia* (2019) 62(2):292–305. doi: 10.1007/s00125-018-4783-z

44. Tsekmekidou X, Tsetsos F, Koufakis T, Karras SN, Georgitsi M, Papanas N, et al. Association between CUBN gene variants, type 2 diabetes and vitamin d concentrations in an elderly Greek population. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2020) 198:105549. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105549

45. Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, Braga RC, Hirata RD, Hirata MH, et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* (2008) 62(8):1010–21. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602810

46. Wang Y, Nie M, Li W, Ping F, Hu Y, Ma L, et al. Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. *PLoS One* (2011) 6(11):e26953. doi: 10.1371/journal.pone.0026953

47. Anghebem-Oliveira MI, Martins BR, Alberton D, Ramos EAS, Picheth G, Rego FGM. Type 2 diabetes-associated genetic variants of FTO, LEPR, PPARγ, and TCF7L2 in gestational diabetes in a Brazilian population. *Arch Endocrinol Metab* (2017) 61(3):238–48. doi: 10.1590/2359-3997000000258

48. Kasuga Y, Hata K, Tajima A, Ochiai D, Saisho Y, Matsumoto T, et al. Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control study. *Endocr J* (2017) 64(4):463–75. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0431

49. Shen Y, Jia Y, Li Y, Gu X, Wan G, Zhang P, et al. Genetic determinants of gestational diabetes mellitus: a case-control study in two independent populations. *Acta Diabetol* (2020) 57(7):843–52. doi: 10.1007/s00592-020-01485-w

50. Popova PV, Klyushina AA, Vasilyeva LB, Tkachuk AS, Vasukova EA, Anopova AD, et al. Association of common genetic risk variants with gestational diabetes mellitus and their role in GDM prediction. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2021) 12:628582. doi: 10.3389/fendo.2021.628582

COPYRIGHT

© 2022 Ramos-Levi, Barabash, Valerio, García de la Torre, Mendizabal, Zulueta, de Miguel, Diaz, Duran, Familiar, Jimenez, del Valle, Melero, Moraga, Herraz, Torrejon, Arregi, Simón, Rubio and Calle-Pascual. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.