

# Vesículas extracelulares placentarias: su potencial como biomarcadores de complicaciones gestacionales

## *Placental extracellular vesicles: their potential as biomarkers of gestational complications*

Brenda Lara, Fátima Merech, Daiana Vota, Guillermina Calo, Elizabeth Soczewski, Esteban Grasso, Claudia Pérez Leirós y Vanesa Hauk

CONICET, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto de la autora: Brenda Lara

E-mail: vchauk@qb.fcen.uba.ar

Correspondencia: Int. Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, Pab. 2, Q559, (1428) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido: 16/4/2020 Aceptado: 3/5/2020

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

### Resumen

Las vesículas extracelulares son importantes mediadores de la comunicación intercelular. Durante la gestación, diversos tipos celulares placentarios como no placentarios secretan vesículas extracelulares a la circulación. Se ha demostrado que las células trofoblásticas liberan permanentemente a la circulación materna vesículas extracelulares cargadas con diversas moléculas que modulan la función de las células trofoblásticas, inmunes y vasculares, entre otras.

Las complicaciones gestacionales que afectan la placentación, como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y la preeclampsia (PE), son un problema de salud pública mundial, ya que son condiciones que contribuyen, en alto grado, a la morbilidad materna y neonatal.

Hasta ahora, no se dispone de pruebas clínicas que permitan anticipar el diagnóstico y/o proveer indicadores predictivos para identificar a las madres con mayor riesgo de desarrollar estas complicaciones. En los últimos años, se ha demostrado el potencial de las vesículas extracelulares y su contenido como potenciales biomarcadores de distintas patologías, por lo que su aplicación despierta especial interés en las complicaciones del embarazo.

**Palabras clave:** vesículas extracelulares, placenta, patologías gestacionales.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2020; Vol. XXVII N° 1 Enero-junio de 2020: 7-11

### Abstract

*Extracellular vesicles are significant mediators of cell-to-cell communication. During pregnancy, placental and non-placental cell types release extracellular vesicles into circulation. It has been demonstrated that trophoblast cells are continuously releasing vesicles loaded with factors modulating trophoblast, immune and vascular functions.*

*Gestational complications associated to impaired placentation, such as intrauterine growth restriction (IUGR) and preeclampsia (PE), are a global public health problem since they are major contributors to maternal and neonatal morbidity and mortality.*

*Currently, there are no clinical tests that allow early diagnosis and/or provide predictive markers to identify mothers at higher risk of developing these complications. The potential of extracellular vesicles and their content as biomarkers for different pathologies has been demonstrated. For this reason nowadays their application in gestational complications is of special interest.*

**Key words:** extracellular vesicles, placenta, gestational diseases.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2020; Vol. XXVII N° 1 Enero-junio de 2020: 7-11

### INTRODUCCIÓN

#### ¿Qué son las vesículas extracelulares?

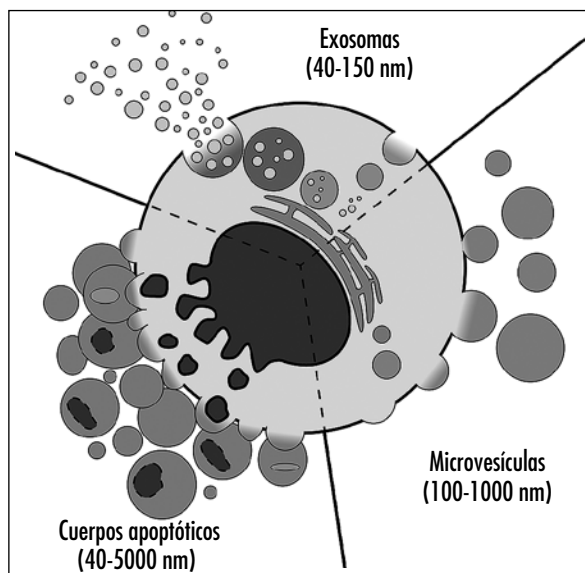
Las células pueden comunicarse con células vecinas o con células distantes a través de la liberación y secreción de vesículas extracelulares (VE). Las VE transportan subproductos metabólicos celulares que incluyen, entre otros, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, reflejando el estado metabólico de la célula que las libera. De esta manera, las VE representan aspectos del estado biológico y funcional de la célula de origen<sup>1</sup>.

Las células pueden secretar diferentes tipos de VE, que han sido clasificadas según su origen subcelular<sup>2</sup>. Por un lado, se encuentran las microvesículas que se forman y liberan por evaginaciones de la membrana plasmática. Estas VE muestran una amplia gama de tamaños (100-1000 nm de diámetro). Por otro lado, se encuentran los exosomas, que tienen 40-150 nm de diámetro, se originan de vías endosomales y son secretados al espacio extracelular<sup>3</sup>. Por último, los cuerpos apoptóticos son VE producidas

a partir de células en proceso de apoptosis, que presentan una gran heterogeneidad en forma y tamaño (40 - > 5000 nm) (Figura 1).

Las VE se encuentran presentes en distintos líquidos biológicos, como suero, plasma, orina, bilis, saliva, leche, líquido cefalorraquídeo y semen, entre otros<sup>4</sup>. Estas pueden interactuar con la célula *target* de distintas maneras. Las VE presentan moléculas de membrana que activan vías de señalización mediante una interacción ligando-receptor afectando las funciones de la célula *target*. Por otro lado, pueden ser internalizadas mediante endocitosis y/o fagocitosis o, incluso, fusionarse con la membrana celular y liberar su contenido específico a las células *target*. Así, modifican el estado fisiológico de la célula receptora y son capaces de regular múltiples procesos fisiopatológicos.

En este sentido, las VE pueden regular la respuesta inmune, la angiogénesis, la proliferación celular y la reparación tisular, entre otros procesos con implicaciones tanto fisiológicas como patológicas. La posibilidad de analizar los perfiles de VE abre un camino prometedor en la identificación de potenciales biomarcadores.



**Figura 1:** Clasificación de las vesículas extracelulares según su origen subcelular. Las microvesículas se forman por evaginaciones de la membrana plasmática. Los exosomas se originan de vías endosomales y son secretados al espacio extracelular. Los cuerpos apoptóticos se generan a partir de células en proceso de apoptosis.

### Nomenclatura utilizada en la literatura

Cabe aclarar que en diversos artículos de investigación se utiliza el término exosomas para designar a las VE. Actualmente se sabe que los

protocolos de purificación más utilizados (ultra-centrifugación diferencial, filtración por poros de 220 nm)<sup>5</sup> y distintos *kits* comerciales aíslan vesículas extracelulares pequeñas enriquecidas en exosomas, pero no aíslan exosomas de manera exclusiva. El término *exosoma* suele referirse a una población mixta de VE pequeñas, cuyo origen intracelular no está demostrado. Por lo tanto, aquí se utilizará el término VE cuando los artículos no tengan en cuenta el tamaño de estas o el de VE pequeñas cuando el método de purificación seleccione vesículas menores de 200 nm (con independencia de la nomenclatura utilizada en el artículo referido).

### Papel de las vesículas extracelulares durante la constitución de la interfase materno-placentaria

Durante la constitución de la interfase materno-placentaria, las células trofoblásticas (Tb) adquieren perfiles funcionales y fenotípicos con capacidad de proliferar, diferenciarse en fenotipos que migran e invaden el estroma decidual, formar sincios y participar en la transformación vascular y en el transporte de nutrientes al feto<sup>6</sup>. Estos procesos requieren un fino control por factores maternos y fetales para mantener la homeostasis tisular y regular la respuesta inflamatoria posimplantación, lo que asegura un adecuado crecimiento fetal.

Existen evidencias que apuntan a un papel central de las VE placentarias, caracterizadas por la presencia de la proteína fosfatasa alcalina de placenta (PLAP), como orquestadoras de la placentación<sup>7</sup>. Las VE placentarias se detectan en el plasma desde la semana 6 de gestación y aumentan su concentración a lo largo de todo el embarazo<sup>8</sup>. Utilizando diversos modelos *in vitro* con líneas celulares trofoblásticas y *ex vivo* con muestras de placenta humana, se ha demostrado que VE liberadas por células citotrofoblásticas inducen la invasión de células trofoblásticas extravelosas<sup>9</sup>, inducen la migración endotelial y de VE pequeñas secretadas por células trofoblásticas extravelosas y promueven la migración de células musculares (VSMC), lo que sugiere su participación en la remodelación de las arterias espiraladas maternas<sup>10</sup>.

La composición y liberación de VE está regulada por el microambiente. Se ha demostrado que la cantidad de VE liberadas por células Tb depende inversamente de la concentración de oxígeno<sup>9</sup> y específicamente en condiciones de hipoxia se incrementa la cantidad de VE pequeñas liberadas

por células Tb<sup>11</sup>. Hace poco se ha informado que estas VE pequeñas liberadas en condiciones de hipoxia presentan un contenido proteico que involucra principalmente a vías inflamatorias e inducen la liberación de GM-CSF, IL-6, IL-8 y VEGF en células endoteliales<sup>12</sup>. Más aún, estas VE derivadas de células Tb expuestas a condiciones de hipoxia son capaces de activar e inducir la liberación de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  en células mononucleares totales<sup>13</sup>. Por otro lado, las altas concentraciones de glucosa también inducen un aumento en la liberación de exosomas tanto en condiciones de normoxia (8% O<sub>2</sub>) como de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) en cultivos primarios de células Tb del primer trimestre<sup>14</sup>.

### **Papel de las vesículas extracelulares trofoblásticas en la modulación de la respuesta inflamatoria**

Numerosas evidencias sostienen que las células trofoblásticas regulan el perfil funcional de las poblaciones de leucocitos presentes en las distintas interfases materno-placentarias y que esta regulación es clave en el mantenimiento de la homeostasis<sup>15-17</sup>. Por su parte, diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de las VE como moduladoras de la respuesta inflamatoria<sup>7</sup>.

Entre las principales células inmunes que intervienen en la regulación de la respuesta inflamatoria se señala a los linfocitos T CD4+ reguladores (Treg) y a los macrófagos activados en un perfil alternativo. En las embarazadas, la subpoblación de Treg naturales se expande en el compartimiento sanguíneo en el segundo trimestre<sup>18-19</sup> y se generan células Treg inducidas contra antígenos inherentes a la gestación<sup>20</sup>. En este sentido, VE pequeñas expresan TGF- $\beta$  y PD-L1, que están involucrados en el *priming* o condicionamiento hacia Treg<sup>21</sup>. Más aún, recientemente se ha demostrado que VE derivadas de células Tb mediante la proteína chaperona HSPE1 son orquestadoras de la diferenciación de células Treg<sup>22</sup>. Por otro lado, se informó que VE pequeñas presentan en la superficie las moléculas FasL y TRAIL. Ambas moléculas cumplen una función importante en la inducción de la apoptosis en células mononucleares totales activadas<sup>23</sup>. Además, VE trofoblásticas presentan la molécula sincitina-1, que reduce la secreción de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de las células mononucleares totales. Además, las células trofoblásticas, mediante la liberación de VE, inhiben las respuestas citotóxicas de las células NK.

Esto se debe a que las VE contienen los ligandos del receptor NKG2D, MIC y ULBP1-5, lo que induce una disminución en los niveles del receptor NKG2D en las células NK, como también en las células T CD8 (+) y T $\gamma\delta$ <sup>24</sup>. Asimismo, se ha informado que células Tb desactivan a los neutrófilos y promueven su apoptosis<sup>25</sup>. Sobre esta base, vale comentar lo observado por Nadkarni y colaboradores acerca de que a través de la transferencia de proteínas presentes en VE liberadas por los neutrófilos apoptóticos, estos promueven la inducción de células Treg<sup>26</sup>.

### **Vesículas extracelulares en complicaciones de la gestación**

Las complicaciones gestacionales que se asocian con insuficiencia placentaria, como la preeclampsia (PE) y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), contribuyen en alta proporción a la morbimortalidad materna y neonatal<sup>6,27,28</sup>. Se estima que la prevalencia de PE es de 3-5%<sup>29</sup> y la de RCIU, de 8-9%<sup>30</sup>. Hasta ahora, el diagnóstico de PE se basa en la aparición de hipertensión y proteinuria a partir de la semana 20 en mujeres previamente normotensas<sup>31</sup>. Las pruebas clínicas disponibles no son suficientemente específicas para anticipar el diagnóstico y/o proveer indicadores predictivos para identificar a las madres con mayor riesgo de desarrollar estas complicaciones. Se han propuesto combinaciones de estudios diagnósticos en el primer trimestre, pero aún no alcanzan la sensibilidad y la especificidad requeridas. De esta manera, la identificación de biomarcadores moleculares surge como una herramienta alternativa con utilidad clínica para predecir y anticipar el curso de la enfermedad.

Por otro lado, el 6-8% de los embarazos son diagnosticados con diabetes gestacional, que en sí misma es un factor de riesgo para la preeclampsia, así como el parto prematuro y el parto de bebés grandes para la edad gestacional.

Como se mencionó, las células trofoblásticas liberan permanentemente a la circulación materna VE cargadas con diversas moléculas<sup>32</sup>. Así, la cuantificación de la concentración y la identificación del contenido específico de VE en condiciones patológicas que alteran la placentación se proponen como una novedosa fuente de biomarcadores para la detección temprana de complicaciones gestacionales.

En este sentido, las pacientes con complicaciones gestacionales como diabetes gestacional o preeclampsia (PE) presentan un incremento en

la concentración de exosomas totales como específicos de placenta PLAP<sup>+</sup><sup>32</sup>. Sin embargo, en los estudios prospectivos se ha demostrado que el número de VE placentarias circulantes, por sí solo, no parece tener un valor predictivo. Es probable que los cambios cualitativos en la carga de VE placentarias puedan ser más importantes que las diferencias cuantitativas tanto para la patogenia como para la predicción de complicaciones gestacionales. En línea con esto, las VE PLAP<sup>+</sup> de mujeres con PE presentan un aumento en los niveles de sFlt-1 y endoglin, ambos factores antiangiogénicos asociados al desarrollo de PE<sup>33</sup>. Más aún, la administración de VE plasmáticas de pacientes con PE causa disfunción vascular en hembras de ratón preñadas<sup>33</sup>.

De igual modo, VE pequeñas aisladas de mujeres con diabetes gestacional aumentan significativamente la liberación de citoquinas proinflamatorias (GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) por las células endoteliales<sup>34</sup> y no logran promover la secreción de insulina. De hecho, al estudiar el contenido de miRNA de VE de embarazadas con diabetes gestacional respecto de los controles, se informó un aumento en 10 miRNA asociados principalmente a proliferación y diferenciación trofoblástica, regulación de la secreción de insulina y transporte de glucosa<sup>35</sup>.

Por último, cabe destacar que en los últimos años se ha propuesto el fluido gingival crevicular (GCF, del inglés *gingival crevicular fluid*) como fuente para evaluar los biomarcadores. El GCF es un exudado sérico originado en el surco gingival por la inflamación de los tejidos periodontales que resulta de gran interés ya que, por un lado, contiene factores y marcadores sistémicos asociados a la gestación como sFlt-1, VEGF, entre otros<sup>36</sup> y, por otro lado, es una muestra cuyo método de obtención no es invasivo. Un análisis proteómico de GCF ha demostrado que la mayoría de las proteínas de este fluido oral derivan de vesículas extracelulares<sup>37</sup>. En los estudios preliminares obtenidos en colaboración con investigadores de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, hemos demostrado que el GCF de mujeres embarazadas de 16-20 semanas de gestación afecta tanto la funcionalidad de las células trofoblásticas como la interacción inmune-trofoblástica<sup>38</sup>. Recientemente, Monteiro y colaboradores han reportado que las pacientes embarazadas de 11-14 semanas de gestación que más tarde desarrollan diabetes gestacional presentan un incremento en la concentración de VE

totales y que las embarazadas con diagnóstico de PE presentan un incremento en la concentración de exosomas en el GCF en el tercer trimestre<sup>36</sup>. Sin embargo, hasta ahora no hay caracterización de exosomas PLAP<sup>+</sup> en el GCF de pacientes embarazadas en el primer trimestre.

## CONCLUSIONES

Las VE tienen la capacidad de transferir información a las células *target* y afectar su funcionalidad. Numerosas evidencias muestran que las pacientes con complicaciones gestacionales con alteraciones en la placentación, como PE o RCIU, presentan un incremento en la concentración de VE totales como específicas de placenta PLAP<sup>+</sup> como también diferencias en el contenido de estas. Por lo tanto, la posibilidad de analizar los perfiles de VE abre un camino prometedor en la identificación de potenciales biomarcadores. Para ello, es de gran importancia mejorar los métodos de purificación a fin de obtener poblaciones puras de los distintos tipos de VE y, así, comprender los mecanismos por los cuales regulan las distintas funciones.

## REFERENCIAS

1. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015;4(2015):1-60.
2. Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 2016;164(6):1226-32.
3. Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, Koh YQ, Duncombe G, Illanes SE, et al. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* [Internet] 2015;213(4):S173-81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.001>.
4. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2013;12(5):347-57. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3978>
5. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;30(1):3.22.1-3.22.29.
6. Huppertz B, Weiss G, Moser G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. *J Reprod Immunol* 2014;101:74-9.
7. Nair S, Salomon C. Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy. *Semin Immunopathol* 2018;40(5):425-37.
8. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med* 2014;12(1):1-19.
9. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS One* 2013;8(11).

10. Salomon C, Sarah Y, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, et al. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front Pharmacol* 2014;5:1-13.
11. Truong G, Guanzon D, Kinhal V, Elfeky O, Lai A, Longo S, et al. Oxygen tension regulates the miRNA profile and bioactivity of exosomes released from extravillous trophoblast cells-Liquid biopsies for monitoring complications of pregnancy. *PLoS One* 2017;12(3):1-27.
12. Dutta S1, Lai A1, Scholz-Romero K1,2, Shiddiky MJA3, Yamachi Y4, Mishra JS5, Rice GE1, Hyett J6, Kumar S5, Salomon C1 2. Hypoxia-induced small extracellular vesicle proteins regulate proinflammatory cytokines and systemic blood pressure in pregnant rats. *Clin Sci [Internet]* 2020; Disponible en: <https://doi.org/10.1042/CS20191155>.
13. Lee SM, Romero R, Lee YJ, Park IS, Park CW, Yoon BH. Systemic inflammatory stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast as a model for inflammatory response in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207(4):337.e1-337.e8.
14. Rice GE, Scholz-Romero K, Sweeney E, Peiris H, Kobayashi M, Duncombe G, et al. The effect of glucose on the release and bioactivity of exosomes from first trimester trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(10):E1280-8.
15. Hauk V, Azzam S, Calo G, Gallino L, Papparini D, Franchi A, et al. Vasoactive intestinal peptide induces an immunosuppressant microenvironment in the maternal-fetal interface of non-obese diabetic mice and improves early pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 2014;71(2):120-30.
16. Papparini DE, Choudhury RH, Vota DM, Karolczak-Bayatti M, Finn-Sell S, Grasso EN, et al. Vasoactive intestinal peptide shapes first-trimester placenta trophoblast, vascular, and immune cell cooperation. *Br J Pharmacol* 2019;176(7):964-80.
17. Hauk V, Vota D, Gallino L, Calo G, Papparini D, Merech F, et al. Trophoblast VIP deficiency entails immune homeostasis loss and adverse pregnancy outcome in mice. *FASEB J* 2019;33(2):1801-10.
18. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011;241(1):20-38.
19. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J Leukoc Biol* 2010;88(4):625-33.
20. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 2012;150(1):29-38.
21. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol* 2014;72(5):440-57.
22. Kovács ÁF, Fekete N, Turiák L, Ács A, Kőhidai L, Buzás EI, et al. Unravelling the role of trophoblastic-derived extracellular vesicles in regulatory T cell differentiation. *Int J Mol Sci* 2019;20(14).
23. Stenqvist A-C, Nagaeva O, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Exosomes secreted by human placenta carry functional fas ligand and trail molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J Immunol* 2013;191(11):5515-23.
24. Hedlund M, Stenqvist A-C, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol* 2009;183(1):340-51.
25. Calo G, Sabbione F, Vota D, Papparini D, Ramhorst R, Trevani A, et al. Trophoblast cells inhibit neutrophil extracellular trap formation and enhance apoptosis through vasoactive intestinal peptide-mediated pathways. *Hum Reprod* 2016;32(1):55-64.
26. Nadkarni S, Smith J, Sferruzzi-Perri AN, Ledwozyw A, Kishore M, Haas R, et al. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(52):E8415-24.
27. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008;51(4):970-5.
28. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):425-33.
29. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 2001;357(9249):53-6.
30. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(1):198-206.
31. Hepburn M, Rosenberg K. An audit of the detection and management of small-for-gestational age babies. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;(March):212-6.
32. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: Potential role of exosomal micromas across gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102(9):3182-94.
33. Chang X, Yao J, He Q, Liu M, Duan T, Wang K. Exosomes from women with preeclampsia induced vascular dysfunction by delivering sFLT (soluble fms-like tyrosine kinase)-1 and SENG (soluble endoglin) to endothelial cells. *Hypertension* 2018;72(6):1381-90.
34. Salomon C, Scholz-Romero K, Sarker S, Sweeney E, Kobayashi M, Correa P, et al. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. *Diabetes* 2016; 65 (3): 598-609.
35. 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.
36. Chaparro A, Gaedeche D, Ramírez V, Zuñiga E, Kusanovic JP, Inostroza C, et al. Placental biomarkers and angiogenic factors in oral fluids of patients with preeclampsia. *Prenat Diagn* 2016;36(5):476-82.
37. Wen X, Franchi L, Chen F, Gu Y. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for novel biomarkers of pubertal growth peak. *Eur J Orthod* 2018;40(4):414-22.
38. Deramo L, Hauk V, Calo G, Merech F, Brenda L, Doga L, et al. Periodontal condition and trophoblastic function in pregnant women. *J Dent Res* 2020;Special is.