



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ESTUDIO PILOTO DEL PERFIL METILÓMICO  
EN LA NIÑEZ TEMPRANA Y SU ASOCIACIÓN  
CON COMPLICACIONES DURANTE EL  
EMBARAZO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

JOAQUÍN GLORIA PIÑA

ASESORA: DRA. ERIKA CHAVIRA SUÁREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Estudio piloto del perfil metilómico en la niñez temprana y su asociación con complicaciones durante el embarazo.**

Que presenta el pasante: **Joaquín Gloria Piña**  
Con número de cuenta: **412011524** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Marzo de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Erika Chavira Suárez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>2do. SUPLENTE</b>	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

A mi madre y padre, como recompensa,  
y a mis hermanas, como ejemplo.

# AGRADECIMIENTOS

Estoy agradecido con las siguientes personas e instituciones:

Mi universidad, UNAM, por ser una importante fuente de conocimiento.

Mis profesores de la Universidad, por compartir su conocimiento y experiencia.

Los profesores que conforman mi jurado, Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, M. en C. Maritere Domínguez Rojas, QFB Alejandro Gutiérrez García y LBD Rosa Ma. de los Ángeles López Cabrera, por dedicar tiempo y mostrar interés por mi trabajo.

Mi asesora, Dra. Erika Chavira Suárez, por ayudarme a concluir este trabajo, introducirme al panorama de la investigación, y apoyarme para continuar.

Dr. Felipe Vadillo Ortega y el equipo que conforma la Unidad de Vinculación Científica del INMEGEN, por darme la oportunidad de ser incluido en su grupo de investigación, y confiar en mi trabajo.

Dra. Violeta Castro Leyva, por complementar mi trabajo, no solo con su conocimiento, sino con su amistad.

Mis amigos de la Universidad, por la empatía emocional.

Mis amigos fuera de la Universidad, por contribuir a hacerme un individuo integral.

Mis padres y hermanas, por el apoyo económico.

Mi familia, por cuidar de mí.

Björk. I am strong in her hands.

"Our lives are not our own. From womb to tomb, we are bound to others, past and present, and by each crime and every kindness, we birth our future."

—Sonmi-451 (Cloud Atlas, de David Mitchell)



El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Vinculación Científica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de la Dra. Erika Chavira Suárez.

El chip de microarreglos fue proporcionado por la Dra. Bárbara Antuna Puente del Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

# ÍNDICE

	Pág.
Índice de Tablas	IV
Índice de Figuras	VI
<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Abstract</b>	3
<b>3. Introducción</b>	5
<b>4. El embarazo y los primeros dos años de vida</b>	8
<b>4.1 Fisiología y evolución del embarazo</b>	10
<b>4.1.1 Las fases anabólica y catabólica de la mujer embarazada</b>	14
<b>4.2 La regulación metabólica durante el embarazo</b>	17
<b>4.2.1 La influencia de los factores materno-ambientales en la regulación metabólica</b>	17
<b>4.3 Las complicaciones clínicas en el embarazo y sus cifras de prevalencia en México</b>	22
<b>4.3.1 Complicaciones del embarazo</b>	23
<b>4.3.1.1 Obesidad durante el embarazo</b>	25
<b>4.3.1.2 Preeclampsia</b>	32
<b>4.3.1.3 Preeclampsia y obesidad en el embarazo</b>	39
<b>5. La niñez temprana y la influencia de factores materno-ambientales</b>	41
<b>5.1 Puerperio y etapas de alimentación en la niñez temprana</b>	42
<b>5.1.1 Puerperio</b>	42
<b>5.1.2 Lactancia</b>	43
<b>5.1.3 Ablactación</b>	46

<b>5.2</b> Los hábitos nocivos en la niñez temprana	47
<b>6.</b> Programación, plasticidad y epigenética de los primeros mil días	50
<b>6.1</b> La programación fetal y la plasticidad del desarrollo	53
<b>6.2</b> La epigenética y sus mecanismos asociados	55
<b>6.3</b> Dinámica epigenética en los primeros mil días	60
<b>6.4</b> El origen de las enfermedades multifactoriales asociadas con cambios epigenéticos en la niñez temprana	64
<b>7.</b> Antecedentes	68
<b>8.</b> Hipótesis	73
<b>9.</b> Objetivos	75
<b>9.1</b> Objetivo general	76
<b>9.2</b> Objetivos particulares	76
<b>10.</b> Metodología	77
<b>10.1</b> Esquema de trabajo	78
<b>10.2</b> Población estudiada	79
<b>10.2.1</b> Criterios de inclusión y exclusión	79
<b>10.3</b> Perfil clínico	80
<b>10.4</b> Extracción de DNA, cuantificación y prueba de integridad	83
<b>10.4.1</b> Extracción de DNA	83
<b>10.4.2</b> Cuantificación de DNA y medición de su integridad	84
<b>10.5</b> Técnica de microarreglos	85
<b>10.6</b> Análisis bioinformático	91
<b>11.</b> Resultados	93
<b>11.1</b> Evaluación del perfil clínico en la población de estudio	94
<b>11.2</b> Obtención del DNA en condiciones de integridad y pureza	100
<b>11.3</b> Perfil metilómico en la población de estudio	102
<b>11.3.1</b> Análisis exploratorio	103
<b>11.3.2</b> Análisis diferencial	109



<b>11.3.3</b> Análisis biológico	113
<b>12.</b> Discusión de resultados	121
<b>13.</b> Conclusiones	153
<b>14.</b> Perspectivas	155
Referencias	157
Anexos	180

# ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla No. 1</b> Periodos críticos del desarrollo embrionario y fetal	11
<b>Tabla No. 2</b> Resumen de las fases maternas, anabólica y catabólica, del embarazo	16
<b>Tabla No. 3</b> Ganancias de peso total para mujeres con embarazos simples en las normas del Institute of Medicine (IOM) de 2009	25
<b>Tabla No. 4</b> Composiciones de 100 mL de calostro y leche madura	44
<b>Tabla No. 5</b> Criterios de inclusión y de exclusión para los grupos control (GC) y problema (GP)	79
<b>Tabla No. 6</b> Formato de criterios cuantitativos de evaluación durante el embarazo	80
<b>Tabla No. 7</b> Formato de criterios cualitativos de evaluación durante el embarazo	82
<b>Tabla No. 8</b> Formato de criterios cuantitativos de la evaluación del niño	82
<b>Tabla No. 9</b> Formato de criterios cualitativos de la evaluación del niño	83
<b>Tabla No. 10</b> Criterios cuantitativos de evaluación durante el embarazo	94
<b>Tabla No. 11</b> Criterios cualitativos de evaluación durante el embarazo	97
<b>Tabla No. 12</b> Criterios cuantitativos de la evaluación del niño	98
<b>Tabla No. 13</b> Criterios cualitativos de la evaluación del niño	99
<b>Tabla No. 14</b> Cuantificación espectrofotoscópica de DNA extraído de cinco muestras de sangre periférica	101
<b>Tabla No. 15</b> Cuantificación espectrofotoscópica de DNA extraído de dos muestras de sangre periférica	102
<b>Tabla No. 16</b> Genes con ganancia de metilación en niños expuestos a preeclampsia y obesidad materna durante su gestación	115
<b>Tabla No. 17</b> Genes con pérdida de metilación en niños expuestos a preeclampsia	

y obesidad materna durante su gestación	116
<b>Tabla No. 18</b> Genes con ganancia o pérdida de metilación ubicados en zonas de regulación de la expresión génica en niños expuestos a preeclampsia y obesidad materna durante su gestación	117
<b>Tabla No. 19</b> Mecanismos de transporte de nutrimentos a través de la placenta	136

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura No. 1</b> Línea del tiempo de los primeros mil días	10
<b>Figura No. 2</b> Adaptaciones fetales a la malnutrición	21
<b>Figura No. 3</b> Principales causas de morbilidad materna en México	24
<b>Figura No. 4</b> Fisiología de la placenta y el tejido adiposo en la obesidad durante el embarazo	31
<b>Figura No. 5</b> Modelo integrado de la patofisiología compleja de la preeclampsia	38
<b>Figura No. 6</b> Periodos críticos en los dominios del desarrollo infantil temprano	47
<b>Figura No. 7</b> Distribución de los sitios CpG en genomas de mamíferos	60
<b>Figura No. 8</b> Influencia de la genética y del medio ambiente en la salud del individuo	61
<b>Figura No. 9</b> Modificaciones epigenéticas mediadas por los componentes de la dieta	62
<b>Figura No. 10</b> Dinámica de la metilación del DNA durante el desarrollo humano embrionario y fetal	64
<b>Figura No. 11</b> Resumen de los genes que mostraron expresión alterada en asociación con la metilación del DNA	72
<b>Figura No. 12</b> Conversión de DNA con bisulfito de sodio	87
<b>Figura No. 13</b> Extensión y tinción para los dos tipos de ensayos que contiene el chip “Infinium Human Methylation 450 BeadChip” de Illumina®	89
<b>Figura No. 14</b> Sitios CpG que son evaluados en el Infinium Human Methylation 450 BeadChip” de Illumina®	90
<b>Figura No. 15</b> Gel de electroforesis de agarosa al 1%, que muestra la integridad	

del DNA extraído de las cinco muestras de sangre periférica	100
<b>Figura No. 16</b> Gel de electroforesis de agarosa al 1%, que muestra la integridad del DNA extraído de las dos muestras que se habían degradado en la extracción anterior	101
<b>Figura No. 17</b> Perfiles de distribución de la metilación de DNA entre GC y GP	104
<b>Figura No. 18</b> Variación en el perfil de metilación de DNA entre niños productos de embarazo normoevolutivo y niños expuestos a preeclampsia y obesidad durante el embarazo	106
<b>Figura No. 19</b> Comparación de los valores promedio de Beta por sitio CpG entre Grupos	108
<b>Figura No. 20</b> Sitios CpG que presentaron pérdida o ganancia de metilación significativa en el GP	110
<b>Figura No. 21</b> Sitios CpGs con cambios significativos de metilación en los grupos de estudio	112
<b>Figura No. 22</b> Frecuencias de ubicación de los sitios CpG con metilación diferencial significativa en islas CpG y regiones flanqueantes, en el metiloma	113
<b>Figura No. 23</b> Regiones génicas en las que se encuentran los sitios CpG con metilación diferencial significativa	114
<b>Figura No. 24</b> Ontología asociativa con las vías de señalización de mayor número de genes encontrados a través de la metilación diferencial	119
<b>Figura No. 25</b> Ontología asociativa con las patologías de mayor cantidad de genes encontrados en la metilación diferencial	120
<b>Figura No. 26</b> Las vías epigenéticas directa e indirecta	129
<b>Figura No. 27</b> Vías de metilación del DNA	131
<b>Figura No. 28</b> Vías activas de desmetilación del DNA	133
<b>Figura No. 29</b> Estructura de la placenta	135

**1.**

Resumen

En México, una de cada cinco mujeres sufre complicaciones durante el embarazo. Las causas principales de morbilidad materna son: preeclampsia (70.8%), hemorragia (11.7%), eclampsia (6.3%), sepsis (3.6%), etc. La obesidad es un factor de riesgo para la presencia de preeclampsia, siendo tres veces más común en mujeres con obesidad. La prevalencia de obesidad en el embarazo oscila entre el 11 y el 22%. Existen pocas referencias acerca de los criterios que definen un embarazo normal, y las variables que lo diferencian de uno que cursa con complicaciones. Además, hay pocas fuentes que proporcionan información estadística sobre la morbilidad obstétrica aguda o crónica. Estos trastornos durante el embarazo tienen un serio impacto en la salud de los recién nacidos, ya que la exposición a diversos factores ambientales (extrínsecos e intrínsecos) durante los estadios prenatal y postnatal tempranos son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades complejas. Las marcas epigenéticas son candidatos etiológicos para el desarrollo de enfermedades complejas mediante la regulación de los procesos de programación fetal y plasticidad del desarrollo. La metilación del DNA es una marca epigenética utilizada por las células para controlar la expresión génica y tiene una importante participación en el desarrollo de los mamíferos. En este trabajo, se muestra un estudio piloto del análisis del perfil metilómico de DNA de sangre total de niños menores de tres años de edad, que estuvieron expuestos a preeclampsia y obesidad durante el embarazo. Para ello, se diseñó una lista de criterios cuantitativos y cualitativos para evaluar las condiciones durante el embarazo y del niño menor de tres años de edad, y se utilizó para clasificar las muestras en el grupo de control: embarazo normal (GC) o grupo problema: preeclampsia y obesidad durante el embarazo (GP). El método de evaluación utilizado para el perfil de metilación fue la modificación del DNA con bisulfito de sodio y el análisis de microarreglos de metilación (Infinium Human Methylation 450K BeadChip®). El análisis bioinformático se realizó utilizando GenomeStudio y Partek Genomics Suite. Los resultados mostraron que los criterios cuantitativos de evaluación durante el embarazo son los mejores indicadores de clasificación en grupos. Además, se encontraron diferencias en el perfil de metilación del DNA entre el GP y el GC. 213 sitios GpG mostraron una diferencia significativa de metilación. Las diferencias encontradas están específicamente relacionadas con la metilación de regiones génicas no asociadas con islas CpG. Asimismo, estas diferencias están implicadas en vías de señalización y patologías metabólicas, hipertensivas e inmunológicas, lo que sugiere que el entorno prenatal al que se exponen los niños da un fenotipo característico. Se propone que la preeclampsia y la obesidad durante el embarazo actúan como ambientes adversos para el desarrollo embrionario y fetal, ejerciendo modificaciones en la metilación del DNA. La metilación anormal del DNA está mediada por alteraciones sistémicas tales como cantidad, calidad y distribución de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia y ambiente inflamatorio; sin embargo, se deben realizar más estudios para confirmar estos hallazgos. Las consecuencias que estas condiciones pueden tener sobre la salud del niño aún no se han dilucidado completamente. Los estudios del metiloma en la infancia temprana son necesarios para comprender los factores etiológicos relacionados con las enfermedades complejas que se desarrollan en la edad adulta y que podrían ser programadas en etapas tempranas durante la exposición prenatal a condiciones ambientales adversas.

2.

Abstract



One in five women suffer complications during pregnancy in Mexico. The main causes of maternal morbidity are: preeclampsia (70.8%), hemorrhage (11.7%), eclampsia (6.3%), sepsis (3.6%), and others. Obesity is a risk factor for the presence of preeclampsia, being three times more common in women with obesity than in women with normal weight. The prevalence of obesity in pregnancy has ranges from 11 to 22%. In general, there are very few references to the criteria that define a normal pregnancy, and the variables that differentiate it from one with complications. Additionally, there are few sources that provide statistical information on acute or chronic obstetric morbidity, which does not lead to death, but can have consequences on life quality. These disorders during pregnancy have a serious impact on the health of newborns so that, exposures to various environmental factors (extrinsic and intrinsic) during early prenatal and postnatal stages are risk factors for the development of chronic diseases. Epigenetic factors (like DNA methylation and histone modifications) are etiological candidates for chronic diseases development through the regulation of fetal programming and developmental plasticity processes. DNA methylation is a heritable epigenetic mark used by the cells to control gene expression and it has an important participation in mammalian development. Here, it is shown a pilot study heading for the analysis of DNA methylome profiles from whole blood of children below three years old that faced both preeclampsia and obesity during pregnancy as adverse maternal conditions. For this, a list of quantitative and qualitative criteria was designed to evaluate the conditions during pregnancy and the born child below three years old, and it was used to classify the samples on the control group: normal pregnancy (CG), or problem group: preeclampsia and obesity during pregnancy (PG). The assessing method used for the methylation profiling was the DNA modification with sodium bisulfite and methylation microarray chip analysis (Infinium Human Methylation 450K BeadChip of Illumina®). Bioinformatic analysis was performed using GenomeStudio and Partek Genomics Suite softwares. The results showed that the quantitative criteria of evaluation during pregnancy are the best classifying indicators in groups. Additionally, differences in the DNA methylation profile were found in whole blood cells of the PG, compared with the CG. 213 CpG sites showed a significant differential methylation. The differences found are specifically related to the methylation of gene regions not associated with CpG islands. Likewise, these differences are implicated in metabolic, hypertensive and immune related signaling pathways and pathologies, suggesting that the prenatal environment that the children were exposed gives a characteristic phenotype. It is proposed that preeclampsia and obesity during pregnancy act as adverse environments for embryonic and fetal development, exerting modifications in DNA methylation. Abnormal DNA methylation is mediated by systemic alterations in both complications, such as amount, quality and distribution of nutrients, oxidative stress, hypoxia and inflammatory environment. Further studies should be conducted to confirm these findings. The consequences that this conditions may have on the child's health are yet to be elucidated. The studies of methylome at early childhood are strongly necessary to understand the etiological factors related to chronic diseases that develop in adulthood and that could be early programmed during prenatal exposure to adverse environmental conditions.

**3.**

Introducción

La vida de un individuo comienza desde la fertilización, ya que durante el desarrollo embrionario y el fetal ocurren mecanismos moduladores de la formación y la maduración de órganos y tejidos, confiriendo a la etapa de gestación un gran impacto, aún después del nacimiento. “Los primeros mil días de vida” en el individuo es el periodo de tiempo que abarca desde el momento de la fertilización hasta los dos años de vida, término que está tomando cada vez mayor importancia (Horton, 2008). Este espacio de tiempo representa gran parte de los momentos más relevantes en la vida de un individuo, por ser una ventana crítica en el desarrollo para el resto de su vida y que brinda una oportunidad única para obtener los beneficios nutricionales e inmunológicos que se necesitarán en la etapa adulta. Los daños que se generen durante estos primeros 1000 días tendrán consecuencias irreversibles en el individuo, por lo que la prevención es fundamental.

La teoría del DOHaD (por sus siglas en inglés, “Developmental Origins of Health and Disease”) propone que el riesgo de desarrollar enfermedades complejas está influenciado profundamente por ciertas exposiciones ambientales durante el periodo intrauterino y posnatal (Barker, 1997). Las exposiciones o estímulos ambientales pueden darse en periodos clave del desarrollo produciendo cambios permanentes en la estructura y la función del organismo (fenotipo); proceso conocido como la programación fetal. Los periodos periconcepcionales, intrauterinos y posnatales son los de mayor influencia en la programación. Este periodo también cubre procesos vitales como la gametogénesis, la fecundación, la implantación, la morfogénesis, la embriogénesis, la organogénesis y la placentación los cuales, tienen una influencia profunda sobre el crecimiento, el desarrollo, la distinción y el fenotipo de un individuo, incluyendo la susceptibilidad para desarrollar enfermedades complejas. Si el ambiente gestacional no es ideal se podría llevar una programación no deseada e inducir el riesgo a desarrollar enfermedades en la etapa adulta (Vickers, 2014).

En la actualidad, existe una evidencia creciente que posiciona a la nutrición como un factor ambiental que tiene incidencia en diversas enfermedades tanto crónicas como autoinmunes. El efecto se inicia a nivel epigenético durante el desarrollo embrionario y fetal, debido a que la nutrición de la madre afecta el crecimiento del feto y de igual forma impacta en el desarrollo durante la infancia (Pantoja, 2015).

El genoma del embrión contiene toda la información para desarrollarse en un nuevo individuo. Los procesos que vinculan al genotipo y fenotipo durante el nacimiento se

describen como epigenéticos. La epigenética investiga las bases moleculares en la regulación del flujo de la información, involucrando el gen, la expresión y la función. Actualmente, existen tres mecanismos involucrados en este proceso: 1) la metilación del DNA; 2) las modificaciones químicas de histonas y alteraciones de la estructura de la cromatina, y 3) los RNA no codificantes (Yajnik, 2014).

En el presente trabajo, se desarrolló un estudio piloto que evaluó el perfil metilómico de un grupo de individuos mexicanos en la etapa posnatal temprana, que durante la gestación fueron expuestos a preeclampsia y obesidad materna como condiciones adversas durante el embarazo. El perfil metilómico de este grupo fue comparado con individuos producto de embarazos normoevolutivos. De los resultados obtenidos de las variaciones de metilación entre los grupos de estudio, se realizaron las pruebas para determinar el diferencial genético y tratar de encontrar posibles asociaciones antropométricas y metabólicas maternas.

La importancia de este trabajo es que expone la teoría de DOHaD en México, pues, a pesar de ser una línea de investigación reciente en todo el mundo, a nivel nacional no se ha desarrollado ampliamente. A su vez, contribuye al establecimiento de criterios claves para la definición del embarazo normoevolutivo, con base en parámetros en la población mexicana y evidencia la urgencia de completar los estudios epidemiológicos en complicaciones del embarazo teniendo un conocimiento mayor de las condiciones que influyen durante los primeros 1000 días de vida. Adicionalmente, dicta la metodología que se debe seguir para el análisis de microarreglos de metilación, una técnica novedosa, robusta y aún no muy explorada. Marca las bases para estudios posteriores de metilación con poblaciones más grandes y mejor control de las variables implicadas. Por último, propone al perfil de metilación como un marcador molecular, por su posible asociación con el desarrollo de enfermedades complejas y que, con base a los hallazgos obtenidos y por obtener, se puedan guiar y desarrollar políticas públicas relacionadas con el desarrollo óptimo de los individuos durante las etapas prenatal y posnatal temprana.

# 4.

El embarazo  
y los  
primeros  
dos años de  
vida

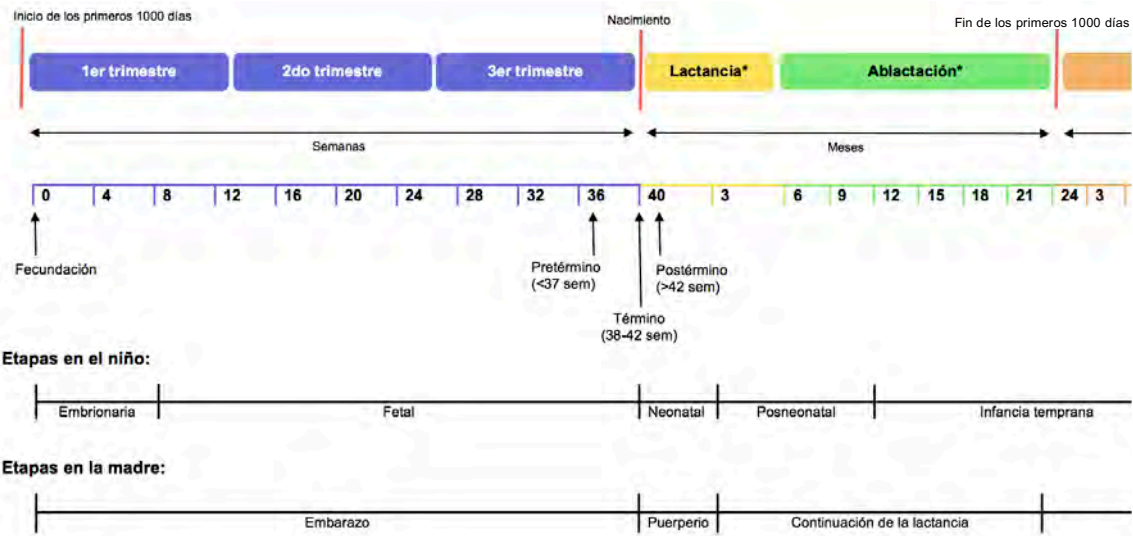
El embarazo es el estado fisiológico de la mujer que se inicia con la fecundación, el desarrollo del embrión y el feto en su útero, y termina con el parto y el nacimiento del producto a término (Secretaría de Salud, 2016).

El embarazo dura alrededor de 40 semanas, o 9 meses, medido desde el último periodo menstrual hasta el nacimiento, seguido de otras etapas importantes, como se muestra en la **Figura No. 1**. Generalmente, el embarazo se divide en tres trimestres:

**Primer trimestre (semana 1 a semana 12):** los eventos que llevan al embarazo comienzan con la fecundación. El cigoto después viaja a través de las trompas uterinas de la mujer, donde se implanta en la pared uterina. El cigoto está compuesto por un conjunto de células que forman el embrión y la placenta.

**Segundo trimestre (semana 12 a semana 28):** a las 16 semanas se puede conocer el sexo biológico del producto. Se ha formado el tejido muscular, óseo y de la piel. A la semana 20, la madre puede comenzar a sentir el movimiento del producto. A las 24 semanas, el feto duerme y despierta regularmente. La tasa de supervivencia para nacidos a las 28 semanas es del 92%, aunque se observan complicaciones serias en la salud.

**Tercer trimestre (semana 29 a semana 40):** a las 32 semanas, los huesos son suaves y se encuentran formados casi en su totalidad, y los ojos pueden abrir y cerrarse. Los nacidos antes de 37 semanas son considerados pretérmino. Los niños que nacen entre la semana 37 y 38 del embarazo se consideran de término temprano, y los que nacen a las 39 semanas o después, que se consideran de término completo. Los niños que nacen a las 41 semanas a 41 semanas 6 días se consideran de término tardío, y los que nacen después de 42 semanas se consideran postérmino (Department of Health and Human Services, 2010) (Spong, C. Y., 2013).



**Figura No. 1** Línea del tiempo de los primeros mil días. Términos relacionados con las distintas etapas del embarazo, y las etapas después del nacimiento, hasta los 2 años de edad, en el niño y la madre. Las etapas compartidas por ambos, se indican con un asterisco (\*). Modificado de Brown (2014).

## 4.1 FISIOLÓGÍA Y EVOLUCIÓN DEL EMBARAZO

La fertilización es el momento que marca el inicio de la vida. Para que pueda ocurrir, es necesario que los gametos tengan madurez morfológica, funcional y bioquímica, y que se reúnan en el lugar y el momento apropiados. El resultado de la fertilización es una célula, el cigoto, cuyas características, aunque proviene de los padres, son nuevas e irrepetibles, lo cual confiere al nuevo ser su individualidad y le permite iniciar su desarrollo hasta convertirse en un organismo multicelular.

Adicionalmente, se logran los siguientes eventos:

- La reanudación y terminación de la segunda división meiótica del ovocito, lo que resulta en un óvulo.
- El restablecimiento del número diploide de cromosomas (46).
- La determinación genética del género: femenino, si el espermatozoide presentaba el cromosoma sexual X, o masculino, si portaba el cromosoma Y.

- La anfimixis (mezcla de los cromosomas maternos y paternos), dando lugar a un ser único, ya que la recombinación genética ocurrida durante la meiosis origina cromosomas diferentes a los de los padres.
- Formación del huevo o cigoto.
- Reactivación metabólica del huevo que permite la segmentación y la formación inicial del embrión (Arteaga, 2013).

El crecimiento y desarrollo fetales ocurren de acuerdo a patrones genéticos en que las células están programadas para multiplicarse, diferenciarse y establecer niveles funcionales a largo plazo durante intervalos establecidos, conocidos como periodos críticos o sensibles (Brown, 2014). En la **Tabla No. 1** se muestran los periodos críticos del desarrollo embrionario y fetal.

**Tabla No. 1** Periodos críticos del desarrollo embrionario y fetal

Periodo	Edad	Rasgos internos y externos
Embrionario presomático	Día 1	Fertilización; comienza etapa de segmentación y surge el cigoto. Después de 24 horas, se obtienen dos células denominadas blastómeros.
	Días 2-3	Se forman 16-32 células (mórula) que ingresan en la cavidad uterina
	Días 4-5	La mórula se llena de líquido y su nombre cambia a blastocisto, que se compone de 250 células.
	Día 6	Unión del blastocisto al endometrio.
	Día 7-12	Estadio de embrión bilaminar, se implanta en la pared uterina, donde se acumula glucógeno. Saco vitelino primario; se forma la circulación uteroplacentaria.
	Día 17	Estadio de embrión trilaminar con línea primitiva, que establece la polaridad del embrión; formación de ectodermo,



		mesodermo y endodermo; comienza el desarrollo de vasos sanguíneos intraembrionarios.
Embrionario somítico (etapa de organogénesis)	21 a 28 días	0.5 cm de longitud; presencia de cabeza, tronco y brazos rudimentarios; inicio del latido cardiaco; se observa médula espinal y dos lóbulos cerebrales principales; formación de los surcos ópticos, presencia de los dos primeros arcos faríngeos; incurvamiento del embrión.
	28 a 35 días	Riñones, hígado, sistema circulatorio, ojos, oídos, boca, manos, brazos y tracto gastrointestinal rudimentarios; el corazón late 65 veces por minuto; formación de arcos faríngeos 3 y 4; aparición de esbozos de miembros superiores y cola.
	35 a 49 días	Desarrollo de las placas de manos y pies, seno urogenital primario, fosas nasales prominentes, evidencia de hemisferios cerebrales, pigmentos visibles en retina, desarrollo de prominencias auriculares, formación de labio superior y surco naso lagrimal; elongación y enderezamiento del tronco, inicio de la herniación del intestino medio hacia el cordón umbilical.
	49 a 56 días	1.25 cm de longitud; peso de 2 a 3 g; el cerebro envía impulsos; el tracto gastrointestinal produce enzimas; el hígado produce eritrocitos; dedos de manos y pies visibles, pero con membranas interdigitales; degeneración del membranas anal y urogenital; genitales externos indiferenciados.
	Semana 8	Los ojos convergen y aparecen las cejas, la cola desaparece y se libera orina al líquido amniótico; recanalización de la luz del tubo digestivo, tubos pulmonares adoptan aspecto granuloide; diafragma completo; inicia primera osificación del esqueleto; cayado aórtico adopta forma definitiva.

Fetal	Semana 9	Se desarrolla el cuello y la barbilla se separa del tórax; los párpados se juntan y fusionan; deglución del líquido amniótico; comienza la succión del pulgar y la prensión; se producen los primeros movimientos musculares; la hipófisis produce ACTH y gonadotropina; la corteza suprarrenal produce corticoides. Al embrión ahora se le considera feto.
	Semana 10	Los genitales externos son distintos en cada sexo; los párpados están fusionados; se secreta bilis; se establecen islotes hematopoyéticos en el bazo; hipófisis produce prolactina; la epidermis tiene tres capas.
	Semana 11	La musculatura del estómago se puede contraer y comienza la absorción intestinal; los linfocitos T emigran hacia la corriente sanguínea.
	Semana 12	La cabeza está erguida, y el cuello casi recto y bien definido, el oído externo adopta su forma; comienza expulsión de meconio; los ovarios descienden por debajo del reborde pélvico; se produce hormona paratiroidea.
	Mes 4	Pesa cerca de 180 g; piel delgada; formación de vesícula seminal; aparecen surcos transversos en superficie dorsal del cerebelo; se produce bilis en el hígado; comienza a formarse el escroto y a acumularse grasa parda en el cuerpo; comienza hematopoyesis en médula ósea.
	Mes 5	Pesa cerca de 450 g y mide 27 cm de longitud; depósito de vernix caseoso en la piel; el abdomen se empieza a llenar; casi todo el cuerpo está cubierto de lanugo; comienza la mielinización de la médula espinal; glándulas sebáceas comienzan a funcionar; los testículos comienzan a descender. Se alcanza la viabilidad fetal.
	Mes 6	35 cm de longitud; detección de olor y gusto; se empieza a secretar surfactante; pulmones,

		tracto gastrointestinal y riñones están formados
	Mes 7	Aumenta de 15 a 30 g por día; párpados comienzan a abrirse, comienzan movimientos respiratorios; comienzan a aparecer surcos y circunvoluciones en el cerebro; los testículos han descendido al escroto; termina la eritropoyesis en hígado y bazo.
	Mes 8	Crece cerca de 30 g por día; los ojos presentan reflejo fotomotor, los testículos entran al escroto; almacenamiento de grasa blanca, glucógeno, hierro, folato, calcio, magnesio, vitaminas A, E, D, B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> y riovflavina; las funciones de los órganos continúan su desarrollo.
	Mes 9	El índice de crecimiento disminuye cerca del término; la mayor parte del lanugo se elimina; piel cubierta de vérnix caseoso; se secretan mayores cantidades de surfactante; empieza la mielinización del cerebro; existe 1 L de líquido amniótico; la placenta pesa unos 500 g.

Modificado de Brown (2014), Arteaga (2013) y Carlson (2014).

#### 4.1.1 LAS FASES ANABÓLICA Y CATABÓLICA DE LA MUJER EMBARAZADA

El desarrollo embrionario desencadena miles de cambios biológicos complejos y secuenciados que transforman dos células unidas en un individuo. La rapidez con la que estas estructuras y funciones fetales se desarrollan en la madre y la naturaleza crítica de las necesidades de energía y nutrimentos, hacen de la nutrición materna un factor clave para la reproducción exitosa.

Los cambios en la composición y función del cuerpo materno ocurren en secuencias específicas durante el embarazo. El orden de esta secuencia es absoluto porque la terminación exitosa de cada cambio depende del anterior. Ya que los cambios fisiológicos maternos dan lugar al crecimiento y desarrollo fetal, comienzan formalmente una semana después de la fertilización (Brown, 2014).

Para proveer al feto de suficiente energía, nutrimentos y oxígeno para el crecimiento, la madre primero debe expandir el nivel de plasma en circulación. Después, las reservas de nutrimentos maternos se acumulan. Estas reservas se establecen en avance del tiempo que serán necesitadas para sostener el gran crecimiento fetal. Esta secuencia de eventos asegura que la placenta esté completamente preparada para el alto nivel de funcionamiento que será necesitado mientras el crecimiento fetal aumenta rápidamente. El feto depende del funcionamiento de múltiples sistemas bien establecidos, con anticipación de la máxima capacidad de crecimiento y desarrollo.

Los cambios fisiológicos en el embarazo se pueden dividir en dos grupos básicos: los que ocurren en la primera mitad del embarazo y los de la segunda mitad. En general, los cambios fisiológicos en la primera mitad se consideran "materno-anabólicos", ya que construyen la capacidad del cuerpo de la madre para entregar cantidades relativamente grandes de sangre, oxígeno, y nutrimentos al feto en la segunda mitad del embarazo. En el segundo periodo de tiempo ocurren cambios "materno-catabólicos", en los que la energía y las reservas de nutrimentos, y la acentuada capacidad para entregar la energía y los nutrimentos almacenados al feto predominan. Aproximadamente, el 10% del crecimiento fetal se lleva a cabo en la primera mitad del embarazo, y el 90% restante se produce en la segunda mitad (Brown, 2014). Los cambios que ocurren en ambas fases se pueden observar en la **Tabla No. 2**.

**Tabla No. 2** Resumen de las fases maternas, anabólica y catabólica, del embarazo

Fase Materno-anabólica (0-20 semanas)	Fase Materno-catabólica (20+ semanas)
Expansión del volumen sanguíneo, incremento del rendimiento cardiaco	Movilización de las reservas de lípidos y nutrimentos
Aumento en las reservas de lípidos, nutrimentos y glucógeno hepático	Incremento en la producción y niveles sanguíneos de glucosa, TAGs y ácidos grasos
Crecimiento de algunos órganos maternos	Disminución en las reservas de glucógeno hepático
Incremento en el apetito y la ingesta de alimentos (balance calórico positivo)	Apetito e ingesta de alimentos disminuyen un poco cerca del término del parto
Disminución en la tolerancia al ejercicio	Metabolismo en ayuno acelerado
Aumento en los niveles de hormonas anabólicas	Aumento en los niveles de hormonas catabólicas

Modificado de Brown (2014).

Los cambios fisiológicos que normalmente ocurren durante el embarazo se muestra a continuación:

<p><b>Expansión del volumen sanguíneo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento en volumen de sangre (20%)</li> <li>• Aumento en volumen de plasma (50%)</li> <li>• Edema (60-75% de las mujeres)</li> </ul>	<p><b>Hemodilución</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuye la concentración de la mayoría de las vitaminas y minerales en sangre</li> </ul>	<p><b>Niveles sanguíneos de lípidos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento en las concentraciones de TAGs, colesterol, y colesterol LDL y HDL</li> </ul>	<p><b>Niveles sanguíneos de glucosa</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento en la resistencia a insulina</li> <li>• Incremento en niveles plasmáticos de glucosa e insulina</li> </ul>
<p><b>Aumento en tamaño de órganos y tejidos maternos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corazón, tiroides, hígado, riñones, útero, mamas y tejido adiposo</li> </ul>	<p><b>Sistema Circulatorio</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en el rendimiento cardiaco (30-50%)</li> <li>• Incremento en el ritmo cardiaco (16%)</li> <li>• Disminución de la presión sanguínea en la primer mitad del embarazo (-9%)</li> </ul>	<p><b>Sistema Respiratorio</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en el volumen corriente o tidal (30-40%)</li> <li>• Incremento en el consumo de oxígeno (10%)</li> </ul>	<p><b>Ingesta de alimentos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento en apetito e ingesta de alimentos. Ganancia de peso</li> <li>• Cambios en sentido de gusto y olfato</li> <li>• Aumento en consumo de líquidos</li> </ul>

Cambios gastrointestinales	Cambios en riñones	Sistema inmune	Metabolismo basal	Hormonas
<ul style="list-style-type: none"><li>• Relajación del tono muscular del tracto gástrico</li><li>• Incremento en tiempo de tránsito gástrico e intestinal</li><li>• Náuseas (70%) y vómito (40%)</li><li>• Acidez estomacal</li><li>• Constipación</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Incremento en Tasa de Filtración Glomerular (50-60%)</li><li>• Aumento en la conservación de Na<sup>+</sup></li><li>• Aumento en el riesgo de infecciones urinarias</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inmunidad suprimida</li><li>• Aumento en el riesgo de infecciones del tracto reproductivo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Incremento en la tasa metabólica basal durante la segunda mitad del embarazo</li><li>• Incremento de la temperatura basal</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Secreción de gran cantidad de hormonas placentarias necesarias para soportar los cambios fisiológicos durante el embarazo</li></ul>

Modificado de Brown (2014).

Los ajustes en el metabolismo de los nutrientes de la madre son evidentes dentro de las primeras semanas después de la concepción y progresan con el embarazo (King, 2000). Muchos de los ajustes se encuentran encaminados a asegurar que los nutrientes estarán disponibles para el feto durante los períodos de alta necesidad (Brown, 2014).

## 4.2 LA REGULACIÓN METABÓLICA DURANTE EL EMBARAZO

Los nueve meses de embarazo representan el periodo más intenso de crecimiento y desarrollo que el ser humano experimenta. Lo bien que estos procesos resulten depende de muchos factores, siendo la mayoría de ellos modificables. De estos factores que afectan el crecimiento y desarrollo fetal, el que más sobresale es la nutrición. No existe otra etapa en la vida en la que existan beneficios más obvios de una nutrición óptima que durante el embarazo (Brown, 2014).

### 4.2.1 LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES MATERNO-AMBIENTALES EN LA REGULACIÓN METABÓLICA

Durante mucho tiempo se ha sabido que la dieta de la madre y el suministro de nutrientes para el embrión o feto, son de los principales factores ambientales que influyen en el desarrollo del mismo. Un suministro fiable y equilibrado de aminoácidos, lípidos y carbohidratos debe ser compatible con las altas tasas de proliferación celular y

los procesos clave de desarrollo que tienen lugar durante las etapas embrionarias y fetales de la vida (Maloney, 2005). El intercambio de nutrientes entre la madre y el feto, así como la regulación de la velocidad de paso de los mismos, dentro y fuera de la circulación fetal, son funciones de la placenta, órgano extraembrionario que, además, produce hormonas y enzimas y elimina los desechos del feto (Brown, 2014).

Las necesidades nutricionales del feto están impulsadas por secuencias genéticamente programadas de crecimiento y desarrollo hástico. La cantidad y tipos de nutrientes que se requieren dependen del tipo y cantidad que se necesitan para que funcionen las vías metabólicas específicas y para que se desarrollen las estructuras fetales. Debido a que el crecimiento y desarrollo normales del tejido fetal están genéticamente cronometrados, los nutrientes deben estar disponibles cuando se expresen los genes que controlan el crecimiento y desarrollo fetales (Georgieff, 2007).

Durante el embarazo se presentan muchos ajustes en el metabolismo de los carbohidratos, mismos que promueven la disponibilidad de glucosa por parte del feto. La glucosa es el combustible por excelencia para el feto. La disponibilidad continua de un aporte fetal de glucosa se logra mediante cambios metabólicos que promueven la resistencia materna a la insulina. Estos cambios se conocen como efecto diabetogénico del embarazo, y ocasionan que, en condiciones normales, la mujer embarazada presente una ligera intolerancia a los carbohidratos en el tercer trimestre del embarazo (Brown, 2014).

El metabolismo de los carbohidratos en la primera mitad del embarazo se caracteriza por incremento en la producción de insulina estimulada por estrógenos y progesterona, y conversión de glucosa a glucógeno y a grasa. En la segunda mitad, la elevación de los valores de somatotropina coriónica humana (hCS) y prolactina inhibe la conversión de glucosa a glucógeno y grasa. Al mismo tiempo, la resistencia a la insulina produce en la madre aumento de la dependencia a las grasas para obtención de energía. Estas condiciones ayudan a garantizar la disponibilidad de un aporte constante de glucosa para el crecimiento y desarrollo fetales en la segunda mitad del embarazo (Rosso, 1990).

Respecto al metabolismo proteico, cantidades mayores de nitrógeno y proteínas son necesarias durante el embarazo para la síntesis de nuevos tejidos maternos y fetales. El mayor requerimiento se cubre en cierta medida mediante la reducción de los niveles de

excreción de nitrógeno y la conservación de aminoácidos para la síntesis de proteínas. Sin embargo, no hay evidencia de que el cuerpo de la madre almacene proteínas al principio del embarazo para satisfacer las necesidades fetales más adelante. Los requerimientos maternos y fetales de proteínas se cubren con el consumo de la madre durante el embarazo (Brown, 2014).

Durante el embarazo suelen ocurrir numerosos cambios en la utilización corporal de grasas. En conjunto, los cambios en el metabolismo de los lípidos promueven la acumulación de depósitos de grasa maternos en la primera mitad del embarazo, y mejoran su movilización en la segunda mitad (Godfrey, 1998). Además, dada la mayor dependencia materna de depósitos de grasa para obtener energía a medida que avanza el embarazo, se observa que los niveles sanguíneos de muchas lipoproteínas aumentan en forma drástica. El aumento en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos ocurre primero y es el más pronunciado, al término equivale a tres veces los niveles de mujeres no embarazadas. También se elevan las lipoproteínas del colesterol, los fosfolípidos y los ácidos grasos. La placenta utiliza el mayor aporte de colesterol para lograr la síntesis de hormonas esteroideas, y el feto lo aprovecha para la formación de nervios y membranas celulares (Butte, 2000).

De igual forma, ocurren cambios notables en el metabolismo de los minerales. El metabolismo del calcio se caracteriza por mayor índice de recambio y producción de hueso nuevo. La elevación de los niveles de agua corporal y síntesis de tejidos durante el embarazo se acompaña de mayores requerimientos de sodio y otros minerales. El metabolismo del sodio guarda un delicado equilibrio durante el embarazo, para promover la acumulación de este mineral por parte de la madre, la placenta y el feto. Esto se logra mediante cambios en los riñones que aumentan la secreción de aldosterona y la retención de sodio (Brown, 2014).

En experimentos en modelos animales, la desnutrición materna al momento de la fecundación lleva a una menor cantidad de células en la masa celular interna, que se asocia con peso al nacer y crecimiento posnatal reducidos, radios órgano/peso corporal alterados y el desarrollo de hipertensión (Kwong, 2000). Una mejor nutrición perinatal se asocia con una elevada trayectoria de crecimiento fetal, que se establece en la gestación temprana, cuando los requerimientos absolutos del feto son bajos. Una trayectoria de crecimiento más rápida lleva a un incremento en la demanda de nutrimentos en partes



posteriores de la gestación, cuando los requerimientos son relativamente más grandes, y se reduce la capacidad de reserva de la placenta. La habilidad del feto para mantener el crecimiento durante un periodo de desnutrición depende del ritmo de crecimiento previo, ya que los fetos que crecen a mayor velocidad, con un mayor requerimiento de nutrimentos, son menos capaces de mantener el crecimiento en estas condiciones. Los hombres crecen más rápido que las mujeres, y por lo tanto, tienen menos capacidad de resistir la desnutrición (Harding, 1992).

El feto humano es capaz de adaptarse a la malnutrición. Sus respuestas incluyen cambios metabólicos, redistribución del flujo sanguíneo y cambios en la producción de hormonas fetales y de la placenta que controlan el crecimiento. La respuesta metabólica inmediata a la desnutrición es el catabolismo: consumir sus propios sustratos para obtener energía (Barker, 2001). El feto protege los tejidos que son importantes para la supervivencia inmediata, especialmente el cerebro, disminuyendo la velocidad de crecimiento. La redistribución del flujo sanguíneo es una forma en la que el cerebro puede ser protegido. En los humanos, esto puede tener costos exagerados para otros tejidos, como el hígado y otras vísceras, debido al gran tamaño del cerebro (Rudolph, 1984).

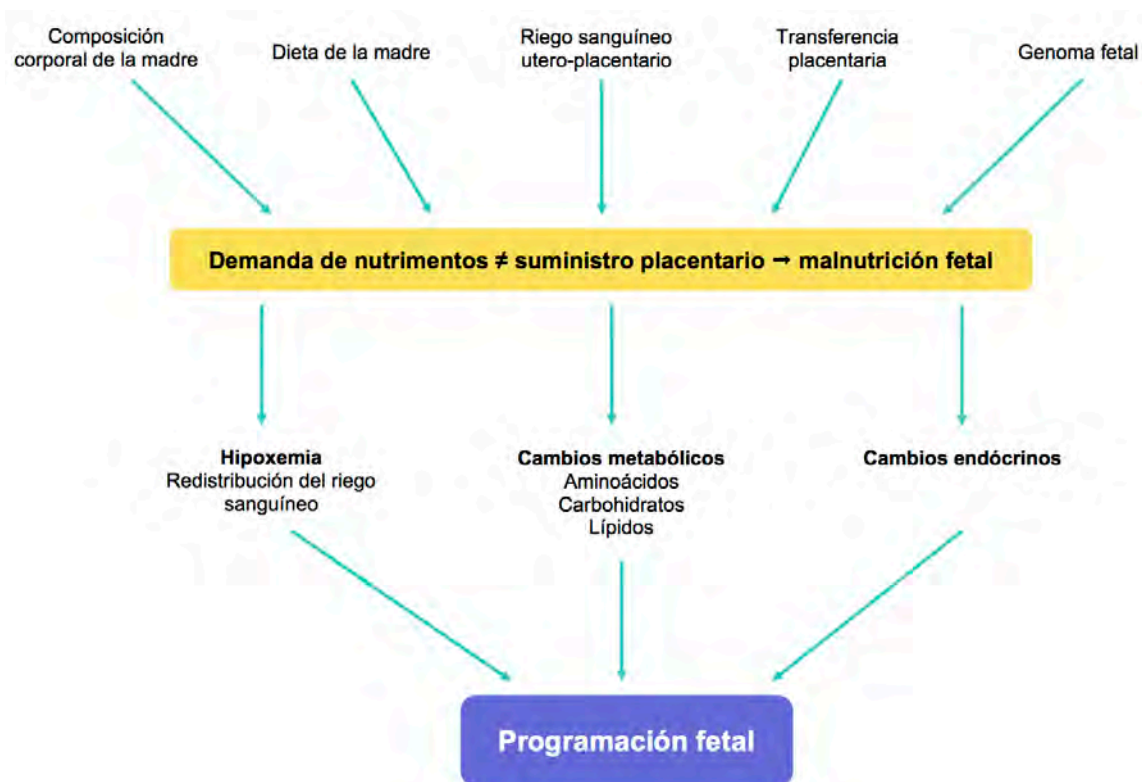
La nutrición también tiene efectos importantes en las hormonas fetales, y en las interacciones hormonales y metabólicas entre el feto, la placenta y la madre, de quienes depende la coordinación del crecimiento fetal. La insulina fetal y los factores de crecimiento (IGFs) tienen el papel central en la regulación del crecimiento y responden rápidamente a cambios en la nutrición fetal. Si la madre disminuye su ingesta, las concentraciones de insulina fetal, IGF-1 y glucosa disminuyen drásticamente, lo que lleva a una transferencia reducida de aminoácidos y glucosa de la madre al producto, reduciendo el crecimiento fetal (Fowden, 1995). Las adaptaciones del producto a condiciones nutricias adversas se puede observar en la **Figura No. 2**.

Los diferentes efectos de la desnutrición en diferentes etapas de la gestación se pueden resumir de la siguiente manera:

- Etapa temprana del embarazo: las concentraciones de nutrimentos influyen el crecimiento y desarrollo del embrión. La nutrición sub-óptima antes de la

implantación retarda el crecimiento y desarrollo, siendo las etapas posteriores a la fecundación particularmente sensibles.

- Etapa media del embarazo: la placenta crece más rápido que el feto y la deficiencia de nutrientes podría alterar el crecimiento fetal cambiando la interacción entre ambos. La desnutrición en esta etapa puede llevar a un crecimiento elevado de la placenta, posiblemente debido a una adaptación para mantener la reserva de nutrientes, sacrificando así el crecimiento fetal, para mantener la función de la placenta.
- Etapa final del embarazo: la desnutrición resulta es una disminución inmediata de la velocidad de crecimiento fetal. Cuando la desnutrición es aguda, el crecimiento fetal se puede recuperar; sin embargo, cuando es prolongada, el resultado al nacimiento es una talla baja (Barker, 2001).



**Figura No. 2** Adaptaciones fetales a la malnutrición. Modificado de Barker (2001).

### **4.3 LAS COMPLICACIONES CLÍNICAS EN EL EMBARAZO Y SUS CIFRAS DE PREVALENCIA EN MÉXICO**

En 2016, la población estimada en México superaba los 122 millones de habitantes, de los cuales poco más de la mitad corresponde a mujeres (51.2%) (CONAPO, 2016).

Un aspecto de suma relevancia para el análisis de la fecundidad y la salud reproductiva es el comportamiento demográfico de la población femenina, en particular de aquella en edades fértiles, convencionalmente considerada entre los 15 y 49 años. Así, en 2010, a nivel nacional hay poco menos de 31.1 millones de mujeres en edad fértil (MEF), que representan al 54.1 por ciento de la población femenina total, siendo el periodo entre 20 y 29 años las edades críticas para la reproducción, ya que en éstas se concentran las tasas más altas de fecundidad en México (CONAPO, 2011).

A partir de 1974, con el cambio de la política de población y del impulso de los programas de planificación familiar, la tasa de fecundidad comenzó a descender vertiginosamente. Se estima que en la actualidad (2016), la Tasa Global de Fecundidad (TGF) asciende a 2.16 hijos por mujer. En este mismo año, la cantidad de nacimientos sumó poco más de dos millones de niños (CONAPO, 2016).

De los cambios demográficos ocurridos en México, el descenso de la fecundidad es el que tiene las mayores implicaciones positivas para la salud reproductiva. Se sabe que:

- a) Un menor número de nacimientos reduce el tiempo que las mujeres están expuestas durante su vida al riesgo de complicaciones perinatales (de 63 meses con una fecundidad de siete hijos a 18 meses con una fecundidad de dos);
- b) Una disminuida fecundidad está relacionada con menor ocurrencia de embarazos en las edades extremas del periodo reproductivo; y
- c) Una fecundidad disminuida alarga el tiempo de espaciamiento entre los nacimientos traduciéndose en un mayor periodo de recuperación física de la madre entre parto y parto.

Debido a todos estos cambios ocurridos durante el último cuarto del siglo (reducción de la fecundidad, ampliación del periodo de tiempo que las parejas dejan pasar entre un hijo

y otro, y disminución de la fecundidad en las edades extremas), los patrones reproductivos han sido cada vez más favorables a la salud (CONAPO, 2011).

La Norma Oficial Mexicana para la atención de la Mujer durante el Embarazo, Parto y Puerperio y del Recién Nacido considera que un control adecuado del embarazo debe iniciar en el primer trimestre de gestación. En México, el porcentaje de mujeres que inició con oportunidad la revisión prenatal, del total que tuvo este tipo de atención, ascendió a 74.1%; 21.4% inició en el segundo trimestre; y 4.6% en el tercero. La Norma establece que la mujer debe recibir un mínimo de cinco consultas prenatales (CONAPO, 2011).

En el periodo de enero de 2009 a septiembre de 2014, de cada 100 partos ocurridos, 46 fueron por cesárea y 54 fueron partos normales (CONAPO, 2015). Cabe señalar que las normas de salud establecen que el límite ideal de este tipo de intervención no debe exceder el 20%.

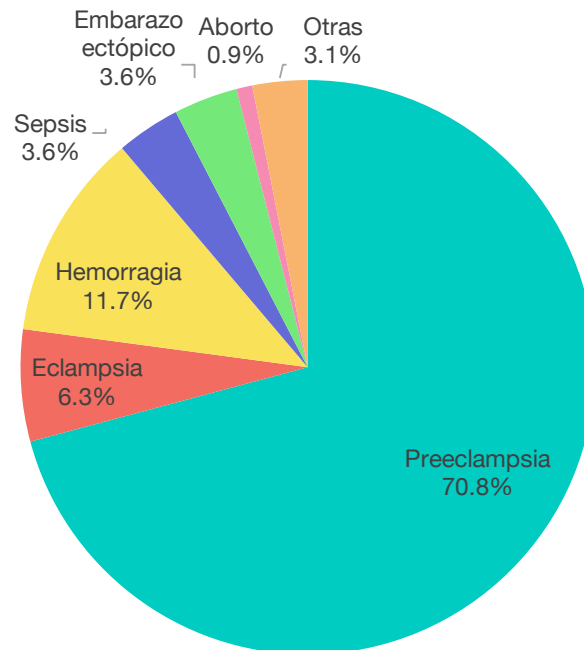
### **4.3.1 COMPLICACIONES DEL EMBARAZO**

Las complicaciones del embarazo son los problemas de salud que se producen durante este periodo, incluso en mujeres saludables. Pueden afectar la salud de la madre, del bebé o de ambos. Entre las más comunes se encuentran: aborto espontáneo, anemia, depresión, desprendimiento placentario, diabetes gestacional, embarazo ectópico, hiperémesis gravídica, hipertensión, placenta previa, preeclampsia, problemas fetales y trabajo de parto prematuro. De igual forma, se pueden presentar infecciones perjudiciales para la madre, el producto o ambos, como candidiasis, citomegalovirus, infecciones por *Streptococcus* del grupo B, listeriosis, toxoplasmosis, vaginosis bacteriana, entre otros (Department of Health and Human Services, 2009).

Alrededor de 300 millones de mujeres en el mundo sufren de enfermedades de corto y largo plazo, relacionadas con el embarazo, parto y puerperio. Las complicaciones de salud durante el embarazo y el parto son responsables del 18% de la carga global de enfermedad de las mujeres entre los 15 y 44 años de edad en el mundo entero. Tienen además un serio impacto sobre la salud de los recién nacidos. Los hijos de madres que fallecen por problemas relacionados con el embarazo, parto o puerperio tienen 10 veces más riesgo de morir que los recién nacidos de madres que sobreviven. En México, una

de cada cinco mujeres sufre complicaciones en el embarazo (Núñez, 2010; Sánchez, 2013).

Las causas principales de morbilidad materna, reportadas por Mejía (2012), fueron los trastornos hipertensivos, donde la preeclampsia-eclampsia fue responsable del 77.2% de los casos. En segundo lugar, se encuentra la hemorragia postparto con 11.7%, seguida de sepsis puerperal con un 3.6%, como se muestra en la **Figura No. 3**.



**Figura No. 3** Principales causas de morbilidad materna en México. Modificado de Mejía (2012).

La mayoría de los daños obstétricos y los riesgos para la salud de la madre y del niño pueden ser prevenidos, detectados y tratados con éxito, mediante la aplicación de procedimientos normados para la atención (Bernal, 2012).

A pesar de que la obesidad durante el embarazo no es considerada por el sistema de salud como una complicación propia, se sabe que las mujeres con obesidad gestacional presentan un incremento en el riesgo de tener complicaciones obstétricas, como hipertensión, diabetes, varices, coledocolitiasis, embarazos prolongados, retardo en el crecimiento intrauterino, infecciones antes y después del parto, complicaciones trombóticas, anemia, infecciones urinarias y desórdenes en la lactancia. El riesgo de

hipertensión en el embarazo, cesárea y macrosomía se relacionan directamente con el IMC. La diabetes gestacional está presente en sujetos de estudio con obesidad gestacional en un 5.2% comparado con las mujeres con peso normal (Minjarez, 2013).

### 4.3.1.1 OBESIDAD DURANTE EL EMBARAZO

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial de curso crónico en la cual se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida que conducen a un trastorno metabólico. Se caracteriza por el exceso de tejido adiposo en el organismo, la cual se determina cuando en las mujeres adultas existe un IMC igual o mayor a 30 kg/m<sup>2</sup> antes del embarazo, como se muestra en la **Tabla No.3**.

**Tabla No. 3** Ganancias de peso total para mujeres con embarazos simples en las normas del Institute of Medicine (IOM) de 2009

Situación del peso antes del embarazo (Categoría de IMC)	Intervalos recomendados en el embarazo de ganancia de peso total (Kg)
Inferior al normal (<18.5)	12.5-18
Normal (18.5-24.9)	11.5-16
Sobrepeso (25-29.9)	7-11.5
Obesidad (>29.9)	5-9

Modificado de IOM (2009).

En la actualidad, la obesidad es considerada en México un problema de salud pública. Estudios recientes demuestran que la incidencia y prevalencia del sobrepeso y la obesidad han aumentado de manera progresiva durante los últimos seis decenios y de modo considerable en los últimos 20 años. La prevalencia de obesidad es más alta en el sexo femenino que en el masculino, siendo las mujeres en edad fértil un grupo altamente afectado, con una presencia de la enfermedad en un porcentaje del 24% (20 a 29 años) hasta el 46.1% (40 a 49 años) (Gutiérrez, 2012). La prevalencia de obesidad en el embarazo tiene rangos del 11 al 22%. Según el reporte "Why Mothers Die?", 35% de las

muerres maternas correspondían a madres obesas, teniendo un 50% más de riesgo que la población con normopeso (Nazar, 2014).

Los mecanismos subyacentes al aumento del riesgo no se conocen bien en la obesidad durante el embarazo. En la fase inicial del embarazo, las mujeres con peso normal (IMC antes del embarazo  $<25$ ) depositan grasa en sus caderas, espalda y tercio superior de los muslos, que se cree importante como reserva calórica para el embarazo y la lactancia posteriores. La secreción de insulina y la sensibilidad a la misma aumentan, favoreciendo el incremento de la lipogénesis y la acumulación de grasa como preparación para las mayores necesidades energéticas del feto en fase de crecimiento. Los ajustes fisiológicos naturales (resistencia a la insulina, hiperlipidemia, inflamación sistémica) son prácticamente iguales que el fenotipo del síndrome metabólico. No obstante, en mujeres obesas (IMC antes del embarazo  $\geq 30$ ) la sensibilidad periférica a la insulina disminuye, con el resultado de un incremento escaso o nulo de grasa en el embarazo inicial, tal vez a causa de una menor necesidad de reservas calóricas adicionales (Herring, 2010).

Se cree que muchas de las complicaciones de la obesidad en poblaciones no embarazadas son mediadas en parte por la inflamación y sus secuelas. Estudios recientes sugieren que una mayor respuesta inflamatoria, tanto a nivel local (tejido adiposo, placenta y endotelio vascular) como sistémico (concentraciones plasmáticas circulantes) pueden estar involucradas en la mediación de los resultados clínicos adversos durante el embarazo (Denison, 2010).

La obesidad implica una expansión masiva del tejido adiposo. Ahora se sabe que la grasa no es solamente un órgano de almacenamiento, sino que es un tejido altamente activo metabólicamente. En la obesidad, la expansión de la masa del tejido adiposo se asocia con el aumento de la inflamación, y hay evidencia emergente de que esta inflamación está causalmente relacionada tanto con la resistencia a la insulina como con otras morbilidades relacionadas con la obesidad, como las enfermedades cardiovasculares (Poissonnet, 1983).

El tejido adiposo maduro consiste en adipocitos y células vasculares del estroma, comprendiendo estas últimas células endoteliales vasculares, fibroblastos y células del linaje hematopoyético. Todos los mamíferos contienen tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón, con funciones específicas de almacenamiento de lípidos y termogénesis

respectivamente. Además, en muchos animales, incluidos los humanos, el tejido adiposo visceral, que rodea los órganos internos, es más importante que el tejido adiposo subcutáneo en el desarrollo del síndrome metabólico (Poissonnet, 1984).

El tejido adiposo genera TNF, que contribuye a la inflamación de bajo grado que se encuentra en la obesidad. La leptina (tiene efectos sobre la ingesta de alimentos) también se ha identificado como un importante producto secretado por el tejido adiposo. TNF y leptina son ejemplos de “adipocinas”, péptidos liberados por el tejido adiposo, que pueden tener efecto en tejidos distantes. En los seres humanos, el tejido adiposo blanco produce más de 50 adipocinas. En paralelo con estos eventos proinflamatorios, el tejido adiposo blanco también produce citocinas antiinflamatorias como la adiponectina, IL-10 e IL-1Ra. Estos marcadores inflamatorios, aunque se originan en la grasa, circulan en la sangre (Hotamisligil, 1993).

En la obesidad existe una regulación positiva de la síntesis de quimiocinas y receptores en el tejido adiposo, tanto visceral como subcutáneo, aunque con un mayor incremento en el tejido adiposo visceral, y esto es probablemente un mecanismo por el cual está más fuertemente asociado con el síndrome metabólico. Las citocinas secretadas por el tejido adiposo visceral son “detectadas” directamente por el hígado debido al drenaje venoso de este a través del sistema portal. Por lo tanto, el tejido adiposo visceral es plausiblemente capaz de influir en la homeostasis de la glucosa hepática y en la sensibilidad a la insulina (Tordjman, 2009).

La expresión de los genes inflamatorios en la grasa está estrechamente correlacionada positivamente con el contenido de grasa del hígado y la disfunción arterial sistémica, e inversamente correlacionada con la sensibilidad a la insulina y los factores lipogénicos (Poulain-Godefroy, 2008).

Los macrófagos del tejido adiposo (ATMs) se encuentran en los individuos con peso normal y obesos, rodeando a los adipocitos necróticos. Sin embargo, su actividad funcional es proporcional al grado de obesidad. Los ATMs tienen un fenotipo distinto, identificados como M1 y M2. En los individuos con peso normal, los ATMs se asemejan más al fenotipo M2, secretando citocinas antiinflamatorias y arginasa, que bloquea la actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2). Por el contrario, en los



individuos obesos, hay un cambio hacia el fenotipo M1, secretando citocinas proinflamatorias, y generando ROS a través de la activación de NOS2 (Lumeng, 2007).

Pocos estudios han examinado el vínculo entre la obesidad y la inflamación durante el embarazo. En un estudio, los niveles séricos de leptina, proteína C reactiva e IL-6 fueron más altos en las mujeres obesas gestantes, que en otras condiciones. Este aumento de las citocinas proinflamatorias circulantes se relaciona, en parte, con la producción de células mononucleares maternas de sangre periférica, que muestran una mayor producción de mRNA de TNF e IL-6 (Ramsay, 2002).

En contraste con la evidencia sobre la invasión de macrófagos y otros eventos inflamatorios en el tejido adiposo en personas obesas no embarazadas, no se han realizado estudios cuantitativos sobre estos eventos en mujeres embarazadas, aunque se han identificado macrófagos en tejidos adiposo visceral y subcutáneo de mujeres embarazadas obesas (Farley, 2009).

La inflamación y las citocinas inflamatorias tienen un papel fundamental en la función placentaria durante el embarazo. Virtualmente, todas las citocinas conocidas son capaces de ser sintetizadas y liberadas por citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto y macrófagos placentarios (Pang, 2008). El papel fisiológico de las citocinas en las etapas posteriores del embarazo aún no se encuentra bien estudiado; sin embargo, se cree que IL-6 y TNF están implicados en la regulación del crecimiento fetal (Jones, 2009).

Los avances significativos en la comprensión de la placenta han establecido que la función placentaria es dinámica e influenciada por la salud materna, y tiene un importante papel regulador en el bienestar materno durante el embarazo. Dado que la obesidad materna se acompaña de una desregulación significativa de la fisiología normal, es plausible que la estructura y la función placentaria se alteren como consecuencia de la obesidad materna, e igualmente que la placenta pueda modular la fisiología materna mediante la liberación de citocinas inflamatorias (Radaelli, 2009).

Se cree que hay una tendencia hacia el aumento del peso placentario, paralelamente al aumento significativo en el IMC materno; sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar si el aumento de la obesidad materna es responsable del aumento del peso placentario. El hipo o hiperenrollamiento del cordón umbilical, asociado con el

fallecimiento fetal y la trombosis vascular, es también más común en embarazos complicados por obesidad, diabetes gestacional y preeclampsia (Sebire, 2007).

A nivel microscópico, no hay estudios detallados que examinen el efecto de la obesidad materna en la estructura placentaria. Sin embargo, es posible que la obesidad pueda afectarla. Apoyando esto, existen estudios que demuestran un aumento de dos a tres veces en los macrófagos placentarios en las mujeres obesas en comparación con las mujeres no obesas. También es posible que la obesidad materna pueda afectar el número y la función de otras poblaciones de células inmunes en la interfaz materno-fetal, incluyendo las células NK y las células dendríticas. Las alteraciones en estas poblaciones de células podrían tener implicaciones de por vida para el sistema inmunológico fetal adquirido y la susceptibilidad a la enfermedad en la vida posterior (Challier, 2008).

La obesidad materna también puede afectar el transporte placentario y la disponibilidad de sustrato. Se demostró un aumento significativo en la expresión de la fosfolipasa A2 (PLA2), PLA2G2A y PLA2G5, leptina y TNF en las placentas de los neonatos obesos. Se sugiere que este bucle inflamatorio puede ser un mecanismo por el cual el exceso de grasa se acumula en los neonatos obesos. Alternativamente, la insulina y los ácidos grasos aumentan la expresión de la adipofilina, que está asociada con gotas lipídicas celulares y está implicada en la absorción de ácidos grasos celulares y el almacenamiento de lípidos neutros, en trofoblastos humanos. En la obesidad materna, mayores niveles circulantes de insulina podrían aumentar la expresión de los transportadores de ácidos grasos, aumentando así la disponibilidad de ácidos grasos, tanto para la placenta como para el feto (Varastehpour, 2006).

El transporte de aminoácidos puede verse afectado por la obesidad materna. Las concentraciones fisiológicas de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF estimulan la actividad del sistema de transporte de aminoácidos A, incrementando así el transporte de aminoácidos al feto (Jones, 2009).

Las adipocinas también modulan la función placentaria. Es posible que el aumento de los niveles locales y/o circulantes de leptina en la obesidad materna pueda modular la inflamación y la función placentaria.

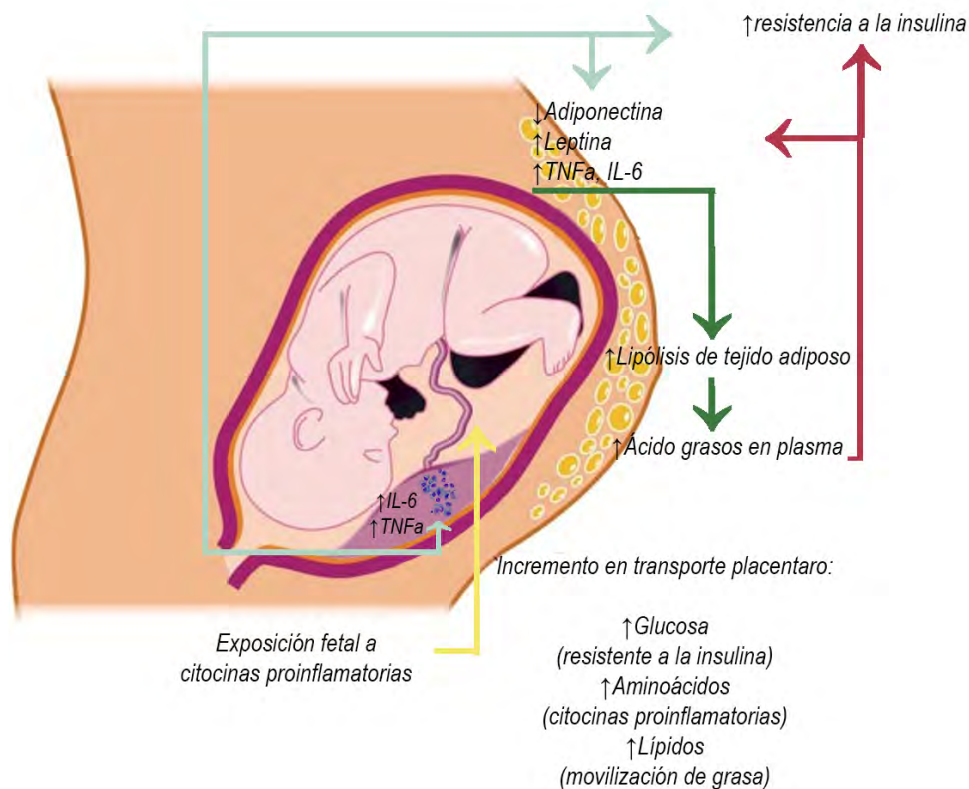
La evidencia presentada podría sugerir que la placenta es un espectador pasivo en el ambiente inflamatorio hostil de la obesidad materna. Sin embargo, esta explicación

puede ser demasiado simplista. Aunque el estrés nitrosativo se incrementa en las placentas de las mujeres obesas, generalmente es acompañado por una disminución en el estrés oxidativo. Se propone que el cambio en el equilibrio entre el estrés oxidativo y nitrosativo puede actuar como un mecanismo protector para la placenta con la formación de peroxinitrito consumiendo ROS y reduciendo el estrés oxidativo. Se plantea la posibilidad de que la placenta pueda "sentir" el ambiente materno y adaptarse para proteger no sólo a sí misma, sino también potencialmente al feto del medio hostil inflamatorio, oxidativo e hiperinsulinémico presente en la obesidad materna (Colomiere, 2009).

En individuos obesos, la función vascular y endotelial local y sistémica está significativamente deteriorada. La estructura de los vasos sanguíneos se altera en la obesidad con un aumento en el diámetro de los vasos, el grosor de la membrana basal, la permeabilidad vascular y la rigidez de los vasos. Con la progresión de la enfermedad, las paredes de los vasos microvasculares empiezan a atrofiarse, el diámetro del vaso se estrecha y se desarrolla una rarefacción microvascular progresiva. El tejido adiposo, que rodea los vasos sanguíneos (tejido adiposo perivascular), también afecta indirectamente la estructura y el tono vascular a través de la liberación de mediadores inflamatorios vasoactivos, incluyendo adipocinas, angiotensina y endotelina-1 (Zhang, 2009b). La obesidad también se asocia con un estado protrombótico con concentraciones plasmáticas mayores de factores, incluyendo el factor de von Willebrand, fibrinógeno y el factor VII (Faber, 2009).

Con el fin de sostener el feto en desarrollo, una amplia adaptación cardiovascular se produce durante el embarazo. Las mujeres obesas entran en el embarazo con una activación endotelial preexistente crónica. Aunque la función dependiente del endotelio aumenta durante el embarazo, sigue siendo menor en las mujeres obesas en comparación con las mujeres que tienen un peso normal, en todas las etapas del embarazo. Además, en el puerperio, la función endotelial disminuye a los niveles del primer trimestre en las mujeres obesas, mientras que la función endotelio-dependiente mejorada persiste en las mujeres con peso normal. La vasodilatación dependiente del endotelio también está alterada en las arterias del miometrio de las mujeres con un IMC elevado. Los mecanismos subyacentes a la función endotelial deteriorada en las mujeres obesas no se conocen bien. Sin embargo, es probable que tanto la inflamación sistémica

como la local dentro de la vasculatura participan en la mediación del deterioro de la función endotelial. La obesidad materna también se asocia con un mayor riesgo de tromboembolismo, aunque no hay estudios que hayan comparado fibrinólisis endógena, ni se ha establecido si existen diferencias en los factores de coagulación entre mujeres obesas y con peso normal durante el embarazo (Denison, 2010). En la **Figura No. 4** se puede observar un mecanismo generalizado de lo poco que se conoce de la fisiopatología de la obesidad durante el embarazo.



**Figura No. 4** Fisiología de la placenta y el tejido adiposo en la obesidad durante el embarazo. La infiltración de macrófagos de la placenta contribuye al aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6). Estas contribuyen a aumentar la resistencia a la insulina y el aumento de la lipólisis. El aumento de los ácidos grasos plasmáticos como resultado de la lipólisis también aumenta la resistencia a la insulina. El transporte alterado de nutrimentos en la obesidad durante el embarazo puede incluir: aumento del transporte de glucosa (a través de una mayor resistencia a la insulina), aumento del transporte de aminoácidos (a través de citoquinas proinflamatorias) y aumento del transporte de lípidos. IL, interleucina; TNF, factor de necrosis tumoral. Modificado de Denison (2010) y Reynolds (2013).

### 4.3.1.2 PREECLAMPSIA

La preeclampsia es un trastorno multisistémico de etiología aún desconocida y severidad variable, que se presenta únicamente en el embarazo de la especie humana. Se caracteriza por la presencia de hipertensión y proteinuria a las 20 semanas de gestación o después, con evidencia de enfermedad sistémica (como trombocitopenia, niveles elevados de transaminasas hepáticas, insuficiencia renal, edema pulmonar y disturbios visuales o cerebrales). Para el desarrollo de la preeclampsia se requiere una placenta, pero no un feto; es decir, el único tratamiento efectivo para la preeclampsia es la expulsión de la placenta (Chaiworapongsa, 2014). El cuadro clínico se caracteriza por hipertensión arterial  $\geq 140/90$  mm Hg, acompañada de proteinuria. Es frecuente que, además, se presente cefalea, acúfenos, fosfenos, edema, dolor abdominal y/o alteraciones en las pruebas de laboratorio clínico (ACOG, 2002).

Los trastornos hipertensivos son padecimientos que, a nivel mundial, causan un número elevado de defunciones maternas. En México, con datos del 2004, la Dirección General de Información en Salud de la Secretaría de Salud, reportó 316 defunciones debidas a esta patología, lo que corresponde al 2.5% del total de defunciones. Actualmente la preeclampsia/eclampsia, aparte de ser causa importante de muerte materna y neonatal, lo es de prematuridad, restricción en el crecimiento intrauterino y todas las complicaciones secundarias a la prematuridad como la inmadurez pulmonar y neurológica (Secretaría de Salud, 2007), nefropatía, bajo peso al nacer, anemia, ictericia, hipoglucemia, entre otras (Gómez, 2006).

Aunque la causa exacta es desconocida, los procesos fisiopatológicos subyacentes a este trastorno se describen en dos etapas. La primera etapa se caracteriza por una perfusión placentaria reducida, posiblemente relacionada con una placentación anormal con alteración de la invasión de trofoblasto y una remodelación inadecuada de las arterias espirales uterinas. La segunda etapa se refiere a las manifestaciones sistémicas maternas con respuestas inflamatorias, metabólicas y trombóticas que convergen para alterar la función vascular, lo que puede resultar en daño de múltiples órganos (Jeyabalan, 2013).

El síndrome se caracteriza por:

- Estrés oxidativo, defensas antioxidantes inadecuadas y disfunción endotelial.

- Agregación plaquetaria y coagulación sanguínea ocasionadas por deficiencias de prostaciclina en relación con el tromboxano.
- Espasmos y constricción de vasos sanguíneos, restricción de la circulación sanguínea.
- Respuestas adversas a la placenta por parte del sistema inmune de la madre.
- Elevación en concentraciones sanguíneas de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol (Brown, 2014).

La visión tradicional del mecanismo patogénico de la preeclampsia es que una placenta isquémica produce factores solubles que, cuando se liberan a la circulación materna, son responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se cree que estos factores solubles causan disfunciones en las células endoteliales, inflamación intravascular y activación del sistema hemostático (Chaiworapongsa, 2014).

La fisiopatología de la preeclampsia comienza con una falla en la transformación de las arterias espirales. En un embarazo normal, incrementa el flujo sanguíneo en el útero para permitir la perfusión del espacio intervelloso de la placenta, y permitir el crecimiento fetal. El incremento en el flujo sanguíneo se logra por la transformación fisiológica de las arterias espirales del útero, mediante la placentación profunda, un proceso en que el trofoblasto invade la decidua, un tercio del miometrio, y la pared arterial, destruye el medio y transforma las arterias (Brosens, 1967). En la preeclampsia, el segmento miometrial de la arteria espiral falla en lograr la transformación fisiológica (De Wolf, 1975).

La hipoxia es un factor importante en la invasión trofoblástica. Se sabe que en las primeras fases de implantación, el saco gestacional se encuentra en un ambiente con baja tensión de oxígeno, lo que favorece la proliferación del trofoblasto. Los trofoblastos anclan el blastocisto a los tejidos maternos, y también conectan las puntas de las arterias espirales dentro de la decidua. Eventualmente, se crea el espacio intervelloso, que permite la placentación y desplaza la nutrición de un tipo histiotrófico a hematotrófico. La irrupción de sangre aumenta la tensión de oxígeno, generando estrés oxidativo en los trofoblastos, que promueve la diferenciación de un fenotipo proliferativo a un fenotipo invasivo (Jauniaux, 2000). Así, la fase inicial de la placentación se produce bajo condiciones de hipoxia relativa (el factor inducible por hipoxia HIF-1 $\alpha$  se expresa en altos niveles en los trofoblastos). Existe evidencia que apoya el papel de la hipoxia en la creación de un entorno que predispone a trastornos de implantación: la expresión de las

proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  aumenta en las placentas de las mujeres con preeclampsia; sin embargo, la expresión de HIF-1 $\alpha$  está regulada positivamente no sólo por hipoxia, sino también por estímulos inflamatorios (Rajakumar, 2004; Tal, 2010).

La placentación profunda inadecuada puede también resultar de un defecto decidual. La decidualización óptima requiere un preconditionamiento adecuado, que se logra mediante menstruaciones sucesivas (esto podría explicar la alta tasa de preeclampsia en mujeres jóvenes) (Brosens, 2009). Otra posibilidad es que la placentación defectuosa pueda ser el resultado de combinaciones de factores que afectan tanto a la decidua como al trofoblasto, como los que se mencionan a continuación.

La implantación crea condiciones en las cuales las células fetales (que transportan antígenos paternos) y las células maternas entran en contacto en la decidua. Un embarazo exitoso requiere que el sistema inmune materno no rechace el trofoblasto. Las funciones de las células natural killer (NK) en la decidua, las moléculas HLA-C en el trofoblasto fetal y las células T reguladoras han estado implicadas en el estado tolerogénico asociado con el embarazo normal, así como en la preeclampsia (Redman, 2010).

El reconocimiento inmunológico materno-fetal en el sitio de la placentación se encuentra controlado por dos sistemas de genes polimórficos: las moléculas HLA-C del trofoblasto y sus receptores afines, y los receptores KIR de células NK. Se conocen al menos dos grupos de haplotipos de KIR (A y B) y dos tipos de HLA-C (C1 y C2). HLA-C2 interactúa con KIR más fuertemente que HLA-C1. Las células NK uterinas liberan quimiocinas, factores angiogénicos y citocinas que promueven la invasión de trofoblasto. Estas secreciones se incrementan al unirse los antígenos HLA-C a los KIR haplotipo B, mientras que se reducen mediante la unión del antígeno al haplotipo A. Por lo tanto, las madres KIR BB que portan fetos HLA-C1 podrían tener la mejor oportunidad de placentación adecuada y evitar la preeclampsia. Por el contrario, las madres KIR AA que portan fetos HLA-C2 podrían tener una mayor susceptibilidad a la preeclampsia (Moffett, 2007).

El hecho de que cualquiera de los factores anteriores, o la combinación de ellos, provoquen una disfunción placentaria, desencadena otra serie de procesos con efectos sistémicos.

Ya que las arterias espirales se encuentren estrechas puede generar estrés del retículo endoplásmico (RE), pues se crean condiciones para una lesión de isquemia-reperusión en el espacio intervelloso. Esta lesión, a su vez, podría conducir al estrés del RE, que regula las modificaciones post-traduccionales y el plegamiento de proteínas. Durante los estados de crisis energética (como la hipoxia), el RE suspende el plegamiento de proteínas (denominado respuesta de proteína no plegada, o UPR). La UPR puede conducir al cese de la proliferación celular y, cuando es grave, la apoptosis. La apoptosis del trofoblasto da como resultado la liberación de micropartículas y nanopartículas en la circulación materna, lo que puede estimular una respuesta inflamatoria intravascular, apoyando la implicación del estrés del RE en la preeclampsia (Burton, 2009; Lian, 2011).

El estrés oxidativo es relevante para la fisiopatología de la preeclampsia, ya que induce la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Se cree que la causa del estrés oxidativo en las placentas de mujeres con preeclampsia es la hipoxia intermitente y reoxigenación, probablemente como resultado de una deficiente conversión del segmento miometrial de las arterias espirales (Burton, 2011).

El aumento de la exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) puede conducir a la carboxilación de proteínas, la peroxidación de lípidos y la oxidación del DNA, todos los cuales se han observado en placentas de sujetos de estudio con preeclampsia. Los mecanismos antioxidantes placentarios están alterados en sujetos de estudio con preeclampsia, como lo demuestran su disminución de la expresión de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en comparación con las mujeres con embarazos normales (Vaughan, 2002).

Otra fuente importante de radicales libres en humanos es el grupo hemo libre, una molécula pro-oxidante producida diariamente a través de la degradación de los eritrocitos circulantes. La protección contra el hemo libre es proporcionada por las acciones de la hemoxigenasa, que convierte el hemo libre en biliverdina y posteriormente en bilirrubina (propiedades antioxidantes), liberando hierro libre y monóxido de carbono (induce vasodilatación, propiedades antiapoptóticas y angiogénicas). Varios estudios apoyan el papel de las hemoxigenasas en la patogénesis de la preeclampsia, ya que su expresión está disminuida en placentas de mujeres con preeclampsia. Estos hallazgos indican que la preeclampsia se asocia con una deficiencia de enzimas antioxidantes en la placenta y probablemente también en sangre periférica (George, 2013).



Hay evidencia fenotípica y funcional de que en el embarazo hay activación de granulocitos y monocitos circulantes, y la magnitud de esta respuesta inflamatoria intravascular se encuentra aumentada en sujetos de estudio con preeclampsia. La evidencia que apoya esta visión incluye hallazgos de niveles elevados de citocinas proinflamatorias en la sangre de mujeres con preeclampsia. Se cree que los mecanismos responsables de la inflamación intravascular en la preeclampsia incluyen una mayor liberación de micropartículas y nanopartículas del sincitiotrofoblasto en la circulación materna, así como citocinas y quimiocinas proinflamatorias liberadas en el contexto de estrés oxidativo y del RE (Cindrova, 2007).

Adicionalmente, se ha estudiado que durante embarazo normal hay una respuesta vascular reducida a la angiotensina II (Gant, 1974). Sin embargo, las mujeres embarazadas con preeclampsia presentan un aumento en la sensibilidad a los efectos de la angiotensina II. Los mecanismos responsables de la refractaria fisiológica a la angiotensina II en el embarazo normal y la respuesta mejorada a ella en la preeclampsia incluyen predisposición genética, mala respuesta inmune adaptativa y desencadenantes ambientales. Estudios en modelos animales sugieren que los autoanticuerpos anti-AT1 influyen la hipertensión durante el embarazo mediante la activación del complemento C3 y la producción de factores antiangiogénicos. Un subconjunto de células B podría estar involucrado en la producción de autoanticuerpos anti-AT1 en la preeclampsia (Dechend, 2005; Zhou, 2008).

Todos los mecanismos anteriores convergen en un efecto generalizado, que es la desregulación en la angiogénesis.

La angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes) es esencial para un embarazo exitoso (Ferrara, 1996). La angiogénesis defectuosa se ha considerado durante mucho tiempo como una vía para la preeclampsia, y se ha demostrado que un estado antiangiogénico está implicado en la patogénesis de la preeclampsia. Un análisis de los patrones de expresión génica diferencial mostró que los niveles de mRNA del receptor VEGF son más altos en las placentas de mujeres con preeclampsia que en los de mujeres embarazadas sanas. La preeclampsia se asocia con una disminución de los niveles plasmáticos y/o séricos de VEGF libre y del factor de crecimiento placentario (PIGF) (Torry, 1998; Maynard, 2003).

Se ha propuesto que la reducción del flujo sanguíneo uteroplacentario, el daño a los vellosidades, el desprendimiento sincitial de factores antiangiogénicos, el estrés oxidativo, los autoanticuerpos anti-AT1, las citocinas proinflamatorias, el exceso de trombina y la hipoxia son responsables del cambio en el equilibrio de factores angiogénicos y antiangiogénicos, a favor de un estado antiangiogénico en la preeclampsia (Chaiworapongsa, 2014).

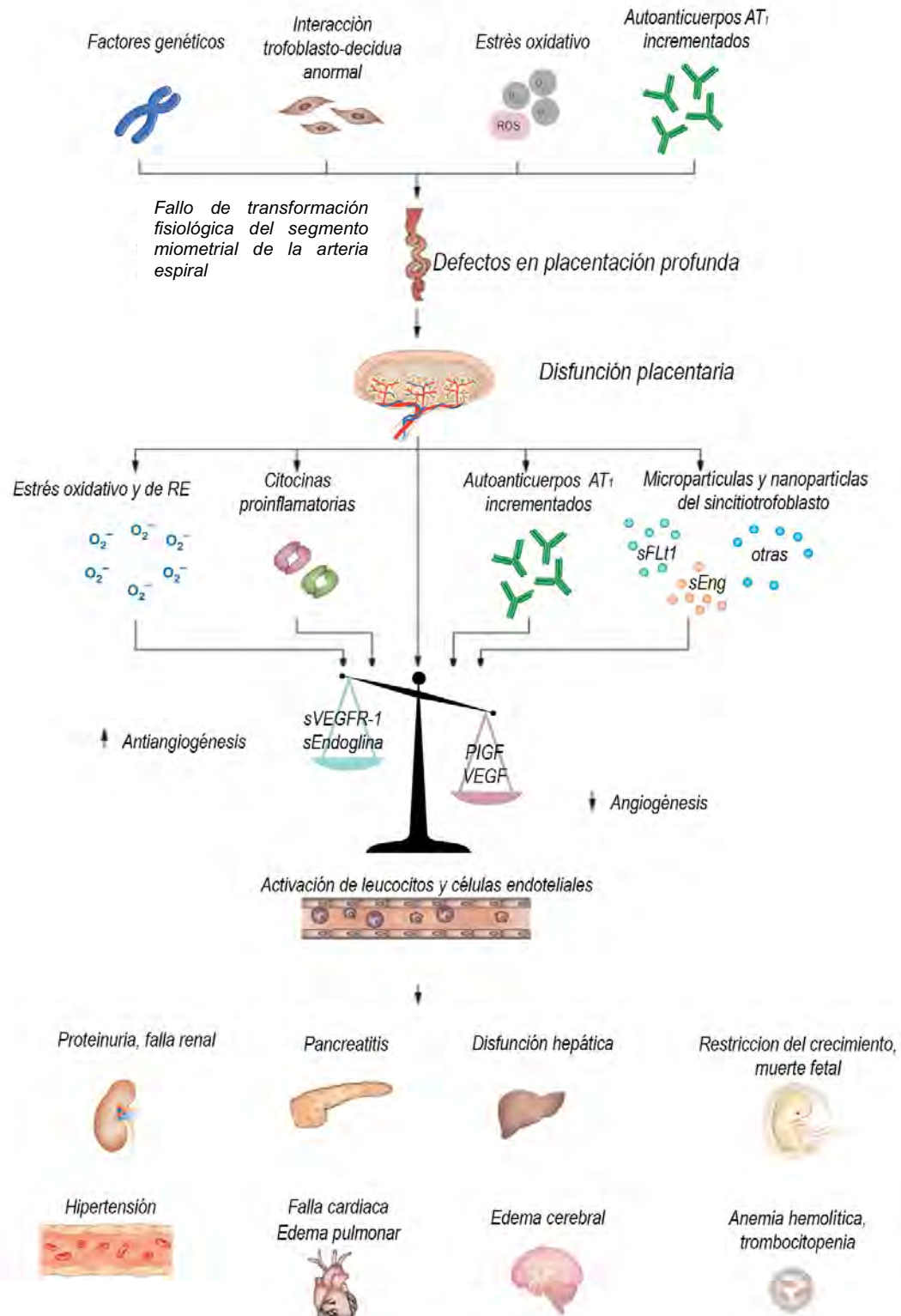
VEGFR-1 y la endoglina soluble ejercen efectos antiangiogénicos, por unión e inhibición de la actividad biológica de VEGF y PlGF circulantes, y por inducción de la migración y proliferación de células endoteliales, respectivamente (Craici, 2013).

La desregulación en la angiogénesis tiene efectos directos sobre la activación de células endoteliales. Se ha propuesto que la activación y/o disfunción de las células endoteliales es una característica central de la preeclampsia, afectando en la inflamación intravascular,. La proteinuria también puede considerarse como una manifestación de daño al endotelio glomerular (Eremina, 2003).

La preeclampsia puede asociarse con trombocitopenia. Varias líneas de evidencia apoyan el papel de la activación plaquetaria en la preeclampsia: aumento del tamaño de las plaquetas, disminución de la vida útil de las plaquetas, aumento de la producción de tromboxano B2, entre otros. Dado que el vasoespasmo y el consumo de plaquetas son características de la preeclampsia, se propone que este trastorno representa una anomalía plaquetaria y del endotelio, debido a una deficiencia de prostaciclina (efectos vasodilatadores e inhibición de la agregación plaquetaria). Además, las placentas de mujeres con preeclampsia producen más tromboxano A2 que prostaciclina, y el tromboxano A2 puede inducir vasoconstricción y agregación plaquetaria. Un argumento similar existe para el papel del óxido nítrico en la preeclampsia, ya que una deficiencia de óxido nítrico puede causar vasoconstricción y aumento de la agregación plaquetaria (Chaiworapongsa, 2014).

Todas las condiciones adversas generadas por la preeclampsia generan un efecto sistémico, tanto en la madre como en el producto, pudiendo afectar órganos como los riñones, hígado, páncreas, corazón, venas, arterias y sistema nervioso en la madre, y afectar de distintas formas al embrión o feto, que se revisará más adelante. Un resumen de la fisiopatología de la preeclampsia se puede observar en la **Figura No. 5**.

# El embarazo y los primeros dos años de vida



**Figura No. 5** Modelo integrado de la fisiopatología compleja de la preeclampsia. Factores genéticos (incluyendo la incompatibilidad genotípica materno-fetal) y ambiental (exposición periconcepcional a antígenos paternos) interrumpen la inmunomodulación inducida (*continúa*)

por el embarazo, llevando a la patología del trofoblasto y decidua, invasión del endometrio superficial y la falla en la transformación fisiológica de las arterias espirales (desorden en la placentación profunda). El grado de la isquemia uterina está determinado por la severidad del defecto de placentación y la demanda fetal del suministro sanguíneo. Las complicaciones obstétricas ocurren cuando estos dos factores se encuentran desajustados. El tiempo y extensión del desajuste determina la presentación clínica (muerte fetal, preeclampsia con RCIU, RCIU solo o preeclampsia tardía). La preeclampsia ocurre como resultado de la respuesta adaptativa, involucrando la liberación de citocinas inflamatorias, autoanticuerpos anti-AT<sub>1</sub>, factores angiogénicos y antiangiogénicos, y partículas derivadas del sincitiotrofoblasto a la circulación materna. Colectivamente, estos factores inducen la activación de leucocitos, inflamación intravascular, disfunción de células endoteliales y generación excesiva de trombina. Las características multiórgano de la preeclampsia resultan de las consecuencias de estos procesos en diferentes órganos diana. Abreviaturas: AT<sub>1</sub>, receptor angiotensina II tipo 1; RE, retículo endoplásmico; HIC, hemorragia intracerebral; RCIU, restricción del crecimiento intrauterino; PIGF, factor de crecimiento placentario; ROS, especies reactivas de oxígeno; s, soluble; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; VEGFR-1, receptor 1 de factor de crecimiento vascular endotelial. Modificado de Chaiworapongsa (2014) y Parikh (2008).

### **4.3.1.3 PREECLAMPSIA Y OBESIDAD EN EL EMBARAZO**

La mujer con obesidad que se embaraza tiene un mayor riesgo para desarrollar preeclampsia. En México no existen reportes epidemiológicos que relacionen ambas patologías, sin embargo, en un estudio se analizaron los riesgos y la influencia que tiene el aumento de peso materno en relación con la aparición de la enfermedad encontrando que el riesgo de preeclampsia en mujeres con un IMC > 29.9 tiene una alta significancia, sobre todo cuando está asociado con otros factores de riesgo como la edad materna avanzada, antecedentes de preeclampsia y riesgo hereditario de obesidad (Minjarez, 2013).

La obesidad es un factor de riesgo para la preeclampsia, pero los mecanismos involucrados aún no se conocen. Hay un riesgo tres veces mayor de que las mujeres obesas presenten preeclampsia (reporte mundial) (Roberts, 2011). La obesidad y la preeclampsia comparten muchas características comunes. Ambas se asocian con estrés oxidativo, así como con los marcadores circulantes de inflamación. Las mujeres obesas y preeclámpticas también comparten rasgos comunes de dislipidemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y deterioro de la función endotelial. Todas estas características

compartidas están relacionadas con la inflamación y alteración de la función vascular (Walsh, 2007).

La perturbación en la síntesis de óxido nítrico (NO) y la biodisponibilidad que conduce a la disfunción vascular ha sido una vía mecánica clave que ha llamado la atención en el contexto de la enfermedad cardiovascular y la obesidad. La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un agonista competitivo de L-arginina, el precursor de la síntesis de óxido nítrico. ADMA funciona como un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, que resulta en la reducción de la producción de NO y aumento en la generación de superóxido. La inflamación, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, la homocisteína elevada y la obesidad están asociados con un aumento de ADMA. Curiosamente, se ha demostrado que la ADMA circulante disminuye con la pérdida de peso. Varios estudios han demostrado concentraciones más altas de ADMA con preeclampsia e incluso antes de la aparición de la enfermedad, en la gestación (Jeyabalan, 2013).

# 5.

La niñez  
temprana y  
la influencia  
de factores  
materno-  
ambientales

La continuación posnatal de los primeros mil días de vida también es un periodo crítico para el crecimiento y desarrollo de los niños, ya que su alimentación, que comprende dos etapas fundamentales: lactancia y ablactación; provee de los nutrimentos exactos para que el individuo pueda construirse un estado de salud generalizado, y establece las bases para que pueda mantenerlo en etapas posteriores de su vida.

### **5.1 PUERPERIO Y ETAPAS DE ALIMENTACIÓN EN LA NIÑEZ TEMPRANA**

El puerperio, periodo que ocurre en la madre después del parto, es también de suma atención e interés, pues el cuidado de su evolución aseguran la recuperación completa de la mujer, y una mejor alimentación, cuidado y desarrollo para los niños, ya que durante sus etapas de desarrollo, no pueden alimentarse por su cuenta y depende de quienes lo rodean, especialmente la madre.

#### **5.1.1 PUERPERIO**

El puerperio es el período de la vida de la mujer que sigue al parto. Comienza después de la expulsión de la placenta y se extiende hasta la recuperación anatómica y fisiológica de la mujer. Es una etapa de transición de aproximadamente 6 a 8 semanas, en la que se inician y desarrollan los complejos procesos de la lactancia y de adaptación entre la madre, su hijo/a y su entorno. En el parto se produce una disminución ponderal de 5 a 6 Kg. Posteriormente, la mujer pierde alrededor de 2 Kg durante el puerperio temprano y alrededor de 1.5 Kg por semana en las semanas siguientes (Peralta, 1996).

En el puerperio, los órganos y sistemas maternos que sufrieron transformaciones durante el embarazo y parto, presentan modificaciones que los retornan o involucionan en gran medida a las condiciones pregestacionales.

En el útero, después de la salida de la placenta continúan las contracciones. Estas contracciones son esenciales para la hemostasia al comprimir los vasos sanguíneos del lecho placentario y lograr su obliteración. El resultado es la disminución de peso y tamaño del útero con regresión de su gran masa muscular. Gracias a esto, se reubican

las vísceras del tracto gastrointestinal. El endometrio se reconstituye rápidamente exceptuando el lecho placentario, que requiere de 6 a 8 semanas para su total restauración. El cuello uterino reduce rápidamente su dilatación a 2 -3 centímetros en las primeras horas postparto y permanece así durante la primera semana del puerperio para luego disminuir a 1 cm. Se denomina loquios al contenido líquido normal expulsado por el útero en su proceso de involución y curación de la superficie dejada por el lecho placentario. La pérdida de loquios dura aproximadamente 4 a 6 semanas coincidente con el término de la involución uterina (Brady, 1992).

El volumen sanguíneo disminuye en un 16% ya al tercer día postparto para continuar descendiendo gradualmente hasta llegar a un 40% en la sexta semana. El gasto cardíaco aumenta después del parto en aproximadamente 13% y se mantiene así por una semana. Posteriormente desciende paulatinamente hasta llegar a un descenso de 40% a la 6° semana. Estos cambios permiten que la frecuencia cardíaca y la presión arterial regresen a valores pregestacionales. Existe un aumento de la masa eritrocítica, que aumenta en un 15% en la primera semana postparto para llegar a los valores habituales 3 a 4 meses después. En la serie blanca, hay leucocitosis en la primera semana postparto con aumento de los granulocitos. Las plaquetas también aumentan significativamente en la primera semana después del parto (Peralta, 1996).

Las modificaciones morfológicas del tracto urinario que ocurren normalmente durante el embarazo pueden persistir en el puerperio hasta alrededor de la 4° a 6° semana postparto. Los riñones se mantienen aumentados de tamaño los primeros días y los uréteres persisten significativamente dilatados durante el primer mes. La función renal retorna a su condición pregestacional en las primeras semanas del puerperio. El metabolismo hepático regresa a su función pregestacional aproximadamente a partir de la tercera semana postparto (Díaz, 1994).

### **5.1.2 LACTANCIA**

La OMS define como lactancia materna exclusiva (LME) la alimentación del lactante con leche materna de la madre o de otra mujer, sin ningún suplemento sólido o líquido, lo que incluye el agua. En el 2002, durante la 55a Asamblea Mundial de Salud, se recomendó



que la LME deba realizarse durante los primeros seis meses de vida, y continuar posteriormente con alimentos complementarios, hasta los 2 años como mínimo.

La lactancia materna en México ha presentado un incremento del 0.75% por año a partir de 1985 a 2000, en comparación con otros países de América Latina como Honduras y Nicaragua que reportaron un incremento de 7.75% por año (Aguilar, 2007).

De acuerdo a UNICEF, en 2010 México era uno de los diez países con los porcentajes más bajos de inicio temprano de lactancia materna. Para el año 2012, los datos nacionales indicaban un porcentaje del 14.4 de los niños y niñas menores de seis meses con lactancia materna exclusiva. Es decir, 85% de los niños y niñas que nacen en México no cuentan con la protección y los beneficios que la lactancia materna exclusiva aporta.

La leche humana se elabora de acuerdo con un patrón y código genético, propios de la especie humana, de tal forma que su composición experimenta variaciones. Se encuentra como calostro durante los primeros cinco días de vida, en las siguientes semanas se conoce como leche de transición y a partir de la tercera semana y hasta más de dos años como leche madura (Aguilar, 2007). La composición básica de nutrimentos del calostro y la leche madura se muestran **en la Tabla No. 4**.

**Tabla No. 4** Composiciones de 100 mL de calostro y leche madura

Contenido	Calostro	Leche madura
Agua (mL)	87	88
Calorías (Kcal)	55	67
Lípidos (g)	2.9	4.2
Lactosa (g)	5.3	7.0
Proteínas totales (g)	2.0	1.1
IgA secretora	0.5	0.1
Lactoferrina	0.5	0.2
Caseína	0.5	0.4
Calcio (mg)	28	30
Sodio (mg)	48	15

Vitamina A ( $\mu\text{g}$ )	151	75
Vitamina B <sub>1</sub> ( $\mu\text{g}$ )	2	14
Vitamina B <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}$ )	30	40
Vitamina C ( $\mu\text{g}$ )	6	5

Modificado de Brown (2014).

La producción de leche materna o lactogénesis es, en promedio, de alrededor de 600 mL/día en el mes posterior al parto, y se incrementa de 750 a 800 mL por día a los 4 a 5 meses posparto. La producción de leche varía de 450 a 1200 mL/día en mujeres que amamantan un niño (Brown, 2014).

Las mujeres que amamantan obtienen beneficios hormonales, físicos y psicológicos. La lactancia materna aumenta de inmediato los niveles de oxitocina, contribuyendo al estímulo de las contracciones uterinas, minimiza las hemorragias posparto y ayuda a que el útero recupere su tamaño normal (Heinig, 1997).

También para los niños presenta beneficios nutricionales, ya que:

- Es isoosmótica
- Su contenido relativamente bajo de proteínas satisface las necesidades de los lactantes sin sobrecargar los riñones inmaduros
- Proporciona cantidades generosas de lípidos en forma de ácidos grasos esenciales, ácidos grasos saturados, triglicéridos de cadena media, colesterol y DHA
- Los minerales que contiene están unidos de manera importante a las proteínas y equilibrados para aumentar su disponibilidad

De igual forma, la lactancia ofrece beneficios inmunológicos, ya que, entre la composición de la leche materna, se encuentran: macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y T, inmunoglobulinas secretoras (sIgA, sIgG, sIgM, sIgE y sIgD), antígenos de histocompatibilidad, productos de las células T, factores inespecíficos (complemento y factor bifidus), proteínas transportadoras (lactoferrina, transferrina, proteína fijadora de

vitamina B<sub>12</sub> y proteína fijadora de corticoides) y enzimas (lisozima, lipasa y enzimas leucocíticas) (Lawrence, 2005).

Por último, se han reportado de igual forma, los beneficios cognitivos, analgésicos y económicos que la lactancia materna confiere (Brown, 2014).

### **5.1.3 ABLACTACIÓN**

Los primeros dos años de vida (periodo de continuación de los “Los primeros mil días”) representan un período de desafío especial para la nutrición y salud de los niños porque su tasa metabólica relativamente elevada y la rápida velocidad de crecimiento imponen unos requerimientos nutrimentales relativamente mayores. Además, la inmadurez del tracto gastrointestinal, la coordinación neuromuscular y la función inmunológica del lactante limitan los tipos de alimentos que es capaz de consumir y lo expone a un riesgo elevado de infección transmitida a través de los alimentos y a alergias alimentarias (Brown, 2007). Por estas razones, las recomendaciones para la óptima alimentación del niño deben considerar los requerimientos de los nutrimentos indispensables a su edad específica, los alimentos apropiados, fuente de estos nutrimentos, y los métodos adecuados para prepararlos (Devaney, 2004)

Durante el primer año de vida, se presenta el primer brote de crecimiento acelerado que resulta en un cambio constante de los requerimientos energéticos y de nutrimentos en este grupo de edad. Los lactantes deben recibir alimentos complementarios adecuados y seguros mientras continúa la alimentación al pecho materno hasta los dos años de edad.

La palabra ablactación tienen su origen del francés, prefijo latino “ab”, de separación, y “lactare”, amamantar. Este término se refiere al proceso de inicio de la introducción de alimentos diferentes a la leche en la dieta del lactante; la introducción de estos alimentos se realiza de manera gradual a partir del cuarto al sexto mes de vida. Lo anterior no significa que se interrumpa la lactancia, sino que “se complemente” con alimentos adecuados. Así, la ablactación es un proceso en la alimentación que expresa la secuencia en la introducción de alimentos diferentes a la leche.

Respecto a la alimentación complementaria de niños menores de dos años en el ámbito nacional se encontró que la edad de inicio fue a los cinco meses de vida. De acuerdo al

Comité para el Consenso Mexicano de Ablactación, el seguimiento en la introducción de alimentos complementarios deben ser frutas, seguido de verduras, cereales, leguminosas y carnes (Vásquez, 2008).

## 5.2 LOS HÁBITOS NOCIVOS EN LA NIÑEZ TEMPRANA

Los primeros años de vida son los más importantes para el desarrollo de un individuo. Las experiencias en esos primeros años dependen de la interacción entre factores genéticos y del medio ambiente, así como de la nutrición, las interacciones, etc. Por ello, la infancia temprana es un período corto pero único en el que los niños necesitan atención, oportunidades para la exploración e interacciones adecuadas que les permitan desarrollar su potencial.

Las experiencias negativas en la primera infancia y las deficiencias de desarrollo acumuladas influyen en etapas posteriores de la vida, tanto en forma de potenciales limitaciones en las capacidades cognitivas, educativas y laborales. El desarrollo infantil temprano es un proceso de cambio que involucra cuatro dominios: físico, cognitivo, del lenguaje y socioemocional. Estos dominios se encuentran vinculados y el progreso en uno de ellos afecta o promueve el progreso en otros, como se muestra en la **Figura No. 6** (Raineri, 2015).



**Figura No. 6** Periodos críticos en los dominios del desarrollo infantil temprano. Modificado de Raineri (2015).

El desarrollo que se produce durante la primera infancia proporciona los cimientos esenciales para el éxito en muchas áreas de la vida, tales como el bienestar físico, social y económico.

La interacción que sucede entre los rasgos individuales (genéticos y fisiológicos) y las experiencias y exposiciones provenientes del ambiente son fundamentales para el desarrollo infantil. El cerebro humano, en particular, es el “órgano maestro” del desarrollo. En los primeros años de vida, se producen períodos sensibles programados genéticamente, durante los cuales el niño en desarrollo es excesivamente sensible a las influencias del medio ambiente externo. El proceso de experiencias iniciales que se solidifican y repercuten en la salud y el desarrollo a largo plazo se conoce como incrustación biológica (Irwin, 2007).

El desarrollo y crecimiento infantiles óptimos precisan una nutrición adecuada. Durante los primeros meses de vida, la lactancia desempeña un papel crucial en proveer los nutrimentos que los niños necesitan; de hecho, se cree que disminuye las posibilidades de retardo del desarrollo post-natal. La infancia desnutrida corre mayor peligro de sufrir las consecuencias de un desarrollo mental y físico insuficiente; rendir menos en la escuela; mostrar propensión a infecciones y sus secuelas; padecer episodios diarreicos más severos; desarrollar neumonía; tener sistemas inmunológicos ineficientes; y, con frecuencia, presentar bajos índices de hierro, yodo, proteínas y, por ende, menos energía, lo cual podría generar enfermedades crónicas (Irwin, 2007). Entre las carencias nutricionales más frecuentes en el mundo se encuentra la anemia por deficiencia de hierro.

Las consecuencias de la drogadicción materna sobre el recién nacido son muy variables, y dependen del tipo de droga, la dosis, el tiempo de drogadicción; el consumo o no de múltiples fármacos, infecciones asociadas, y una alimentación deficiente, siendo difícil el relacionar patologías determinadas con una droga en concreto. Las drogas más utilizadas son: alcohol, tabaco, psicoestimulantes (cocaína), opiáceos, cannabinoides, éxtasis, benzodiazepinas, inhalantes y cafeína (Calvo, 2004). Las drogas pueden repercutir negativamente en el feto y el neonato, tanto de forma precoz como tardía. Suele padecer estrés fetal, evacuación de meconio y la posibilidad de su aspiración, prematuridad y bajo peso. La reducción del perímetro cefálico, el aumento de malformaciones congénitas, la fragilidad y las rupturas cromosómicas, y los infartos

cerebrales también se han descrito en recién nacidos, así como anomalías en el comportamiento neurológico. Las infecciones (sepsis, sífilis, SIDA, hepatitis B y C) se ven favorecidas por el estilo de vida de la madre y por el mal entorno familiar y social. En etapas tardías, se pueden observar alteraciones en el desarrollo neuromotor y en el comportamiento (agresividad, hiperactividad), retrasos madurativos, retrasos pondoestaturales, etc. También se describe una mayor incidencia de síndrome de muerte súbita del lactante (Arroyo, 2012).

Si bien una nutrición adecuada es fundamental para el desarrollo infantil, lo mismo ocurre con el estado psicoemocional desde el embarazo. La depresión materna, la ansiedad, la soledad y el aislamiento social (pobreza, violencia, abuso, fallecimiento de la pareja, enfermedad psiquiátrica previa, entre otros) se asocian a complicaciones obstétricas, daños al desarrollo fetal, problemas emocionales y de comportamiento en la infancia (Raineri, 2015)

Por último, el medio ambiente es uno de los factores que influyen de forma más decisiva en las defunciones infantiles anuales, y es muy importante para la salud y el bienestar de las madres. Cada año mueren más de tres millones de menores de cinco años por causas y afecciones relacionadas con el medio ambiente. El aire interior y exterior y el agua contaminados, la falta de saneamiento adecuado, los riesgos de toxicidad, los vectores de enfermedades, la radiación ultravioleta y los ecosistemas degradados son factores ambientales de riesgo importantes para los niños, y en la mayor parte de los casos para sus madres también. En particular en los países en desarrollo, los riesgos y la contaminación ambientales contribuyen de manera muy importante a la mortalidad, la morbilidad y la discapacidad infantiles asociadas a las enfermedades respiratorias agudas, enfermedades diarreicas, traumatismos físicos, intoxicaciones, enfermedades transmitidas por insectos e infecciones perinatales. La mortalidad y la morbilidad infantiles debidas a causas como la pobreza y la malnutrición también van asociadas a modalidades insostenibles de desarrollo y a la degradación del medio ambiente urbano o rural (OMS, 2002).

# 6.

Programación,  
plasticidad y  
epigenética  
de los  
primeros mil  
días

Gran parte del interés científico sobre los efectos de la nutrición materna en el curso y resultado del embarazo proviene de estudios realizados en la primera mitad del siglo XX. Las hambrunas durante la Segunda Guerra Mundial en Europa y Japón produjeron efectos tanto negativos como positivos para la fertilidad y el recién nacido. Los habitantes de muchas regiones holandesas experimentaron graves disminuciones en la provisión de alimentos durante un periodo de ocho meses en la Segunda Guerra Mundial (1943-1944), a causa de la ocupación de las ciudades principales por el enemigo. El consumo solamente promediaba cerca de 1,100 calorías y 34 g de proteínas por día, el aporte alimenticio fue bajo y el invierno crudo (Brown, 2014).

En los registros guardados, se mostró una aguda disminución de más de 50% de los índices de embarazo durante la hambruna, efecto atribuido a la ausencia e irregularidad de los periodos menstruales. El peso al nacer se redujo 372 g en promedio, el nacimiento de niños con bajo peso aumentó 50% y los índices de muerte infantil se acrecentaron. El peso al nacer no se “recuperó” por completo en los niños nacidos de mujeres expuestas a escasez de alimentos al inicio del embarazo, aunque recibieran suficiente comida en etapas posteriores (Lumey, 1997).

En los estudios realizados en los últimos 30 años en adultos nacidos después de la hambruna invernal holandesa (la cohorte de la hambruna holandesa), se observaron relaciones entre el momento de la escasez durante el embarazo y los resultados de salud del producto en la edad adulta (Gabory, 2011).

A diferencia de los holandeses, la población de Leningrado (actualmente San Petersburgo) en 1942 experimentó privaciones moderadas en el estado nutricional y la calidad de vida antes de la hambruna. Al igual que en el caso de las mujeres embarazadas de Holanda, la hambruna de Leningrado condujo a un consumo promedio de 1,100 calorías por día. Los índices de infertilidad y bajo peso al nacer aumentaron más de 50%, las tasas de muerte infantil se elevaron y el peso al nacer disminuyó en promedio 535 g durante este periodo. Además, las cifras de recién nacidos pretérmino aumentaron (Antonov, 1947).

La escasez de alimentos en Japón después de la Segunda Guerra Mundial tuvo efectos reproductivos similares a los observados en Holanda. En términos generales, las mujeres japonesas contaban con buena nutrición antes de la escasez. La falta de alimentos antes



y después del embarazo se reflejó en disminución de la fertilidad en las mujeres y una reducción promedio de 200 g en el peso al nacer. Las mejoras sociales y económicas que ocurrieron en Japón después de la guerra condujeron a un aumento en la disponibilidad de muchos alimentos. Este mayor nivel de nutrición alcanzado durante los años de posguerra en Japón se acompañó de aumentos importantes en el tamaño de los recién nacidos y de niños japoneses (Gruenwald, 1967).

La hambruna de China de 1959-1961 fue la más grande en la historia de la humanidad y afectó primordialmente a individuos que vivían en áreas rurales. Existe poca información relacionada con la dieta y estilos de vida del pueblo chino durante esa época. Con base en datos disponibles, se ha concluido que la exposición a la hambruna durante el embarazo se asocia con gran reducción en partos y con aumento del triple en las probabilidades de presentar hipertensión y del doble en el riesgo de esquizofrenia en adultos (Jowett, 1991; Huang, 2010).

En diversas partes del mundo siguen existiendo carencias de alimentos que afectan la fertilidad y el curso y desenlace de los embarazos de manera adversa. Estos efectos se han vuelto predecibles, al punto en que los descensos en fertilidad y en el tamaño y vitalidad de los neonatos se consideran parte de las consecuencias de este tipo de desastres. Por ejemplo, el sitio de Sarajevo, que disminuyó la disponibilidad de alimentos de 1993-1994, condujo a una reducción en la ingesta de calorías y nutrimentos durante el embarazo, a una reducción del peso materno y del peso de los neonatos, y a un aumento en los índices de mortalidad perinatal y de anomalías congénitas (Simic, 1995).

Este resultado sustenta la idea de que la trayectoria del crecimiento fetal puede establecerse al inicio de la gestación y que las privaciones nutricionales tempranas limitan el crecimiento fetal sin importar la ingesta alimentaria posterior durante el embarazo. Se sospecha que existe la probabilidad de que los mecanismos epigenéticos representen una función importante en las relaciones entre la hambruna prenatal y los desenlaces adversos posteriores en la vida (Brown, 2014).

El trabajo de Sir David Barker, en la década de 1980, mostró una diversa colección de observaciones para lograr un nuevo campo de investigación, que estudia esta relación. El reporte mejor conocido y más detallado se basó en expedientes de bienestar infantil del condado de Hertfordshire, que contenían información sobre el peso al nacer, el

crecimiento y desarrollo temprano, y se convirtieron en la base para un largo estudio de cohorte. El seguimiento de estos niños mostró que las tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular disminuyeron progresivamente, mientras el peso al nacer se acercaba más al ideal. La presión arterial y los niveles de colesterol mostraron tendencias equivalentes. El trabajo de Barker llamó la atención del fisiólogo fetal Geoffrey Dawes, quien lo presentó con sus colegas cerca de La Spezia, Italia, en 1989. La primera reunión sobre “Orígenes fetales de las enfermedades en el adulto” se llevó a cabo en Sydney en 1994, y reunió al grupo de científicos más amplio que se encontraban en contacto con Barker. Esta reunión lanzó una serie de reuniones anuales cada vez más grandes. Bajo el liderazgo de David Barker, se creó el Consejo para los orígenes fetales de las enfermedades del adulto, con John Challis como presidente. En el segundo congreso, en Reino Unido en 2003, se decidió que el consejo sería reformado como una sociedad académica, DOHaD, con Peter Gluckman como presidente y Mark Hanson como secretario (Gluckman, 2016).

### **6.1 LA PROGRAMACIÓN FETAL Y LA PLASTICIDAD DEL DESARROLLO**

Según la teoría del “DOHaD”, las alteraciones en el crecimiento fetal dan lugar a adaptaciones del desarrollo que programan la vulnerabilidad a enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas en etapas posteriores de la vida. La programación es un fenómeno por el cual una alteración irreversible a largo plazo, en estructura o metabolismo, es inducida por un estímulo relativamente breve. Durante el crecimiento fetal, los cambios en el medio nutritivo y hormonal en períodos críticos pueden alterar la expresión del genoma fetal, dando lugar a efectos permanentes en una serie de funciones y estructuras fisiológicas. Una amplia gama de órganos y sistemas pueden ser programados por el ambiente intrauterino (Delisle, 2002).

La reprogramación refleja las adaptaciones metabólicas, fisiológicas y endocrinas que el feto emprende cuando los substratos o el oxígeno son escasos por una razón u otra. Los acontecimientos significativos de la vida temprana reformulan estos programas, probablemente como adaptaciones para asegurar la supervivencia temprana (Lane, 2014).

La capacidad del genotipo para producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes entornos se denomina "plasticidad" (la capacidad de una célula, tejido u órgano para reaccionar a un estímulo o lesión externa mediante la alteración de su estado, o incluso su destino) (Martínez, 2013). El tiempo en que la plasticidad es máxima parece ser durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la variación fenotípica heredable en una etapa posterior también es posible debido a la capacidad del individuo para responder a señales ambientales.

La plasticidad de desarrollo procura adaptar la expresión de genes para producir un fenotipo más adecuado para el medio ambiente predicho. Cuando el fenotipo resultante corresponde con su entorno, el organismo se mantendrá saludable. Cuando hay una discrepancia, la capacidad del individuo para responder a los retos ambientales puede ser inadecuada y el riesgo de enfermedad aumenta. Así, el grado de la falta de coincidencia determina la susceptibilidad del individuo a las enfermedades crónicas. Las condiciones ambientales que se experimentan en la vida temprana pueden influir profundamente en la biología humana y la salud a largo plazo. La nutrición temprana en la vida y el estrés son algunos de los ejemplos mejor documentados de tales condiciones porque influyen en el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares en los adultos (Portha, 2014).

Las respuestas de adaptación o plasticidad son de dos tipos. El primer tipo es la respuesta adaptativa de anticipación o predicción, donde el organismo en desarrollo pronostica el futuro entorno y ajusta su trayectoria fenotípica en consecuencia. El segundo tipo son las respuestas de adaptación inmediatas que promueven la supervivencia materna o fetal a corto plazo con algunas ventajas en su vida posterior. Debido a que estos dos tipos de respuestas de adaptación tienen un costo significativo, cada miembro de una especie hace un análisis de costo-beneficio para determinar el verdadero valor de una respuesta adaptativa. Dentro de las respuestas de adaptación, el organismo puede ajustar un equilibrio entre los cambios fenotípicos para asegurar su supervivencia a corto plazo a expensas de una ventaja a largo plazo (Gluckman, 2006).

El crecimiento y el desarrollo humano son procesos orquestados de eventos bien reconocidos y predecibles con cinco etapas de la vida preadulta superpuestas, aunque distintas: la prenatal, infantil, niñez, juvenil, y la fase de crecimiento puberal. Los períodos de transición entre estas fases son ventanas sensibles de la plasticidad del desarrollo.

Con la disminución de la sensibilidad, las transiciones entre fases son períodos de plasticidad adaptativa, y la regulación multifactorial de crecimiento durante cada fase refleja la interacción entre factores genéticos, hormonales, ambientales y psicosociales (Hochberg, 2011).

La embriogénesis temprana es un período crítico para el establecimiento del epigenoma. El exceso dietético o deficiencias en los nutrientes clave necesarios para el proceso de metilación pueden alterar los patrones epigenéticos. Estas alteraciones epigenéticas ambientalmente inducidas pueden mantenerse durante toda la vida, influir en la expresión génica y causar cambios en los rasgos fenotípicos. Un creciente cuerpo de evidencia sugiere que la regulación epigenética puede ser uno de los mecanismos moleculares que juegan un papel importante en la fundación de la programación fetal (Chmurzynska, 2010).

### **6.2 LA EPIGENÉTICA Y SUS MECANISMOS ASOCIADOS**

La palabra "epigenética" significa literalmente "en adición a los cambios en la secuencia genética". El término ha evolucionado para incluir cualquier proceso que altera la actividad o función del gen sin cambiar la secuencia de DNA, y conduce a modificaciones que se pueden transmitir a las células hijas (Ray, 2006).

Aunque prácticamente todas las células de un organismo contienen la misma información genética, no todos los genes se expresan simultáneamente en todos los tipos de células. En un sentido más amplio, los mecanismos epigenéticos median los perfiles de expresión de genes diversificados en una variedad de células y tejidos en organismos multicelulares. La transmisión estable de información durante la división celular basada en los niveles de expresión de genes, aparte de los que se derivan de la secuencia de DNA en sí, se define como herencia epigenética. Para la mayoría de tipos de células en el cuerpo, estas marcas epigenéticas quedan fijadas una vez que la célula se diferencia o sale del ciclo celular. Sin embargo, en etapas discretas del desarrollo, y en algunas situaciones de enfermedad, algunas células se someten a una "reprogramación" epigenética significativa, que implica la eliminación o la modulación de sus marcas epigenéticas (Reik, 2001; Surani, 2001).

La reprogramación epigenética implica la eliminación de las marcas epigenéticas en el núcleo, seguido por el establecimiento de un conjunto diferente de marcas. El correcto o incorrecto, manejo de estos periodos de alta sensibilidad puede tener efectos significativos a corto plazo y largo plazo sobre el individuo y su progenie. La fisiología y la fisiopatología de la dinámica de la reprogramación epigenética pueden ser estudiadas en cuatro fases distintas: la fecundación (Dean, 2003), el desarrollo embrionario temprano (Seki, 2005), la gametogénesis (Walsh, 1998), y la reprogramación durante el resto de la vida (Richardson, 2003).

La expresión génica está modulada por la regulación epigenética. Este mecanismo proporciona la activación o silenciamiento de determinados genes de acuerdo a la herencia epigenética establecida previamente, los que proporcionan un buen desarrollo del organismo y la diferenciación de células y tejidos. Cuando las células se han diferenciado, las marcas epigenéticas se fijan y proporcionan una actividad estable, adquiriendo cada célula sus propias características epigenéticas. La transcripción es posible cuando la secuencia de DNA del gen está disponible para factores de transcripción, por lo que el control epigenético es proporcionado por la metilación del DNA, modificación de histonas, remodelación de la cromatina y RNAs no codificantes. Aunque son básicamente distintos, estos mecanismos son a menudo interdependientes y pueden ser sinérgicos (Nafee, 2008):

**RNAs no codificantes.** Diversas clases de RNA han emergido como reguladores clave de la expresión génica, estabilidad genómica y defensa contra elementos genéticos foráneos. Mediante diversos mecanismos, modifican la estructura de la cromatina y silencian eventos transcripcionales inapropiados, así como reclutan a los complejos implicados en los demás mecanismos epigenéticos (Holoch, 2015).

**Modificaciones de histonas.** Las colas amino (N)-terminal en la estructura básica de las proteínas histonas pueden sobresalir de su propio nucleosoma y tener contacto con nucleosomas adyacentes. Las modificaciones químicas de estas colas (metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, etc.) afectan las interacciones internucleosomales, y la estructura general de la cromatina, no solamente

por estar ahí, sino que también reclutan enzimas remodeladoras, modificando la transcripción (Bannister, 2011).

**Remodelación de la cromatina.** La modificación química de los diversos aminoácidos que constituyen las proteínas histonas puede alterar significativamente la estructura de la fibra de cromatina, su grado de compactación y, por lo tanto, el acceso de la maquinaria de transcripción al DNA. Las conformaciones básicas que adquiere la cromatina son eucromatina y heterocromatina (Bannister, 2011).

**Metilación del DNA.** El estado de metilación de los residuos de citosina, dentro del contexto de dinucleótidos (o sitios) CpG y de las islas CpG, proporciona un mecanismo importante para distinguir genes que están activos de los que no lo están. La metilación en el DNA está asociada con el silenciamiento transcripcional del gen asociado.

La metilación en la quinta posición de la base nitrogenada citosina es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas y con un mecanismo mejor entendido, aparte de que está bien conservada entre la mayoría de los modelos de plantas, animales y hongos. Históricamente, la metilación del DNA fue descubierta en los mamíferos tan pronto como se identificó al DNA como material genético. Ahora es bien reconocido que la metilación del DNA, en conjunto con otros reguladores, es un importante factor epigenético que influyen en la actividad de los genes.

En los mamíferos, la metilación de citosina se restringe principalmente al contexto CpG simétrico. Los genomas de mamíferos se encuentran globalmente reducidos en CpG y, de los aproximadamente 28 millones de CpG en el genoma humano, el 60-80% se encuentran generalmente metilados. Menos de 10% de CpG se producen en regiones CG-densas que se denominan islas CpG; estas son prevalentes en los sitios de inicio de transcripción de genes reguladores del desarrollo, donde son muy resistentes a la metilación del DNA. Este paisaje bimodal representa la perspectiva global en la comprensión de la metilación del DNA (Moore, 2012).

La 5mC sólo representa aproximadamente el 1% del total de los ácidos nucleicos en el genoma humano. La mayoría de la metilación del DNA se produce en las citosinas que preceden a un nucleótido de guanina o sitios CpG. En general, los genomas de mamíferos se encuentran reducidos en sitios CpG, posiblemente como resultado del potencial mutagénico de las 5mCs, que pueden desaminarse a timina. Los sitios CpG restantes se extienden en todo el genoma en el que están fuertemente metilados, con la excepción de las islas CpG. La metilación del DNA es esencial para silenciar elementos retrovirales, la regulación de la expresión génica específica de tejido, la impronta genómica, y la inactivación del cromosoma X. Es importante destacar que la metilación del DNA en diferentes regiones genómicas puede ejercer diferentes influencias en las actividades de genes basados en la secuencia genética subyacente. A continuación, se describen las principales distribuciones de la metilación del DNA, al igual que en la **Figura No. 7.**

**Regiones intergénicas.** Aproximadamente, el 45% del genoma de los mamíferos consta de elementos de transposición y virales que son silenciados por la metilación de relleno. La gran mayoría de estos elementos se encuentran inactivados por la metilación del DNA o por mutaciones adquiridas con el tiempo, como resultado de la desaminación de 5mC. Dentro de las regiones intergénicas, una de las principales funciones de la metilación del DNA es reprimir la expresión de los elementos genéticos potencialmente dañinos.

**Islas CpG.** Las islas CpG son tramos de DNA de aproximadamente 1000 pares de bases de longitud que tiene una densidad de CpG más alta que el resto del genoma, pero a menudo no están metiladas. La mayoría de los promotores de genes, aproximadamente el 70%, residen dentro de las islas CpG. En particular, los promotores de los genes constitutivos (“housekeeping”) se encuentran a menudo incrustadas en las islas CpG. La ubicación y la preservación de las islas CpG a lo largo de la evolución implican que estas regiones posean una importancia funcional. Se piensa que las islas CpG se han conservado evolutivamente para promover la expresión génica mediante la regulación de la estructura de la cromatina y la unión de factores de transcripción. El DNA se envuelve regularmente alrededor de las proteínas histonas que forman pequeñas secciones

empaquetadas, llamadas nucleosomas. Cuanto más estrechamente asociada con las proteínas histonas se encuentra el DNA, menos permisivo es para la expresión génica. Una de las características comunes de las islas CpG es que contienen menos nucleosomas que otros tramos de DNA. Los pocos nucleosomas con los que se asocian, a menudo contienen histonas con modificaciones implicadas en la mejora de la expresión génica. Como muchos sitios de unión de factores de transcripción son ricos en GC, las islas CpG son propensas a aumentar la unión a sitios de inicio de la transcripción. A pesar de su falta de elementos promotores comunes, las islas CpG mejoran la accesibilidad al DNA y promueven la unión de factores de transcripción (Ramirez-Carrozzi, 2009; Choi, 2010).

La metilación de islas CpG resulta en el silenciamiento estable de la expresión génica. Como las islas CpG se asocian con el control de la expresión génica, sería de esperar que se mostraran patrones tejido-específicos de la metilación del DNA. Aunque las islas CpG en regiones intragénicas y del cuerpo de los genes pueden tener patrones de metilación específicos de tejido, las islas CpG asociadas con los sitios de inicio de la transcripción rara vez se muestran patrones de metilación específicos de tejido. En lugar de ello, regiones llamadas “shores (costas)”, ubicadas a 2 Kb del cuerpo de las islas CpG, y “shelves”, a 4 Kb del cuerpo de las islas, tienen patrones de metilación específicos de tejido altamente conservados (Bibikova, 2011). Al igual que la metilación de las islas CpG, la metilación de las shores y shelves CpG está altamente correlacionada con expresión génica reducida. La metilación de las islas CpG puede afectar la unión de factores de transcripción, el reclutamiento de proteínas represivas de unión a metilo, y el silenciamiento estable de la expresión génica (Irizarry, 2009; Mohn, 2008).

**Cuerpo del gen.** Mientras la mayoría de los sitios CpG del genoma de mamíferos se encuentran metilados, los propios genes también deben contener metilación. El cuerpo del gen se considera la región del gen que sigue del primer exón porque la metilación del primer exón, como la metilación del promotor, conduce a silenciamiento génico. La evidencia sugiere que la metilación del DNA del cuerpo del gen se encuentra asociada con un mayor nivel de expresión génica en células en división. La forma en que la



metilación del DNA en el cuerpo del gen contribuye a la regulación de la expresión todavía no es clara (Moore, 2012).

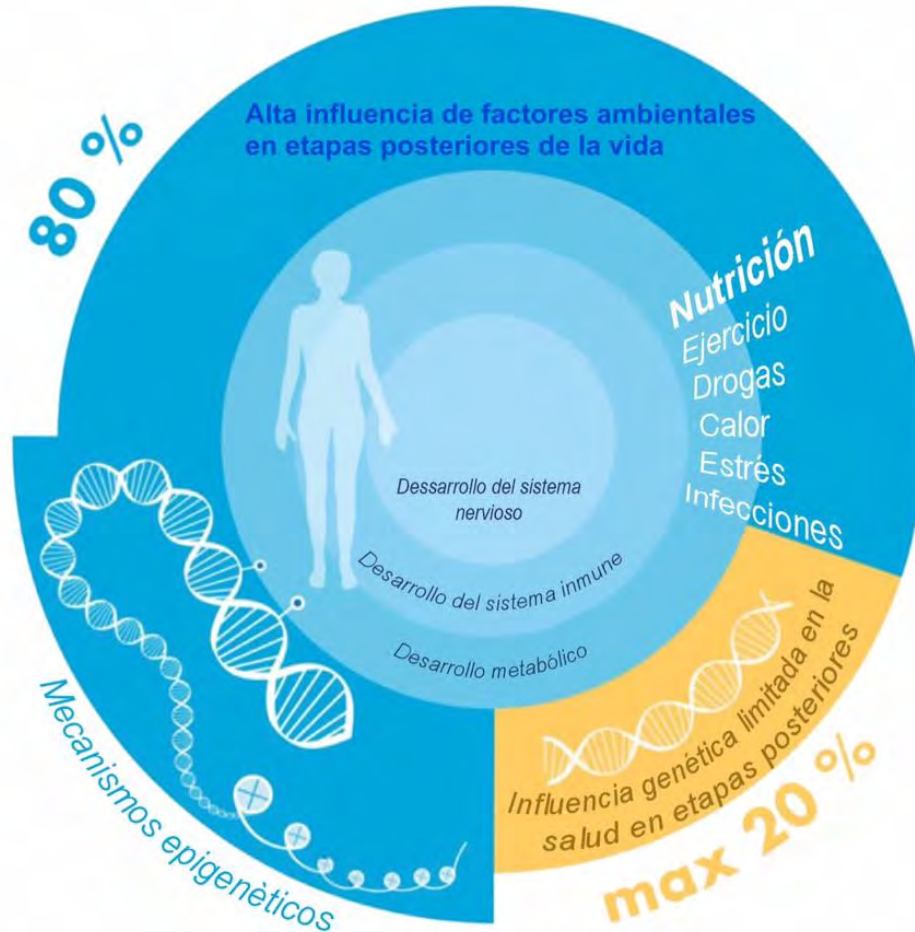


**Figura No. 7** Distribución de los sitios CpG en genomas de mamíferos. A. Los dinucleótidos CpG se encuentran generalmente altamente metilados, mientras que las islas CpG asociadas con los promotores génicos (sitios de inicio de la transcripción, TTS) tienen patrones globales no metilados. Además, existen islas CpG huérfanas de función desconocida, que se encuentran dentro de los cuerpos génicos (intragénicos) y entre los genes anotados (intergénicos). Las islas CpG no metiladas en los extremos 5' están correlacionadas positivamente con la actividad transcripcional activa (B), mientras que los genes que están hipermetilados en sus islas CpG de promotores son reprimidos (C). Círculos vacíos, CpGs no metilados; círculos rellenos, CpGs metilados; Caja verde, exones transcritos; Caja roja, exones silenciados; Los estados transcripcionales están representados por la flecha negra (activo) y cruz negra (inactivo). Modificado de Meng (2015).

### 6.3 DINÁMICA EPIGENÉTICA EN LOS PRIMEROS MIL DÍAS

Los acontecimientos de la vida temprana (prenatal y primeros eventos posnatales) pueden iniciar cambios a largo plazo en la vida del individuo, lo que aumenta el riesgo a algunas enfermedades que podrían aparecer mucho más tarde (Nafee, 2008).

El desarrollo individual está determinado no sólo por la genética, sino a través de una compleja interacción entre los genes y el medio ambiente, que se encarga de estudiar la epigenética. Se ha estimado que el 20% de la salud a lo largo de toda la vida puede explicarse por genes heredados. Esto significa que al menos el 80% del riesgo de enfermedad en la vida posterior se debe al medio ambiente, incluyendo la nutrición y el estilo de vida (**Figura No. 8**) (Nutricia Research, 2015).



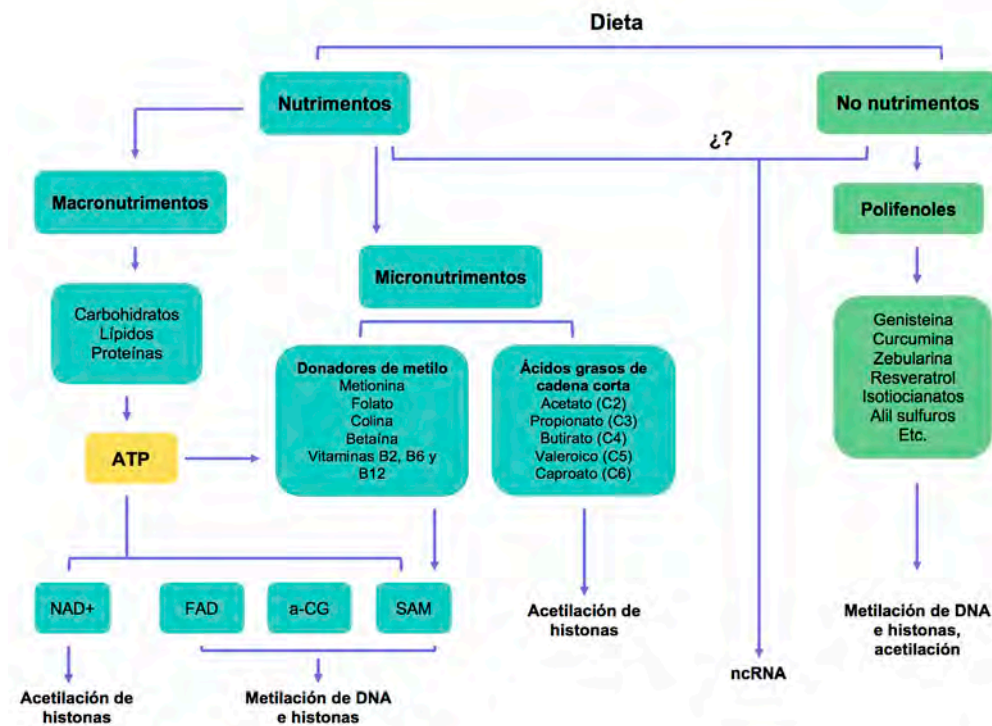
**Figura No. 8** Influencia de la genética y del medio ambiente en la salud del individuo. La genética tiene una influencia limitada (máxima del 20%). Por otra parte, los factores ambientales tienen una alta influencia en la salud del individuo (80%), implicándose en el desarrollo del cerebro, inmune y metabólico, mediante mecanismos epigenéticos. Modificado de Nutricia Research (2015).

El crecimiento del producto se encuentra influenciado por sus genes, no obstante, estudios reportan que usualmente está limitado por los nutrientes y oxígeno que recibe. La madre parece ejercer un mayor efecto en el crecimiento fetal que el padre. En estudios recientes se ha demostrado que el 62% de las variaciones individuales en el peso al nacer se deben al ambiente intrauterino, 20% a los genes maternos y 18% a los genes fetales (Barker, 2001).

Los estímulos ambientales, como la nutrición, actuando durante el desarrollo fetal y/o neonatal pueden producir cambios permanentes en la estructura y función celular-tisular, a través de la modificación permanente la expresión de genes. Se ha propuesto, y en la

actualidad está ampliamente aceptado, que la influencia de la nutrición temprana produce cambios epigenéticos que inducen a la salud y la enfermedad tardía (Horton, 2008; Victora, 2008).

Los nutrientes pueden ser subdivididos arbitrariamente en dos categorías: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son los carbohidratos, proteínas y lípidos. Los macronutrientes son metabolizados en la célula, dando lugar a un número de señales intracelulares, incluyendo SAM, FAD,  $\alpha$ -cetoglutarato o  $\text{NAD}^+$ , que, a su vez, pueden influir en el establecimiento de las marcas epigenéticas. Se ha propuesto recientemente que el ATP puede ser un enlace común entre la nutrición (es decir, el estado energético de la célula) y la generación de los múltiples segundos mensajeros que inducen adaptaciones fisiológicas epigenéticas adecuadas a las condiciones energéticas intracelulares. Los donadores del grupo metilo se incluyen en la clase de micronutrientes, ya que están presentes en una concentración muy baja en una dieta regular (Chalkiadaki, 2012). Esta clasificación se muestra en la **Figura No. 9**.



**Figura No. 9** Modificaciones epigenéticas mediadas por los componentes de la dieta. Modificado de Jiménez (2012).

En la actualidad, hay evidencias que apoyan el hecho de que las histonas pueden sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales, incluyendo la metilación, acetilación, sumoilación, biotilación, fosforilación, ubiquitinación o ribosilación ADP, que alteran su actividad y, por lo tanto, los estados de la cromatina. Existe evidencia de que los factores nutricionales pueden influir en algunas modificaciones de las histonas, principalmente actuando en la presencia de sustratos y cofactores.

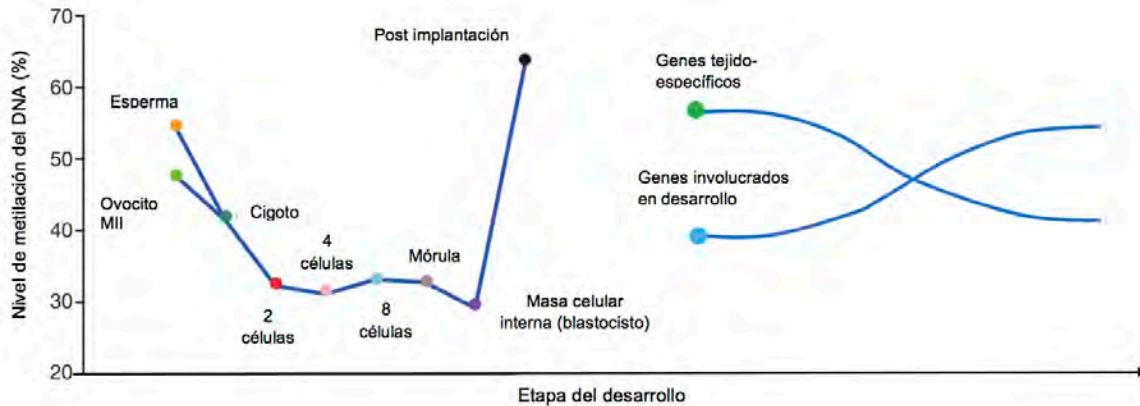
Recientemente, los RNAs no codificantes han ampliado la lista de los mecanismos moleculares con potencial de regulación epigenética. Uno de los RNAs no codificante más ampliamente estudiados son los microRNAs (miRNAs), que pueden regular la expresión de hasta el 30% del genoma humano, principalmente a través de la orientación post-transcripcional del mRNA. Recientes evidencias apoyan que una amplia gama de nutrimentos, incluyendo la alimentación de lípidos, proteínas, etanol, vitamina E, hormonas y un número de polifenoles puede alterar la expresión de miRNAs específicos (Zhang, 2009a; Wang, 2009).

A nivel molecular, no está bien caracterizado la manera en que la nutrición modula la abundancia de miRNA, pero se propone que se puede lograr a través de la regulación transcripcional, a través de la RNA-Pol II, de una manera similar a la del mRNA (Cheung, 2009).

Los nutrimentos pueden modificar el patrón de metilación del DNA, ya sea a escala global o en sitios específicos. Se ha propuesto que la nutrición influye en los patrones de metilación del DNA en tres posibles maneras: 1) al proporcionar directamente los sustratos necesarios para la propia metilación, 2) al proporcionar los cofactores que modulan la actividad enzimática de las DNA metiltransferasas (DNMTs), que catalizan la incorporación de grupos metilo en el DNA y, 3) mediante la alteración de la actividad de las enzimas que regulan el ciclo de la metionina (también conocido como ciclo de un carbono), que a su vez proporcionan la biodisponibilidad de grupos metilo. Los tres mecanismos no son mutuamente incompatibles y pueden operar juntos en el tiempo. (Jiménez, 2012).

La mayoría de los patrones de metilación de relleno del genoma se encuentran estáticos a través de los tejidos y a lo largo de la vida, cambiando sólo en contextos localizados, mientras procesos celulares específicos se activan o apagan. Las excepciones notables

están en la línea germinal y durante el desarrollo previo a la implantación (Moore, 2012). El estado general de la metilación durante la etapa embrionaria y fetal se muestra en la **Figura No. 10**.



**Figura No. 10** Dinámica de la metilación del DNA durante el desarrollo humano embrionario y fetal. Primero se muestra el nivel de metilación a través de cada etapa temprana de los embriones, desde el nivel de ambas células germinales, la fecundación, el cigoto y sus etapas de división, mórula, blastocisto, y después de la implantación. A la derecha, se muestra el nivel de metilación de grupos de genes específicos después de la implantación, aún en desarrollo prenatal. MII: meiosis II. Modificado de Guo (2014) y Slieker (2015).

### 6.4 EL ORIGEN DE LAS ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES ASOCIADAS CON CAMBIOS EPÍGENÉTICOS EN LA NIÑEZ TEMPRANA

En la última década, el pensar en el riesgo de enfermedades crónicas ha cambiado sustancialmente. En contraste con la idea anterior de que el riesgo de enfermedad comienza en la infancia o en la edad adulta, estudios que prueban la hipótesis de DOHaD indican que los riesgos comienzan en el útero. El concepto de que el riesgo de las enfermedades crónicas se puede establecer en el útero está fuertemente apoyado por estudios en animales e investigaciones en seres humanos. Gran parte de la evidencia que relaciona exposiciones intrauterinas con las enfermedades en la vida adulta de seres humanos proviene de estudios que muestran un mayor riesgo de altos niveles de grasa visceral, obesidad, enfermedades del corazón, hipertensión, diabetes tipo 2, diabetes

gestacional, y bronquitis crónica en recién nacidos de talla baja. La nutrición materna se cree que juega un papel fundamental en los mecanismos que conducen al riesgo de enfermedades más adelante porque es un factor importante que afecta el crecimiento y desarrollo del feto (Brown, 2014).

A la luz de gran cantidad de datos epidemiológicos, Barker propuso la hipótesis del fenotipo ahorrativo para explicar las relaciones entre los patrones de crecimiento inicial y la salud a largo plazo. Esto sugirió que las relaciones entre el peso al nacer y las enfermedades metabólicas surgieron debido a la respuesta de un feto en crecimiento a un medio ambiente nutricional subóptimo. La parte central de esta hipótesis era la sugerencia de que durante los momentos de privación nutricional, el crecimiento del feto adopta una serie de estrategias para maximizar sus posibilidades de supervivencia después del nacimiento en condiciones similares de mala nutrición. Estas adaptaciones incluyen la preservación de crecimiento del cerebro (a expensas de otros tejidos tales como músculo esquelético y el páncreas endocrino) y la programación del metabolismo de una manera que estimule a almacenamiento de nutrimentos cuando estaban disponibles. Esto no tiene ningún efecto perjudicial y de hecho es beneficioso para la supervivencia si el feto nace en condiciones de mala nutrición. Por lo tanto, en las poblaciones donde hay desnutrición crónica, estas adaptaciones son beneficiosos y la prevalencia de enfermedades metabólicas es baja. Sin embargo, se propusieron también las consecuencias perjudiciales de la programación durante el desarrollo que pueden surgir si el feto nació en condiciones que difieren de las experimentadas en el útero. El desequilibrio entre los ambientes prenatal y postnatal temprano pone en conflicto la programación que se produjo durante la vida fetal y predisponen a la descendencia al posterior desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta. Para reflejar la evidencia de que los períodos críticos de la vulnerabilidad a las influencias ambientales se extienden más allá del período fetal, el concepto de que los acontecimientos en la vida temprana afectan la salud a largo plazo ahora se conoce generalmente como “Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD), o “Hipótesis de los orígenes de la salud y la enfermedad en el desarrollo” (Portha, 2014).

La teoría de DOHaD menciona que las exposiciones ambientales durante periodos críticos del desarrollo pueden causar cambios discretos en ciertas funciones biológicas,

que predisponen al individuo a enfermedades y disfunciones en etapas posteriores de la vida (Barnes, 2016).

El proceso de crecimiento y desarrollo humano en el útero y durante los dos primeros años de vida no es un periodo inflexible o determinado únicamente por los genes. También se ve influido por la exposición ambiental, mediado por la plasticidad del desarrollo. Las exposiciones ambientales modifican el desarrollo a través de mecanismos epigenéticos que programan cambios metabólicos en la actividad genética y no en la estructura del DNA. Los mecanismos epigenéticos influyen en el crecimiento y desarrollo al silenciar la expresión de ciertos genes y activar la de otros. Por ejemplo, los mecanismos epigenéticos pueden desarrollar, en respuesta a la desnutrición materna, la reducción de la multiplicación celular en los riñones sin afectar el crecimiento del cerebro. Los cambios epigenéticos pueden durar a lo largo de todas las divisiones de la célula para el resto de su vida y para varias generaciones (Wu, 2004).

Los efectos epigenéticos en la función de los genes son iniciados por respuestas adaptativas que el feto hace a las señales de la madre sobre su salud y condición física. La salud de la madre y el estado físico se determinan por factores como la genética, la dieta, el nivel de grasa corporal, y las enfermedades. Los indicadores biológicos de estas condiciones son transferidos al feto por la sangre de la madre. El feto se adapta a las señales del medio ambiente que se han enviado por la madre mediante la modificación de la función de ciertos genes. Estas modificaciones pueden fomentar la supervivencia del feto en el útero y en el futuro, si se da el mismo conjunto de circunstancias ambientales (Gabory, 2011).

Algunos estudios han demostrado un vínculo entre las exposiciones nutricionales maternas durante el embarazo y el riesgo de enfermedad más adelante en los recién nacidos con una amplia gama de pesos al nacer. Un aumento de peso mínimo alrededor de la mitad del embarazo, por ejemplo, se ha asociado con la presión arterial alta en los niños, y los bajos niveles de grasa corporal de la madre durante el embarazo con un mayor riesgo de enfermedades del corazón en la descendencia.

La hipótesis de que las exposiciones nutricionales maternas y fetales influyen en el riesgo de enfermedad más adelante está ganando apoyo y reconocimiento. Sin embargo, hay muchas preguntas sin una respuesta concreta: ¿Qué exposiciones nutricionales en

## Programación, plasticidad y epigenética de los primeros mil días

específico son responsables de los cambios en la función del gen y un mayor riesgo de enfermedades?, ¿Cuándo se presentan los períodos más vulnerables de la sensibilidad del feto a la mala nutrición?, ¿Qué niveles de energía y de disponibilidad de nutrimentos están relacionados con el funcionamiento óptimo de los genes?, ¿Cómo se pueden reparar los cambios epigenéticos perjudiciales de modo que correspondan a una persona adulta sana en lugar de un ser en desarrollo uterino o en la vida temprana?, entre otras. Actualmente, se está avanzando hacia la búsqueda de las respuestas a cada una de estas preguntas. Las implicaciones de las asociaciones entre la madre y la nutrición fetal y el riesgo de la enfermedad de adultos son inmensas (Brown, 2014).



**7.**

Antecedentes

En México, cada minuto nacen 5 personas (INEGI, 2014). A nivel nacional, hay poco menos de 31.1 millones de mujeres en edad fértil, que representan al 54.1% de la población femenina total. Se estima que, en la actualidad, la Tasa Global de Fecundidad asciende a 2.16 hijos por mujer (CONAPO, 2016). En México, una de cada cinco mujeres sufre complicaciones en el embarazo (Núñez, 2010), siendo las más comunes: preeclampsia (70.8%), hemorragia (11.7%), eclampsia (6.3%), sepsis (3.6%), entre otras (Mejía, 2012). La obesidad, aunque no se considera una complicación propia del embarazo, tiene una prevalencia del 11 al 22%, y representa un riesgo importante para las madres y sus productos (Nazar, 2014).

Estas complicaciones durante el embarazo tienen además un serio impacto sobre la salud de los recién nacidos. Existen numerosos estudios epidemiológicos referentes a la asociación entre eventos prenatales y enfermedades crónicas que se presentan durante el desarrollo precoz así como en la vida adulta. A nivel nacional, se ha mostrado un considerable aumento para las enfermedades crónicas (74.4% en 2009), correspondiendo a tres cuartas partes de la mortalidad general (DGIS, 2014).

Los factores epigenéticos son candidatos etiológicos de las enfermedades crónicas, ya que el estado epigenético es más dinámico en comparación con la secuencia de DNA, además de que puede ser alterado por aspectos del desarrollo y condiciones ambientales a las que esté expuesto el organismo. Adicionalmente, existe gran cantidad de evidencia experimental en humanos y otros animales que demuestra que, en las enfermedades crónicas, se observan patrones anormales de las marcas epigenéticas, pudiendo ser las bases moleculares que explican la predisposición a estas enfermedades (González, 2011).

Los cambios epigenéticos asociados con las enfermedades se producen a lo largo de toda la vida. Sin embargo, la labilidad del estado epigenético de los primeros estadios del desarrollo lleva a plantear la hipótesis que la asociación de los eventos adversos al inicio de la vida con una predisposición a enfermedades esté mediado por mecanismos epigenéticos. Entre las enfermedades que se podrían favorecer por este mecanismo están: la obesidad, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, depresión, trastornos ansiosos, adicciones, enfermedad coronaria, entre otras (Bedregal, 2010).

A partir de toda esta evidencia, surgió la línea de investigación conocida como DOHaD, que se encuentra sustentada por la primicia de que la exposición a diversos factores ambientales (extrínsecos e intrínsecos) durante las etapas prenatal y posnatal temprana son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas en etapas posteriores de la vida. Estos eventos se vinculan con los procesos de programación fetal y plasticidad del desarrollo que a su vez, se regulan a través de mecanismos epigenéticos.

La nutrición es uno de factores ambientales que más se ha conceptualizado en la teoría de DOHaD, y que más contribuye al establecimiento de marcas epigenéticas. La asociación entre los cambios en la dieta durante las ventanas específicas de desarrollo y modificaciones epigenéticas ha sido reportada en varios modelos animales. Constituyen una excelente herramienta para entender cómo los regímenes nutricionales o factores específicos de la dieta en particular pueden influir en el epigenoma. Las intervenciones nutricionales más ampliamente estudiadas incluyen:

- a. Restricción de proteínas: se utiliza con frecuencia como modelo para la desnutrición materna. Los genes que han reportado cambios en la metilación se encuentran implicados metabolismo lipídico alterado y esteatosis hepática (contribuyen a la resistencia a la insulina) y regulación del apetito en los roedores, pudiendo alterar el comportamiento de alimentación y explicar el desarrollo de la obesidad y las enfermedades relacionadas con ella.
- b. Restricción calórica global: es otro modelo de uso frecuente para la desnutrición materna. La desnutrición in útero en ratas reduce la expresión de genes que pueden contribuir a la resistencia total a la insulina y diabetes.
- c. Dieta alta en grasas: alteró la expresión y la metilación de genes que pueden influir en el comportamiento de preferencia a los alimentos de sabor agradable, asociado con la obesidad y el síndrome metabólico.
- d. Sobrealimentación neonatal: en ratas, aumentó la metilación en genes implicados en la regulación negativa de la ingesta de alimentos, promoviendo la obesidad. Del mismo modo, en un estudio de seguimiento, el exceso de nutrición neonatal aumentó la metilación media del promotor del receptor de insulina en el hipotálamo, induciendo resistencia a la insulina por parte del hipotálamo, lo que contribuye al desarrollo del síndrome metabólico.

Los genes implicados en estas modificaciones se encuentran resumidos en la **Figura No. 11**.

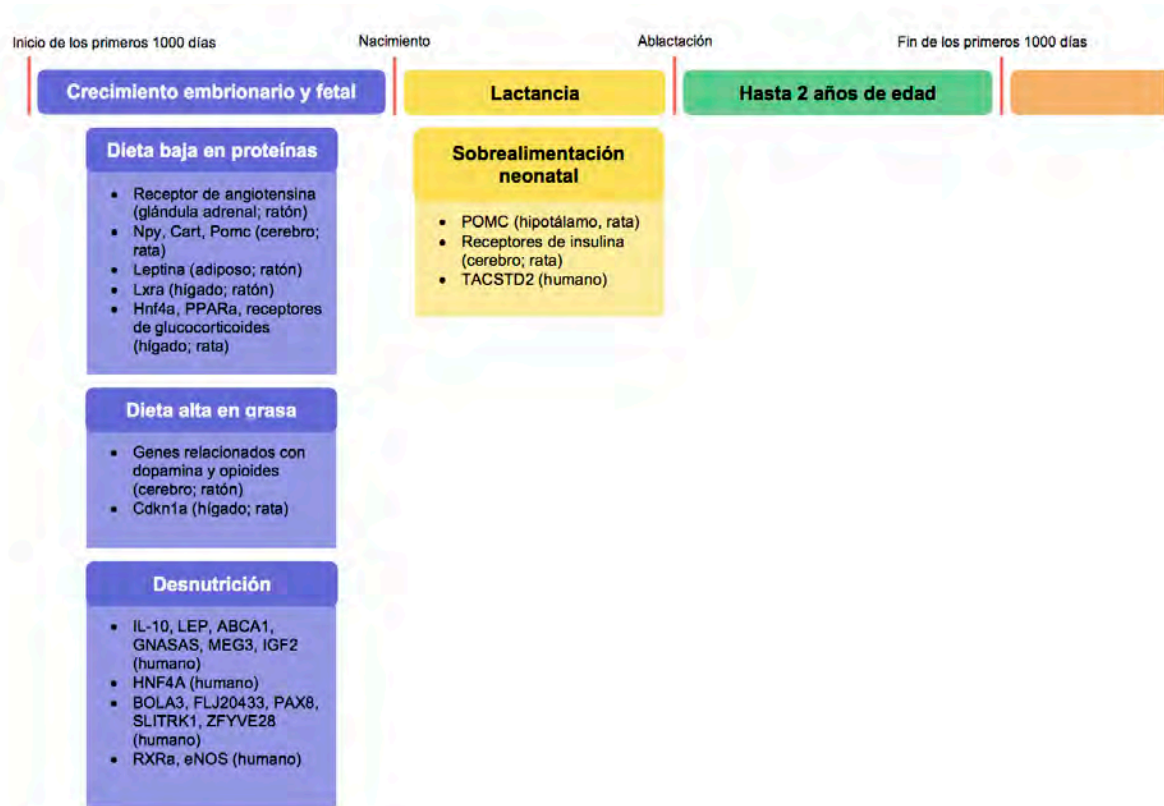
La nutrición durante las etapas tempranas del desarrollo puede inducir cambios permanentes en la expresión génica de células somáticas a través de las modificaciones epigenéticas. Los tres puntos importantes son: (1) la desnutrición materna influye en el epigenoma del feto; (2) algunas de las marcas epigenéticas establecidas durante el desarrollo temprano se mantienen estables hasta la edad adulta; y (3) la desnutrición perinatal causa tanto modificaciones epigenéticas específicas de locus como globales.

Respecto a la evidencia en humanos, existen datos suficientes respecto a los resultados de salud disponibles en las cohortes de la hambruna holandesa, que relacionan la nutrición fetal y la salud postnatal. En un estudio, se aisló el DNA de leucocitos en sangre de individuos que fueron afectados. Con ello, fue posible demostrar que el locus de IGF-2 se encontraba menos metilado en el grupo expuesto a hambruna. En un estudio posterior, se extendió el análisis a más genes. Curiosamente, se encontró que algunos de los cambios epigenéticos observados fueron sexo-específicos. Se especula que los cambios en la metilación de promotores de genes tales como *Lep* (implicado en la regulación de la saciedad) y *ABCA1* (implicado en el transporte de colesterol y la formación de HDL) pueden vincular la nutrición temprana con enfermedades metabólicas en el adulto.

Un conjunto de estudios muy recientes han determinado los patrones de metilación del DNA en las células de sangre del cordón umbilical. Se analizaron los patrones globales de la metilación del DNA en las células madre hematopoyéticas (CD34+) de sangre del cordón umbilical en crecimiento intrauterino restringido y bebés control por el análisis de microarreglos. El análisis bioinformático demostró que un pequeño subconjunto de 56 loci mostró diferencias significativas en la metilación entre los grupos. Estos genes estaban involucrados en procesos críticos para la función de células madre (ciclo y mantenimiento celular). Aún no está claro si estos cambios se mantienen estables hasta la edad adulta y puedan contribuir al riesgo de diabetes (o riesgo de enfermedades crónicas en general) más tarde en la vida.

En otra serie de estudios recientes, la metilación del DNA de varios candidatos se evaluó en sangre del cordón umbilical de dos poblaciones independientes de niños con peso

normal al nacer. Sorprendentemente, se encontró que la metilación de RXRa y eNOS, al nacer, se correlaciona con la adiposidad a los 9 años de edad. Estos estudios constituyen la prueba inicial para demostrar que la metilación del DNA al nacer podría ser un marcador molecular de gran alcance para el riesgo posterior a enfermedades (Jiménez, 2012).



**Figura No. 11** Resumen de los genes que mostraron expresión alterada en asociación con la metilación del DNA. Los resultados se agrupan en intervenciones nutricionales, y periodo de vida del individuo en el que fue estudiado. También se incluye tejido estudiado, y especie. Modificado de Jiménez (2012).

8.

Hipótesis

Los hijos nacidos de madres con obesidad y/o preeclampsia durante el embarazo presentan fenotipos antropométricos y metabólicos diferentes comparados con los hijos que estuvieron expuestos a embarazos normoevolutivos. La diferencia de los fenotipos durante los primeros años de vida es atribuible a perfiles distintos en el metiloma de DNA.

9.

Objetivos



## **9.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el perfil metilómico de DNA en niños menores de tres años que, durante su desarrollo gestacional, enfrentaron condiciones maternas adversas.

## **9.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

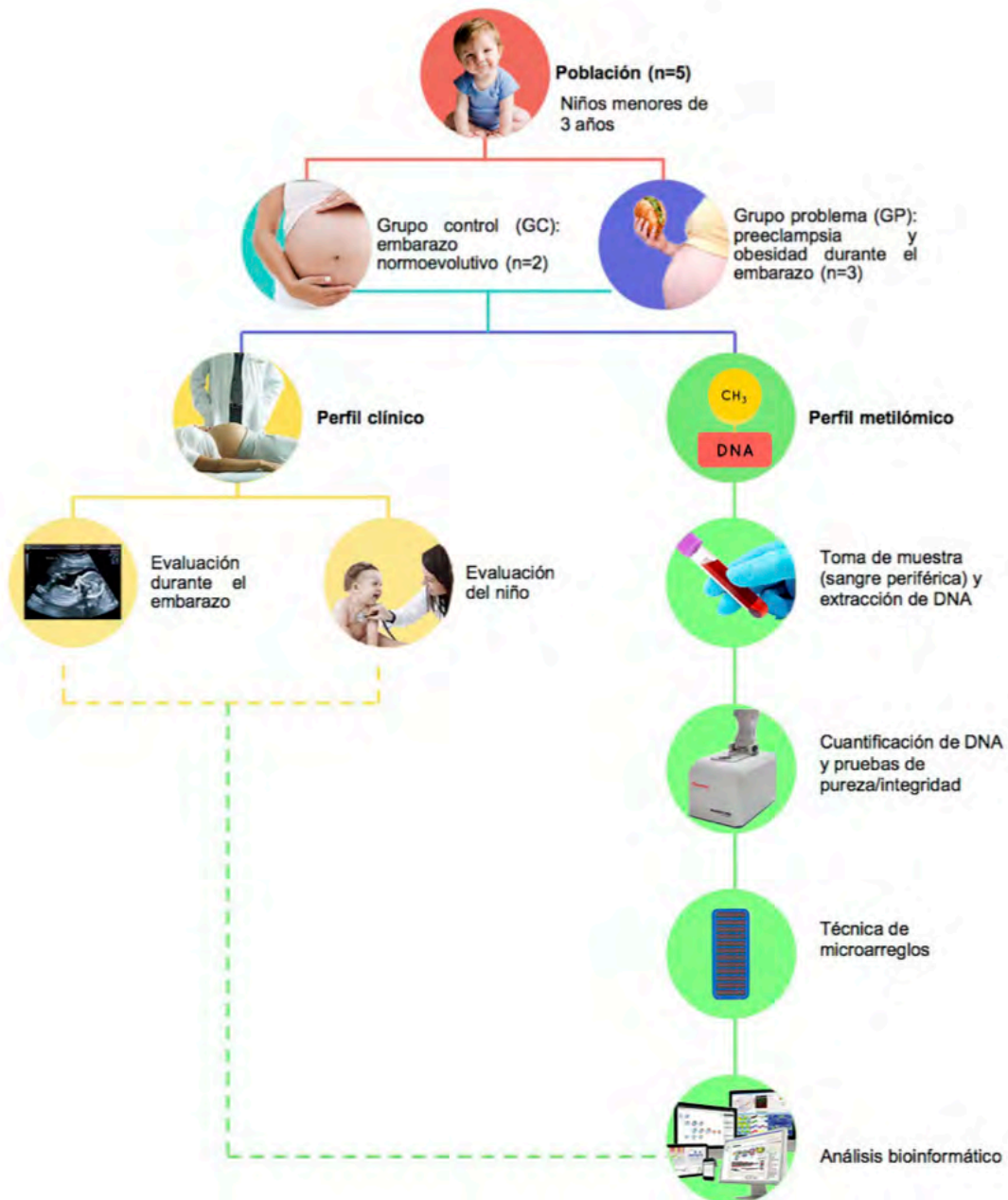
- Estandarizar las condiciones técnicas y metodológicas para la extracción del DNA en sangre total de niños menores de tres años.
- Establecer una tabla de criterios de evaluación cuantitativos y cualitativos durante el embarazo, para su clasificación con base a referencias mexicanas.
- Analizar la metilación del DNA genómico a través del método de microarreglos.
- Analizar e interpretar de los resultados obtenidos del perfil metilómico con programas bioinformáticos.

# 10.

## Metodología

La metodología que se implementó se muestra resumida en el esquema del siguiente subtítulo, y se explica detalladamente en el resto de los subtítulos pertenecientes a este tema.

### 10.1 ESQUEMA DE TRABAJO



## 10.2 POBLACIÓN ESTUDIADA

La población consiste en cinco niños nacidos en la Ciudad de México entre los años 2013 y 2014, menores de 3 años y reclutados por consentimiento informado (Anexo No. 1) a partir del seguimiento gineco-obstétrico previo de una cohorte perinatal en el Hospital Materno Infantil Inguarán de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México. Estos niños fueron evaluados y clasificados mediante un perfil clínico en grupo control (GC): compuesto por dos individuos que fueron productos de embarazos normoevolutivos y, un grupo problema (GP): compuesto por tres individuos productos de embarazos con obesidad y preeclampsia materna.

### 10.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Los criterios de inclusión y exclusión se enlistan en la siguiente tabla:

**Tabla No. 5** Criterios de inclusión y de exclusión para los grupos control (GC) y problema (GP)

Criterios de inclusión				Criterios de exclusión			
Grupo control		Grupo problema		Grupo control		Grupo problema	
Edad (niño)	<3	Edad (niño)	<3	Edad (niño)	>3	Edad (niño)	>3
IMC pregestacional	18.5-24.9	IMC pregestacional	>29.9	IMC pregestacional	≠18.5-24.9	IMC pregestacional	<29.9
Preeclampsia	No	Preeclampsia	Sí	Preeclampsia	Sí	Preeclampsia	No
				Otras complicaciones del embarazo	Sí	Otras complicaciones del embarazo	Sí
				Síndromes cromosómicos	Sí	Síndromes cromosómicos	Sí
				Síndromes metabólicos	Sí	Síndromes metabólicos	Sí
				Enfermedades crónicas	Sí	Enfermedades crónicas	Sí

### 10.3 PERFIL CLÍNICO

El perfil clínico se compone de dos partes: evaluación durante el embarazo y la evaluación del niño.

En la mujer embarazada, se llevaron a cabo consultas mensuales desde el segundo trimestre de gestación, en las que se evaluaron criterios antropométricos, historia clínica y hábitos, se realizaron ultrasonidos, y se tomaron muestras sanguíneas (para química sanguínea y biometría hemática), de orina (para examen general) y exudado vaginal. De igual forma, se consideraron criterios propios del parto. Se realizaron tablas de evaluación del embarazo para poder clasificar a los individuos en GC o GP, tomando en consideración los siguientes criterios en la mujer y la evaluación durante el progreso de su embarazo:

**Tabla No. 6** Formato de criterios cuantitativos de evaluación durante el embarazo

Criterio		Calificación x Referencia		Muestra	
Edad (años) (Donoso, 2014)		1: Normal	18-35		
		2: Límite bajo	<18		
		3: Límite alto	>35		
IMC pregestacional (Kg/m <sup>2</sup> ) (IOM, 2009)		1: Normal	18.5-24.9		
		2: Peso bajo	<18.5		
		3: Sobrepeso-Obesidad	>24.9		
Parto pretérmino	SDG nacimiento (Brown, 2014)	1: Normal	38-42		
		2: Parto pretérmino	<38		
	Peso al nacer (g) (Flores, 2012)	1: Normal	M <sup>3</sup> : 2970-3487 F <sup>4</sup> : 2868-3353		
		2: Bajo	M <sup>3</sup> : <2970 F <sup>4</sup> : <2868		
		3: Alto	M <sup>3</sup> : >3487 F <sup>4</sup> : >3353		
Preeclampsia		1: No			
		3: Sí			
<b>Trimestre de Gestación</b>				<b>2°</b>	<b>3°</b>
Índice de Ganancia de Peso x semana (IOM, 2009)		1: Normal	N <sup>1</sup> : 0.35-0.5 O <sup>2</sup> : 0.17-0.27		
		2: Bajo	N <sup>1</sup> : <0.35 O <sup>2</sup> : <0.17		
		3: Alto	N <sup>1</sup> : >0.5 O <sup>2</sup> : >0.27		
Química Sanguínea (UNAM, 2016)	Urea (mg/dL)	1. Normal	15.0-43.0		
		2. Límite bajo	<15.0		
		3. Límite alto	>43.0		

	Creatinina (mg/dL)	1. Normal	0.60-1.10			
		2. Límite bajo	<0.6			
		3. Límite alto	>1.10			
	Glucosa (mg/dL)	1: Normal	70.0-100.0			
		3: Límite alto	>100.0			
	Colesterol (mg/dL)	1: Normal	50.0-200.0			
		3: Límite alto	>200.0			
	TAG (mg/dL)	1: Normal	50.0-200.0			
		3: Límite alto	>200.0			
	Ác. Úrico (mg/dL)	1. Normal	2.60-6.0			
		2. Límite bajo	<2.60			
		3: Límite alto	>6.0			
	Biometría Hemática (Hospital Materno Infantil Inguarán, 2012)	Hemoglobina (g/dL)	1. Normal	10.0-15.0		
			2. Límite bajo	<10.0		
			3: Límite alto	>15.0		
Hematocrito (%)		1. Normal	30.0-46.0			
		2. Límite bajo	<30.0			
		3: Límite alto	>46.0			
Eritrocitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )		1. Normal	3.5-5.7			
		2. Límite bajo	<3.5			
		3: Límite alto	>5.7			
Cont. Medio de Hb Corpuscular (g/dL)		1. Normal	30.0-35.0			
		2. Límite bajo	<30.0			
		3: Límite alto	>35.0			
Volumen Corpuscular Medio (fL)		1. Normal	80.0-99.0			
		2. Límite bajo	<80.0			
		3: Límite alto	>99.0			
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1. Normal	4.5-10.0				
	2. Límite bajo	<4.5				
	3: Límite alto	>10.0				
Linfocitos (%)	1. Normal	20-55				
	2. Límite bajo	<20				
	3: Límite alto	>55				
Monocitos (%)	1. Normal	1.7-9.3				
	2. Límite bajo	<1.7				
	3: Límite alto	>9.3				
Eosinófilos (%)	1. Normal	0.5-3.0				
	2. Límite bajo	<0.5				
	3: Límite alto	>3.0				
Neutrófilos (%)	1. Normal	37-73				
	2. Límite bajo	<37				
	3: Límite alto	>73				
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1. Normal	150-400				
	2. Límite bajo	<150				
	3: Límite alto	>400				
Examen General de Orina (Heil, 2008)	pH de orina	1. Normal	5.0-7.0			
		2. Límite bajo	<5.0			
		3: Límite alto	>7.0			
	Proteína (mg/dL) (Secretaría de Salud, 2010)	1: Normal	<30			
		3: Límite alto	>30			
	Sedimento	Bacterias	1: Negativo	-		
			3: Positivo	+, ++, +++		
		Levaduras	1: Negativo	-		
			3: Positivo	+, ++, +++		
		Cristales	1: Negativo	-		
3: Positivo			+, ++, +++			
Crecimiento Intrauterino (INPer,	Peso (percentil)	1. Normal	10-90			

2003)	Circunferencia cefálica (percentil)	2. Límite bajo	<10	
		3: Límite alto	>90	
		1. Normal	10-90	
		2. Límite bajo	<10	
		3: Límite alto	>90	
<b>TOTAL (30)</b>				

- <sup>1</sup> N=Normal
- <sup>2</sup> O=Obesa
- <sup>3</sup> M=Masculino
- <sup>4</sup> F=Femenino

**Tabla No. 7** Formato de criterios cualitativos de evaluación durante el embarazo

Criterio		Calificación x Referencia		Muestra
Historia Clínica actual	Enfermedades concomitantes no obstétricas	1	No	
		3	Sí	
	Complicaciones en el embarazo	1	No	
		3	Sí	
	Infecciones urinarias	1	No	
		3	Sí	
	Infecciones vaginales (Perea, 2010)	1	No	
		3	Sí	
	Uso frecuente de fármacos	1	No	
		3	Sí	
Hábitos actuales	Fumador pasivo	1	No	
		3	Sí	
	Actividad física (Miranda, 2013)	1: Normal	30 min/3-5 veces x sem	
		3: Límite menor	<30 min/3-5 veces x sem	
		2: Límite mayor	>30 min/3-5 veces x sem	
<b>TOTAL (7)</b>				

(SEGO, 2010), (Muslera, 2013) (NCHOD, 1999) (SNS, 2011).

De los individuos nacidos, menores de 3 años, se realizó una consulta de evaluación antropométrica, de historia clínica y hábitos, y se obtuvieron los siguientes datos:

**Tabla No. 8** Formato de criterios cuantitativos de la evaluación del niño

Criterio		Calificación x Referencia		Muestra
Edad (años.meses) (Pantoja, 2015)		1: Normal	0-2	
		3: Límite superior	>2	
Antropometría (OMS, 2016)	IMC (Z-score)	1: Normal		
		2: Delgadez		
		3: Sobrepeso-Obesidad		
	Peso/edad (Z-score)	1: Normal		
		2: Desnutrición		
		3: Encima del rango normal		
	Peso/talla (Z-score)	1: Normal		
		2: Desnutrición		
		3: Sobrepeso-Obesidad		
	Longitud/talla (Z-score)	1: Normal		
		2: Retraso en el crecimiento		
		3: Alto para la edad		
	Circunferencia cefálica (Z-score)		1: Normal	

	Circunferencia de brazo (Z-score)	3: Riesgo de salud o desarrollo	
		1: Normal	
		2: Riesgo de desnutrición	
	Pliegue cutáneo (Z-score)	3: Riesgo de obesidad-hipertrofia	
		1: Masa grasa promedio	
		2: Masa grasa debajo del promedio	
<b>TOTAL (8)</b>			

**Tabla No. 9** Formato de criterios cualitativos de la evaluación del niño

Criterio		Calificación x Referencia		Muestra
Número de embarazo (Rebholz, 2012)		1	Primípara	
		3	Múltipara	
Lactancia materna (Brown, 2014)	Exclusiva (0-5 m)	1	Sí	
		3	No	
	Continua (hasta 1° año)	1	Sí	
		3	No	
Antecedentes personales (Puumala, 2015)	Infecciosos	1	No	
		3	Sí	
	Alérgicos	1	No	
		3	Sí	
	Traumáticos	1	No	
		3	Sí	
	Transfusionales	1	No	
		3	Sí	
	Quirúrgicos	1	No	
		3	Sí	
Cuidado materno (Murgatroyd, 2011)		1	Mayoritario	
		3	Guardería	
<b>TOTAL (9)</b>				

## 10.4 EXTRACCIÓN DE DNA, CUANTIFICACIÓN Y PRUEBA DE INTEGRIDAD

La metodología para la obtención de DNA a partir de muestras biológicas de los sujetos de estudio, y las pruebas de cuantificación e integridad se describen a continuación.

### 10.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA

La colecta de sangre periférica fue de 2-3 mL total en condiciones de ayunas y total asepsia con tubos *Vacutainer* con anticoagulante EDTA. El transporte de la sangre fue manteniendo la temperatura de 4°C y su almacenamiento posterior fue en tubos Eppendorf® a -20 °C hasta ser procesadas las muestras.



La extracción de DNA se llevó a cabo conforme a la técnica modificada del “*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood*” de Roche® (Ref. 11667327001, Alemania), originalmente para 10 mL, según el inserto. Se tomaron 200 µL de sangre periférica a T° ambiente en un tubo Eppendorf® estéril de 1mL y se agregaron 700 µL de solución de lisis de eritrocitos (*Red Blood Cell Lysis Buffer, DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* de Roche®), mezclando (por inversión) por 5 minutos. Después, se centrifugó la muestra a 2,000 rpm (Microcentrífuga SORVALL Fresco® No. Serie S00264) por 10 minutos a 4 °C, y se desechó el sobrenadante (rojo translúcido) y se mezcló con vortex el excedente del líquido con el paquete celular. Se añadieron 250 µL de buffer de lisis de leucocitos (*White Blood Cell Lysis Buffer, DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* de Roche®), e incubaron a 65 °C, por 10 minutos. Posteriormente, se transfirió la muestra a un tubo estéril nuevo con 130 µL de solución de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution, DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* de Roche®), y se mezcló con vortex por 25 segundos. La muestra se centrifugó a 13,200 rpm por 10 minutos, a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril nuevo. Se añadió el doble del volumen del sobrenadante (aproximadamente 800 µL) de etanol al 100% a T° ambiente. Se centrifugó a 13,200 rpm por 10 minutos a 4 °C, y se desechó el sobrenadante. Después, se añadieron 75 µL de etanol al 70% frío al pellet y se mezcló varias veces (por inversión). Nuevamente, se centrifugó el tubo a 13,200 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Por último, se dejó evaporar el etanol restante del tubo, y se resuspendió el DNA en 40 µL de buffer TE (Tris-Cl, 10 mM, pH=7.5; EDTA, 1 mM) por 24 horas, a 37 °C.

#### **10.4.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA Y MEDICIÓN DE SU INTEGRIDAD**

La cuantificación de DNA se realizó por espectrofotometría por goteo con el equipo NanoDrop 2000c® (ThermoScientific, No. Serie N947). Se utilizó el programa con la opción de “Nucleic Acids” para su cuantificación utilizando como blanco 1 µL del buffer TE, y el mismo volumen para las muestras de DNA. Para determinar la concentración de DNA se realizan mediciones a 260 y 280 nm. A pH neutro, una solución de DNA tiene una absorción máxima a 260 nm. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm. Las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El

cálculo de la relación A260/A280 es una manera común para expresar la pureza del DNA (IBT, 2017). Dependiendo de la composición nucleica, un valor de 1.7 a 2.0 indica una muestra pura.

El espectrofotómetro permite medir la absorbancia de una solución homogénea a una determinada longitud de onda. La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbantes y a la longitud de la cubeta que contiene la muestra. La medida de la concentración de DNA en el espectrofotómetro es directa sin la necesidad de utilizar cubetas o capilares. El sistema utiliza la tensión superficial de la gota para mantener el volumen de muestra en el pedestal durante el ciclo de medida. Para poder realizar las medidas utiliza diferentes caminos ópticos (1.0 mm; 2.0 mm; 0.1 mm y 0.05 mm) la longitud de onda de los cuales varía automáticamente con la concentración de la muestra. El cambio de caminos ópticos a tiempo real durante la lectura de la muestra permite obtener un amplio rango dinámico de medida del DNA de doble cadena (Thermo Fisher Scientific, 2009).

La integridad del DNA fue analizada a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 1% y TAE 1X (Tris, 40 mM; ácido acético, 20 mM; EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (6  $\mu$ L). Las muestras se mezclaron con una solución de carga (*DNA Gel Loading Dye* [azul de bromofenol y xileno cianol FF], ThermoFisher® No.Cat. R0611; 1x) para su visualización en el gel y las condiciones de electroforesis fue en una cámara horizontal (BioRad®, No. Serie 1704401) con un voltaje de 50 V. La visualización de las bandas de DNA se realizó en un transiluminador (Universal Hood III, BioRad®, No. Serie 731BR02553). Los criterios que se evalúan para la integridad del DNA son bandas de 1000 Kb (o sin gran longitud de desplazamiento), bien teñidas, y sin contenido barrido.

## 10.5 TÉCNICA DE MICROARREGLOS

Las muestras de DNA íntegras y puras se disolvieron en solución de TE a las condiciones que marca el siguiente recuadro:

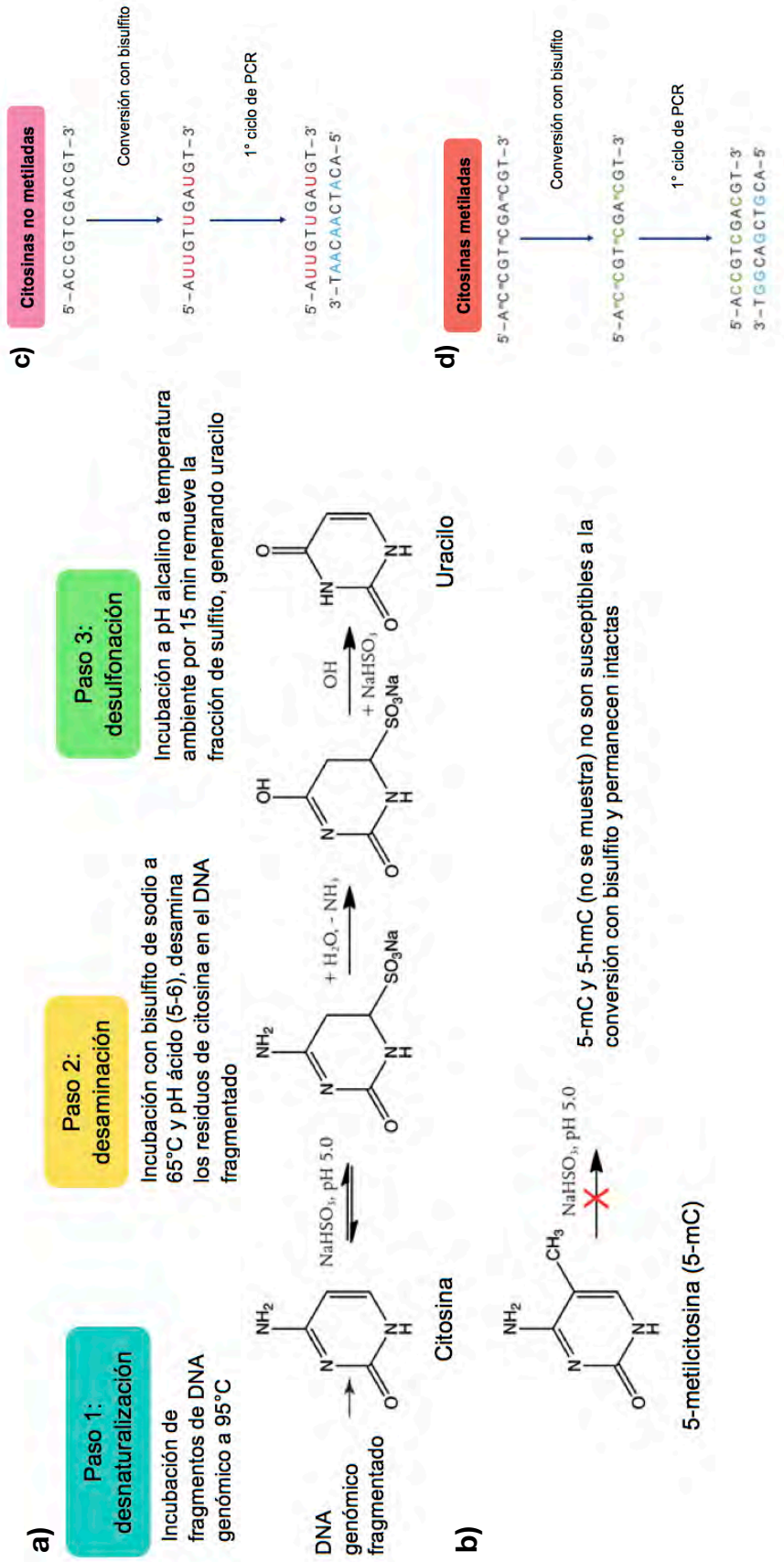
Volumen: dependiente de la concentración

Concentración	Volumen
30-50 ng/ $\mu$ L	60 $\mu$ L
50-100 ng/ $\mu$ L	30 $\mu$ L

Las condiciones antes mencionadas son las adecuadas para el envío de las muestras a la Unidad de Microarreglos de la Unidad de Alta Tecnología del Instituto Nacional de Medicina Genómica, donde se realizó la técnica de microarreglos de metilación, haciendo uso del “Infinium Human Methylation 450 BeadChip” de Illumina®, con los equipos:

- Robot Tecan®: estación automatizada para el procesamiento de microarreglos.
- Lector de microarreglos iScan®: tecnología de microarreglos en esferas para análisis de DNA y RNA.

El ensayo automatizado requiere 1000 ng de gDNA para someterlo a la conversión con bisulfito. En la conversión con bisulfito, el DNA fue tratado con bisulfito de sodio, utilizando el Kit de conversión “EZ DNA Methylation Kit” (Zymo Research®, No. Cat. D5001). Después del tratamiento, las citosinas no metiladas fueron convertidas a uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambio, como se muestra en la **Figura No. 12**. Las muestras de DNA convertido con bisulfito fueron después desnaturalizadas y neutralizadas, para su posterior amplificación.

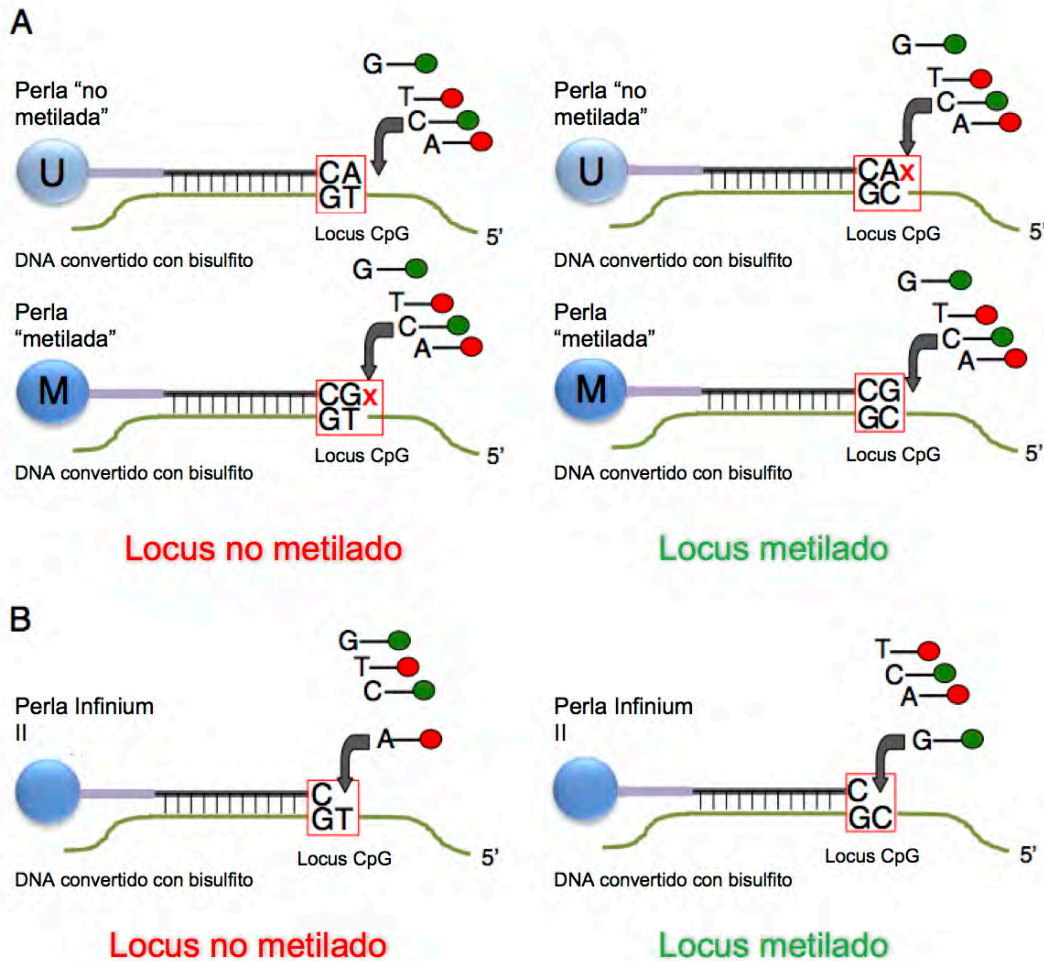


**Figura No. 12** Conversión de DNA con bisulfito de sodio. a) Muestra la conversión de una citosina no metilada en uracilo; b) Muestra que una citosina metilada (5-mC) permanece intacta; c) Muestra como se modifica la secuencia de un fragmento que contenía citosinas no metiladas, ahora convertidas en uracilo, y su cadena complementaria; d) Muestra como la secuencia de un fragmento que contenía 5-mC permanece sin modificarse, y su cadena complementaria. Modificado de New England Biolabs (2017) y ABCAM (2017).

El DNA desnaturalizado fue sometido a una amplificación isotérmica durante toda una noche. La amplificación de genoma completo incrementa uniformemente la cantidad de muestra de DNA. Después, el producto amplificado fue fragmentado por un proceso enzimático controlado, que usa fragmentación de punto final. Posteriormente, el DNA fue precipitado con isopropanol, recolectado por centrifugación a 4°C y resuspendido en buffer de hibridización.

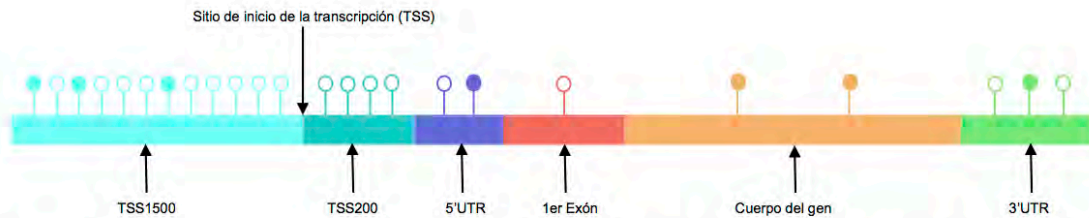
Las muestras de DNA fragmentado y resuspendido fueron dispensadas en el BeadChip, con ayuda del robot Tecan®, y el chip fue incubado en el horno de hibridización de Illumina® durante toda una noche. Los fragmentos de DNA se alinean a 50meros locus-específicos durante la hibridización. Dos tipos de perlas corresponden a cada sitio CpG para los ensayos Infinium I (una metilada, y una no metilada), dependiendo del estado de metilación que tenga. Para el ensayo Infinium II solamente existe un tipo de perla para cada sitio CpG, independiente de su estado de metilación, como se observa en la **Figura No. 13**. Los fragmentos de DNA que no hibridizaron, o que hibridizaron de forma no específica, fueron lavados, preparando al chip para la tinción y extensión.

El chip fue sometido a extensión y tinción a través de cámaras de flujo capilar. La extensión de una sola base de los oligos del chip, usando el DNA hibridizado como plantilla incorpora señales detectables en chip y determina el nivel de metilación del sitio CpG evaluado.

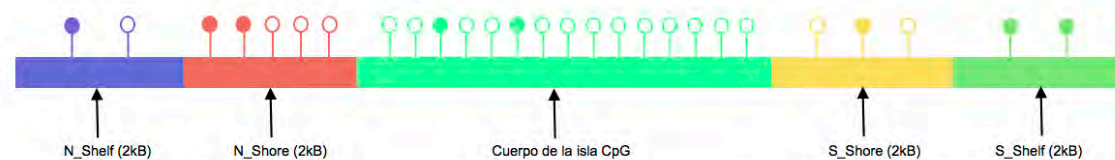


**Figura No. 13** Extensión y tinción para los dos tipos de ensayos que contiene el chip "Infinium Human Methylation 450 BeadChip" de Illumina®. A. Para Infinium I, se muestran los dos tipos de perlas (metilada y no metilada), y como es la extensión y tinción cuando hibridizó un fragmento de DNA metilado, y no metilado. B. Para Infinium II, se muestra el único tipo de perla, y como es la extensión y tinción, cuando hibridizó un fragmento de DNA metilado y no metilado. Modificado de Bibikova (2011).

La cobertura de sitios CpG evaluados que se obtiene a partir del chip incluye regiones génicas con sitios en la región promotora, 5'UTR, 1er exón, cuerpo del gen y 3'UTR, para tener una visión más amplia del estado de metilación del fragmento evaluado. La evaluación también se extiende a regiones de islas CpG (cobertura del 96%), incluyendo el cuerpo de las islas, así como las regiones flanqueantes, conocidas como shores y shelves. Un esquema de la cobertura, así como el total de sitios evaluados en el chip se puede observar en la **Figura No. 14**.



Región génica	Genes mapeados	Porcentaje de cobertura de genes
NM_TSS1500	17 820	79 %
NM_TSS200	14 895	94 %
NM_5'UTR	13 865	78 %
NM_1er Exón	15 127	80 %
NM_Cuerpo del gen	17 071	79 %
NM_3'UTR	13 042	72 %
NR_TSS1500	2 672	88 %
NR_TSS200	1967	65 %
NR_Cuerpo del gen	2 345	77 %



Región en isla CpG	Islas mapeadas	Porcentaje de cobertura de islas
N_Shelf	23 896	86 %
N_Shore	25 770	93 %
Cuerpo de la isla	26 153	94 %
S_Shore	25 614	92 %
S_Shelf	23 968	86 %

**Figura No. 14** Sitios CpG que son evaluados en el “Infinium Human Methylation 450 BeadChip” de Illumina®, en regiones génicas e islas CpG, respectivamente. En regiones génicas (arriba), se evalúan los sitios de inicio de la transcripción (TSS), la región 5’UTR, 1er exón, cuerpo del gen, y región 3’UTR. Para las islas CpG (abajo), se evalúan North Shore y Shelf, el cuerpo de la isla CpG, y South Shore y Shelf. En las tablas, se muestra la cobertura de genes reportados en las referencias que se encuentran evaluados en el chip de microarreglos. Modificado de Illumina (2012).

Por último, el sistema iScan de Illumina® escaneó el chip, utilizando un láser para excitar el fluoróforo del producto de la extensión de una sola base, en las perlas. El escáner registra imágenes de alta resolución de la luz emitida por los fluoróforos (Illumina, 2011).

La base de datos generada, y con la que se trabajó el análisis bioinformático, reporta los resultados en valores de beta ( $\beta$ ). El valor de beta es utilizado para estimar el nivel de metilación del sitio CpG evaluado, usando el radio de intensidades entre los alelos

metilados y no metilados. Su valor tiene un rango de 0 (no metilado) a 1 (metilado). Para el ensayo Infinium, la forma de calcular  $\beta$  es:

$$\beta = \frac{\text{Max}(\text{Signal } B, 0)}{\text{Max}(\text{Signal } A, 0) + \text{Max}(\text{Signal } B, 0) + 100}$$

Para los ensayos Infinium I, las señales A y B son producidas por dos diferentes tipos de perlas, y se reporta en el mismo color. Para los ensayos Infinium II, la señal A corresponde a la señal en el canal rojo y la señal B corresponde a la señal en el canal verde (Illumina, 2010).

## 10.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El análisis bioinformático se dividió en tres partes, mismas en las que se utilizaron los siguientes softwares:

- a. Normalización y análisis exploratorio: Illumina GenomeStudio® v2.0.2 y Partek Genomics Suite® v6.6 (equipo de la Unidad de Microarreglos de la Unidad de Alta Tecnología, en el Instituto Nacional de Medicina Genómica)
- b. Análisis diferencial: Partek Genomics Suite® (equipo de la Unidad de Microarreglos de la Unidad de Alta Tecnología, en el Instituto Nacional de Medicina Genómica)
- c. Análisis biológico: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM; <https://www.omim.org/>).

Para el análisis bioinformático, se consideró una normalización de los valores de Beta por cuantiles, y una escalación por estandarización, ambas realizadas con Partek Genomics Suite®. Adicionalmente, se aplicó un filtro N-fold de 1.1 entre ambas muestras



correspondientes al grupo control (GC) para aumentar la correlación de los valores de Beta entre ambas. Este filtro redujo la cantidad de sitios CpG evaluados, de 485 577 (datos crudos) a 227 958. Para el análisis diferencial, se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía, y para identificar los sitios CpG con pérdida o ganancia de metilación significativa se consideró un p-value=0.05 y un Fold-change  $\leq -1.5$  y  $\geq 1.5$ . Por último, se descartaron los sitios CpG con metilación diferencial significativa que se encontraran en los cromosomas X o Y, para excluir la variabilidad dada por diferencia de sexo entre los sujetos de estudio.

**11.**

Resultados

Los resultados, de acuerdo a la metodología, se describen a continuación.

## 11.1 EVALUACIÓN DEL PERFIL CLÍNICO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El establecimiento del perfil clínico surgió por la necesidad de evaluar el desarrollo y crecimiento de los individuos durante los primeros 1000 días de vida, con base en dos ejes principales: determinar las condiciones de un embarazo normoevolutivo, para saber si los individuos del GC cumplen con ellas, y las condiciones en las que los individuos del GP difieren; e identificar posibles eventos que podrían afectar el perfil de metilación de los individuos, en adición a las complicaciones durante el embarazo estudiadas.

Como se mencionó anteriormente, el perfil clínico fue dividido en dos partes, la evaluación durante el embarazo, y la evaluación del niño, mismas que fueron registradas en las **Tablas No. 10, 11, 12 y 13**, para todas las muestras de ambos grupos. En ellas, se asignó una calificación para el resultado que cada individuo obtuvo en los indicadores utilizados, con base a las referencias reportadas. Al final de cada tabla, se muestra la suma de calificaciones ideal, considerando todos los criterios, y la suma del total de las calificaciones obtenidas por cada individuo.

**Tabla No. 10** Criterios cuantitativos de evaluación durante el embarazo

Criterio		Calificación Referencia	x	Control 1	Control 2	Problema 1	Problema 2	Problema 3
Edad (años) (Donoso, 2014)	1: Normal	18-35		1	1	1	1	1
	2: Límite bajo	<18						
	3: Límite alto	>35						
IMC pregestacional (Kg/m <sup>2</sup> ) (IOM, 2009)	1: Normal	18.5-24.9		1	1	3	3	3
	2: Peso bajo	<18.5						
	3: Sobrepeso -Obesidad	>24.9						
Parto pretérmino	SDG nacimiento (Brown, 2014)	1: Normal	38-42	1	1	1	1	1
		2: Parto pretérmino	<38					
	Peso al nacer (g) (Flores, 2012)	1: Normal	M <sup>3</sup> : 2970-3487 F <sup>4</sup> : 2868-3353	1	1	2	1	1

		2: Bajo	M <sup>3</sup> :<29 70 F <sup>4</sup> :<286 8											
		3: Alto	M <sup>3</sup> :>34 87 F <sup>4</sup> :>335 3											
Preeclampsia		1: No		1	1			3	3		1			
		3: Sí												
<b>Trimestre de Gestación</b>				2°	3°	2°	3°	2°	3°	2°	3°	2°	3	
Índice de Ganancia de Peso x semana (IOM, 2009)		1: Normal	N <sup>1</sup> :0.35 -0.5 O <sup>2</sup> :0.17 -0.27	0.2 3	0.4 6	0.4 2	0.7 0	0.3 9	- 0.1 3	0.5 2	0.9 6	- 0.4 8		
		2: Bajo	N <sup>1</sup> :<0.3 5 O <sup>2</sup> :<0.1 7	2	1	1	3	3	2	3	3	2		
		3: Alto	N <sup>1</sup> :>0.5 O <sup>2</sup> :>0.2 7	1		1		1			3		2	
Química Sanguínea (UNAM, 2016)	Urea (mg/dL)	1: Normal	15.0- 43.0	20 5	15 6	19. 3	18. 5	11. 5	11 2	21 1	22. 5	14 2		
		2: Límite bajo	<15.0	1	1	1	1	2	2	1	1	2		
		3: Límite alto	>43.0	1		1		2		1		2		
	Creatinina (mg/dL)	1: Normal	0.60- 1.10	0.8 5	0.8 6	0.8 1	0.8 9	0.8 9	0.7 5	0.8 6	0.9 2	0.7 2		
		2: Límite bajo	<0.6	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		3: Límite alto	>1.10	1		1		1		1		1		
	Glucosa (mg/dL)	1: Normal	70.0- 100.0	76 1	71. 3	76. 6	80. 2	74 1	78 1	73. 3	61 2	86 1		
		3: Límite alto	>100.0	1		1		1		2		1		
	Colesterol (mg/dL)	1: Normal	50.0- 200.0	16 9	16 6	15 9	18 8	22 4	25 6	14 0	17 7	17 6		
		3: Límite alto	>200.0	1		1		3		1		1		
	TAG (mg/dL)	1: Normal	50.0- 200.0	11 1	14 5	92. 3	15 6	20 6	22 3	13 5	24 2	11 5		
		3: Límite alto	>200.0	1		1		3		3		1		
	Ác. Úrico (mg/dL)	1: Normal	2.60- 6.0	2.8 2	3.2 3	2.7 6	3.5 5	3.3 5	3.4 5	3.1 3	4.4 1	4.1 1		
		2: Límite bajo	<2.60	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		3: Límite alto	>6.0	1		1		1		1		1		
	Biometría Hemática (Hospital Materno Infantil Inguarán, 2012)	Hemoglobina (g/dL)	1: Normal	10.0- 15.0	12. 2	11. 9	11. 6	13. 3	13. 2	12. 9	12. 5	13. 0	12. 2	
			2: Límite bajo	<10.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
			3: Límite alto	>15.0	1		1		1		1		1	
Hematocrito (%)		1: Normal	30.0- 46.0	35. 6	35. 5	33. 9	39. 0	38. 4	38. 4	36. 6	38. 0	36. 2		
		2: Límite bajo	<30.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		3: Límite alto	>46.0	1		1		1		1		1		

		alto												
Eritrocitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1. Normal	3.5-5.7	3.9 0	3.9 9	3.7 7	4.2 2	4.3 6	4.2 9	3.9 2	4.2 1	4.1 2			
	2. Límite bajo	<3.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>5.7	1		1		1		1		1			
Cont. Medio de Hb Corpuscular (g/dL)	1. Normal	30.0-35.0	34. 3	33. 6	34. 3	33. 7	34. 4	33. 7	34. 1	34. 3	33. 6			
	2. Límite bajo	<30.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>35.0	1		1		1		1		1			
Volumen Corpuscular Medio (fL)	1. Normal	80.0-99.0	90. 9	89. 2	88. 7	92. 5	88. 2	88. 5	93. 0	90. 5	88. 0			
	2. Límite bajo	<80.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>99.0	1		1		1		1		1			
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1. Normal	4.5-10.0	8.1 3	6.5 5	7.0 2	7.0 2	8.2 2	7.3 5	9.9 1	7.5 3	5.8 5			
	2. Límite bajo	<4.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>10.0	1		1		1		1		1			
Linfocitos (%)	1. Normal	20-55	21. 3	19	27. 2	22. 8	22	22	16	22. 6	18			
	2. Límite bajo	<20	1	2	1	1	1	1	2	1	2			
	3: Límite alto	>55	1		1		1		2		2			
Monocitos (%)	1. Normal	1.7-9.3	7.1 3	1.0	3.5	5.1 3	4.0	6.0	3.6 7	4.0	3.0			
	2. Límite bajo	<1.7	1	2	1	1	1	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>9.3	1		1		1		1		1			
Eosinófilos (%)	1. Normal	0.5-3.0	1.4	0.5	1.5	1.6 3	4.5	1.0	2.0	1.0	1.0			
	2. Límite bajo	<0.5	1	1	1	1	3	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>3.0	1		1		1		1		1			
Neutrófilos (%)	1. Normal	37-73	70. 0	79. 0	67. 5	70. 1	69. 0	70. 5	79. 0	73. 0	78. 0			
	2. Límite bajo	<37	1	3	1	1	1	1	3	1	3			
	3: Límite alto	>73	1		1		1		3		3			
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1. Normal	150-400	23 1	19 4	23 4	20 2	23 6	22 4	17 6	18 3	22 9			
	2. Límite bajo	<150	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	3: Límite alto	>400	1		1		1		1		1			
Examen General de Orina (Heil, 2008)	pH de orina	1. Normal	5.0-7.0	6.6 7	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0	5.6 7	5.0		
		2. Límite bajo	<5.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		3: Límite alto	>7.0	1		1		1		1		1		
Proteína (mg/dL) de (Secretaría Salud, 2010)	1: Normal	<30	41. 2	40. 3	12. 2	13. 6	18. 4	19. 1	11. 4	12. 9				
			3	3	1	1	1	1	1	1				
			3: Límite alto	>30	3		1		1		1			

	Sedimento	Bacterias	1: Negativo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			3: Positivo	+, ++, +++	3	3	3	3	3	3	3	3			
		Levaduras	1: Negativo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
			3: Positivo	+, ++, +++	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		Cristales	1: Negativo	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	
			3: Positivo	+, ++, +++	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	Crecimiento Intrauterino (INPer, 2003)	Peso (percentil)	1. Normal	10-90	1	1	1	1	3	1	1	3	3	1	
			2. Límite bajo	<10											
			3. Límite alto	>90	1	1	1	3	3	3	3				
Circunferencia cefálica (percentil)		1. Normal	10-90	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1		
		2. Límite bajo	<10												
		3. Límite alto	>90	1	1	1	3	1	1	1					
<b>Calificación total (Ideal=30)</b>				34	32	46	46	*40							

<sup>1</sup> N=Normal

<sup>2</sup> O=Obesa

<sup>3</sup> M=Masculino

<sup>4</sup> F=Femenino

\*Para la muestra Problema 3, hay criterios que no fueron documentados en los expedientes de forma completa, o que no contemplaron el tercer trimestre del embarazo.

En la calificación total de las muestras en la tabla anterior (**Tabla No. 10**) se puede observar que ambos individuos del GC presentan un puntaje cercano a la calificación ideal, mientras que los individuos del GP presentan un puntaje elevado, por lo que se puede considerar a una calificación de 40 o mayor como una evolución del embarazo diferente a la normal, para los criterios cuantitativos evaluados.

**Tabla No. 11** Criterios cualitativos de evaluación durante el embarazo

Criterio		Calificación x Referencia		Control 1	Control 2	Problema 1	Problema 2	Problema 3
Historia Clínica actual	Enfermedades concomitantes no obstétricas	1	No	1	1	1	1	1
		3	Sí					
	Complicaciones en el embarazo	1	No	3	3	3	3	3
		3	Sí	Infección	Infección	Obe-Preec	Obe-Preec	Obesidad
	Infecciones urinarias	1	No	3	3	3	3	3
		3	Sí					
Infecciones vaginales (Perea, 2010)	1	No	3	3	1	1	3	
	3	Sí	C. albicans	C. albicans			G. vag.	
Uso frecuente de fármacos	1	No	3	3	3	1	3	
	3	Sí	Amoxicilina, nistatina	Amoxicilina, nitrofurantoina	Cefalexina		Ranitidina	
	3	No						
Hábitos actuales	Fumador pasivo	1	No	1	1	1	3	3
		3	Sí					
	Actividad física (Miranda, 2013)	1: Normal	30 min/3-5 veces	3	1	3	2	1

			x sem					
		3: Límite menor	<30 min/3- 5 veces x sem					
		2: Límite mayor	>30 min/3- 5 veces x sem					
<b>Calificación total (Ideal=7)</b>				17	15	15	14	17

Respecto a la calificación total que obtuvieron las muestras en la **Tabla No. 11**, los individuos que conforman ambos grupos presentan calificaciones similares, aunque todas son mayores que la calificación ideal.

**Tabla No. 12** Criterios cuantitativos de la evaluación del niño

Criterio		Calificación	x	Control 1	Control 2	Problema 1	Problema 2	Problema 3
Edad (años.meses) (Pantoja, 2015)		1: Normal	0-2	1.11	1.0	2.6	1.7	0.5
		3: Límite superior	>2	1	1	3	1	1
Antropometría (OMS, 2016)	IMC (Z-score)	1: Normal		1	1	1	3	1
		2: Delgadez						
		3: Sobrepeso-Obesidad						
	Peso/edad (Z-score)	1: Normal		1	2	1	1	1
		2: Desnutrición						
		3: Encima del rango normal						
	Peso/talla (Z-score)	1: Normal		1	2	1	1	1
		2: Desnutrición						
		3: Sobrepeso-Obesidad						
	Longitud/talla (Z-score)	1: Normal		1	1	1	3	1
		2: Retraso en el crecimiento						
		3: Alto para la edad						
	Circunferencia cefálica (Z-score)	1: Normal		1	1	1	1	3
		3: Riesgo de salud o desarrollo						
Circunferencia de brazo (Z-score)	1: Normal		2	1	1	1	1	
	2: Riesgo de desnutrición							
	3: Riesgo de obesidad-hipertrofia							
Pliegue cutáneo (Z-score)	1: Masa grasa promedio		1	2	2	3	1	
	2: Masa grasa debajo del							

		promedio					
		3: Masa grasa arriba del promedio					
<b>Calificación total (Ideal=8)</b>			9	11	11	14	10

Entre las calificaciones obtenidas por cada muestra en la tabla anterior (**Tabla No. 12**) no se observan diferencias entre grupos, aunque son mayores a la calificación ideal.

**Tabla No. 13** Criterios cualitativos de la evaluación del niño

Criterio		Calificación x Referencia		Control 1	Control 2	Problema 1	Problema 2	Problema 3	
Número de embarazo (Rebholz, 2012)		1	Primípara	1	3	1	3	3	
		3	Múltipara						
Lactancia materna (Brown, 2014)	Exclusiva (0-5 m)	1	Sí	1	1	1	3	1	
		3	No						
	Continua (hasta 1° año)	1	Sí	3	1	3	3		
		3	No						
Antecedentes personales (Puumala, 2015)	Infecciosos	1	No	1	1	3	1	1	
		3	Sí						
	Alérgicos	1	No	1	1	1	1	1	
		3	Sí						
	Traumáticos	1	No	1	1	1	1	1	
		3	Sí						
	Transfusionales	1	No	1	1	1	1	1	
		3	Sí						
	Quirúrgicos	1	No	1	1	1	1	1	
		3	Sí						
	Cuidado materno (Murgatroyd, 2011)		1	Mayoritario	1	1	3	1	3
			3	Guardería					
<b>Calificación total (Ideal=9)</b>				12	12	15	15	*12	

\*Para la muestra Problema 3, no aplica el criterio de Lactancia materna continua, porque la edad que tienen el individuo aún no contempla esa etapa.

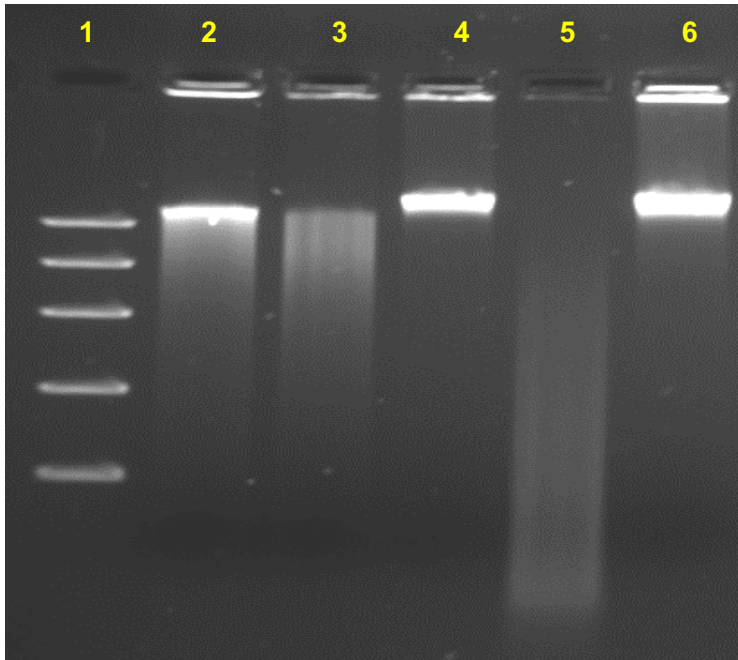
Las calificaciones obtenidas por cada muestra, en la **Tabla No. 13**, indica que no hay diferencias entre GC y GP. Adicionalmente, todas las muestras tienen una calificación total mayor a la ideal.



## 11.2 OBTENCIÓN DEL DNA EN CONDICIONES DE INTEGRIDAD Y PUREZA

Después de evaluar y clasificar a los individuos en GC y GP, se procedió a extraer el DNA a partir de sangre periférica, por medio de la técnica mencionada anteriormente.

La evaluación de la calidad del DNA obtenido se realizó mediante geles de electroforesis (para evaluar su integridad) y cuantificación por medio de espectrofotoscopía (para evaluar su concentración y pureza). Los resultados obtenidos en ambas técnicas se muestran a continuación.

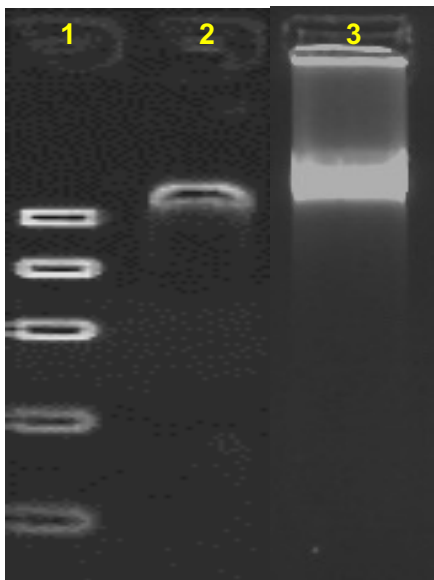


**Figura No. 15** Gel de electroforesis de agarosa al 1%, que muestra la integridad del DNA extraído de las cinco muestras de sangre periférica. Pozo 1: marcador de peso molecular; Pozo 2: problema 1; Pozo 3: control 1; Pozo 4: problema 2; Pozo 5: control 2; Pozo 6: problema 3. Condiciones: 40 min, 50 V.

**Tabla No. 14** Cuantificación espectrofotoscópica de DNA extraído de cinco muestras de sangre periférica

Pozo	Muestra	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280
1	Marcador de peso molecular	-	-
2	Problema 1	49.84	1.85
3	Control 1	34.56	1.78
4	Problema 2	33.49	1.82
5	Control 2	70.64	1.69
6	Problema 3	61.39	1.78

Los resultados anteriores indican que las muestras Control 1 y Control 2 tenían una relación 260/280 y concentración adecuadas (**Tabla No. 14**). Los resultados de la **Figura No. 15** muestran que, para las tres muestras pertenecientes al GP, se observa una banda gruesa que muestra la integridad adecuada del DNA extraído. Sin embargo, para las muestras pertenecientes al GC, no se observó una banda definida, lo cual significa que hay degradación del DNA, por lo que se repitieron las extracciones para ambas, y los resultados de integridad, concentración y pureza se muestran a continuación.



**Figura No. 16** Gel de electroforesis de agarosa al 1%, que muestra la integridad del DNA extraído de las dos muestras que se habían degradado en la extracción anterior. Pozo 1: marcador de peso molecular; Pozo 2: control 2; Pozo 3: control 1. Condiciones: 40 min, 50 V.

**Tabla No. 15** Cuantificación electrofotoscópica de DNA extraído de dos muestras de sangre periférica (corrección de extracción anterior)

Pozo	Muestra	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280
1	Marcador de peso molecular	-	-
2	Control 2	38.54	1.56
3	Control 1	81.07	1.75

En la **Figura No. 16** se observan los resultados en los que las bandas obtenidas son definidas, y evidencian la integridad del DNA obtenido en la segunda extracción para ambas muestras.

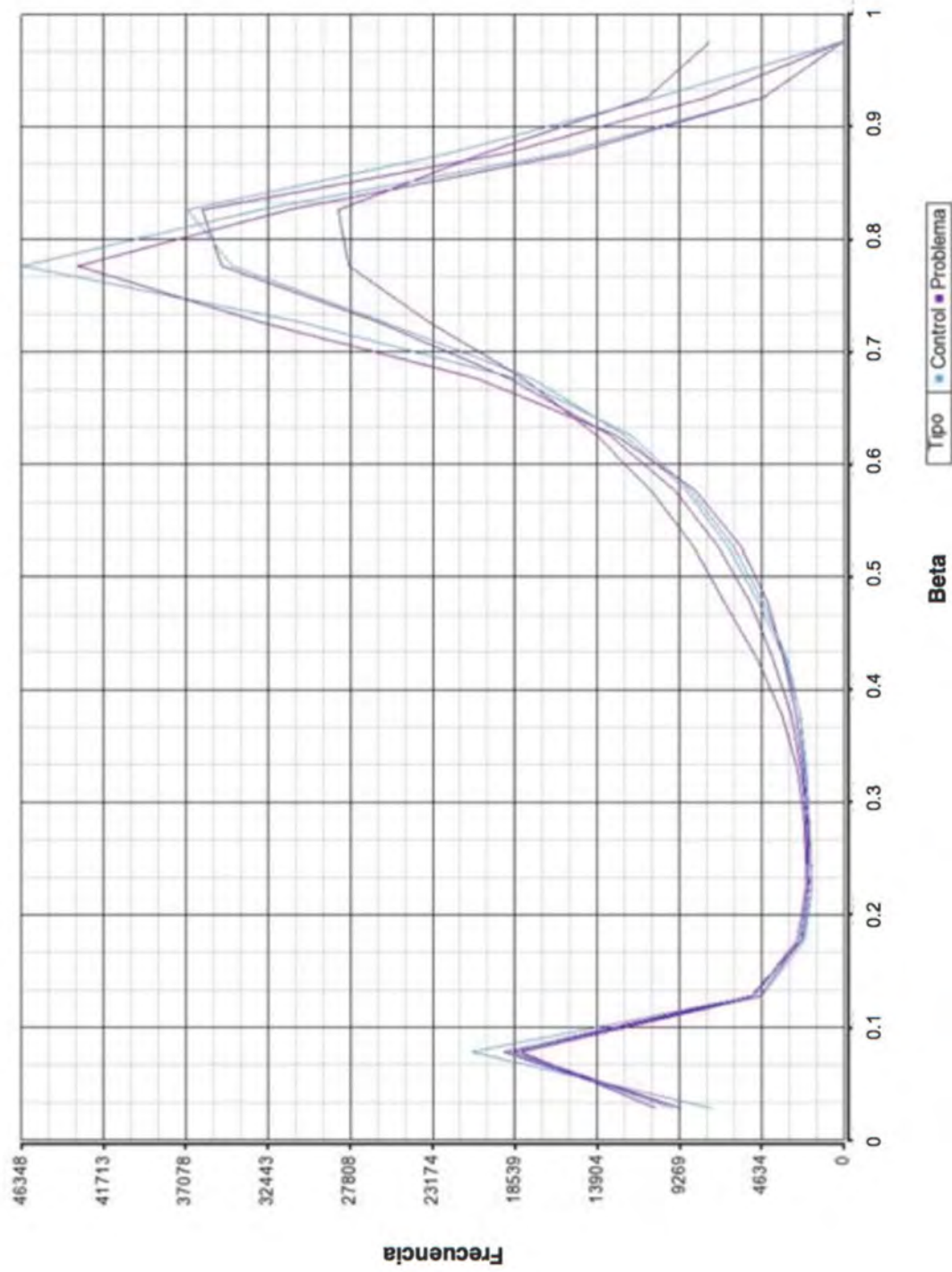
En la **Tabla No. 15**, se muestran los resultados de cuantificación de DNA extraído a partir de las muestras de GC. Ambas muestras tienen una concentración adecuada para la técnica de microarreglos, y en la relación 260/280, la muestra Control 1 se encuentra en un rango aceptable, mientras que el Control 2 se encuentra por debajo del mismo; sin embargo, fue utilizada para la técnica de microarreglos, ya que los pasos posteriores a este implican también lavados, purificaciones y concentraciones del DNA.

### 11.3 PERFIL METILÓMICO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Después de realizar la técnica de microarreglos de metilación del DNA extraído, y obtener la base de datos que resultó, se procedió a estudiar el perfil de metilación, mediante los programas bioinformáticos mencionados anteriormente. El análisis bioinformático de los perfiles metilómicos se dividió en tres partes: análisis exploratorio, análisis diferencial y análisis biológico. En las siguientes figuras se muestran los resultados para cada uno de los apartados mencionados.

### 11.3.1 ANÁLISIS EXPLORATORIO

Inicialmente, se realizó una normalización de la base de datos, como se mencionó en la metodología. Después, se utilizó un filtro de N-fold, para aumentar la correlación entre las muestras del CG, y poder comparar el GP de forma adecuada. Posteriormente, se evaluó el comportamiento de metilación global del DNA en las muestras de forma individual y por grupo, mediante el análisis exploratorio. En la **Figura No. 17** se observan las frecuencias de los valores de beta para los sitios CpG evaluados de cada muestra, indicando el grupo al que corresponden. En ella, se observa la frecuencia de sitios CpG (eje Y) que presentan valores de  $\beta$ , en una escala de 0 a 1 (eje X), presentando las muestras por separado, pero cada una de ellas con el color de su grupo. La primer observación importante es que, en ambos grupos, hay dos picos, uno en un rango de 0 a 0.1 (región de hipometilación), y el otro en un rango de 0.7 a 0.9 (región de hipermetilación), lo que indica que hay una gran cantidad de sitios CpG que registran esos valores de  $\beta$ . Otra observación es que, en esas regiones, las muestras del GC tienen una mayor frecuencia de sitios CpG registrados, comparadas con las muestras del GP: en la región de hipometilación la diferencia es menor, pero en la región de hipermetilación es más evidente y variable entre muestras; por otra parte, en la región intermedia, de hemimetilación, las muestras del GP tienen ligeramente una mayor frecuencia de sitios CpG registrados. Sin embargo, no es evidente la existencia de diferencias de metilación global entre grupos, ya que esta gráfica solamente indica qué tantos sitios CpG presentan un valor de Beta específico, para cada muestra.

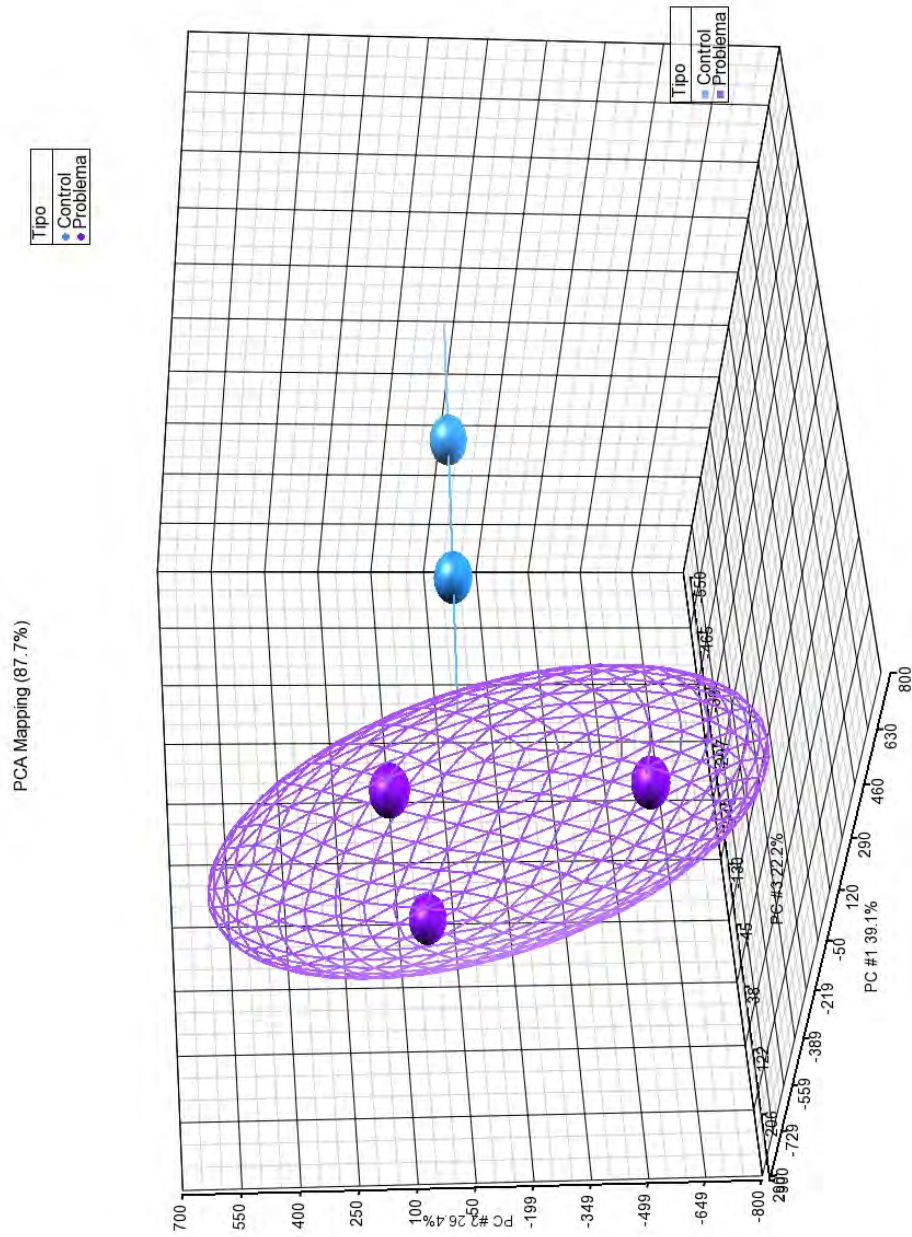


**Figura No. 17** Perfiles de distribución de la metilación de DNA entre GC y GP. Histograma de las frecuencias de sitios CpG evaluados por rangos de valores de Beta, después del tratamiento de datos. Resultados por muestra evaluada, divididas en GC (azul) y GP (morado).

Para evaluar si existen diferencias en el perfil de metilación de DNA por grupos se realizó una prueba de variación, análisis de componentes principales (PCA), que se observa en la **Figura No. 18**. En esta figura se observa cada muestra como una esfera, del color de su grupo correspondiente (GC o GP), distribuidas en un espacio tridimensional de acuerdo al promedio de sus valores de Beta, e identificando en cada eje a las fuentes de variación. El PCA es un método de variable latente a menudo aplicado como un procedimiento de reducción de dimensión y utilizado para desarrollar un número menor de variables artificiales, denominadas componentes principales, que representan la mayor parte de la varianza en las variables observadas de un conjunto de datos (Wilhelm, 2013).

El PCA presentado aquí indica que, con tres dimensiones (tres variables) se puede observar que las muestras de cada grupo tienen patrones de metilación similares entre ellas, y que estos difieren entre ambos grupos, es decir que las tres variables graficadas son suficientes para explicar el 87.7% de la variabilidad que existe entre muestras. El primer componente hace referencia a la variabilidad que existe entre las muestras (39.1% de la variabilidad), y puede ser debida a variabilidad biológica entre cada una de ellas, el tamaño de la muestra, o alguna variable no considerada. El segundo componente muestra la variabilidad entre grupos (26.4%), la variable que se busca obtener en el presente estudio. La variabilidad que existe entre ambos grupos es suficiente para que las muestras en cada uno de ellos se reúnan en regiones separadas del PCA, significando esto que existen diferencias de metilación global entre ambos grupos. Por último, el tercer componente hace referencia a la variabilidad entre intensidades (22.2%) que, aunque en menor grado, aporta variabilidad, posiblemente por el rango que se maneja en los valores obtenidos de intensidad por el escaneo de los microarreglos.

Aunque este gráfico muestra una separación evidente entre los grupos, y por lo tanto variación, no indica si la tendencia del GP respecto al GC es a una ganancia o pérdida de la metilación, en general. Los componentes que aportan la fuente de variación se describen a continuación.



**Figura No. 18** Variación en el perfil de metilación de DNA entre niños productos de embarazo normoevolutivo y niños expuestos a preeclampsia y obesidad durante el embarazo. Gráfico del análisis de componentes principales en tercera dimensión que muestra en esferas azules las dos muestras del GC, y en esferas moradas las tres muestras del GP. Cada eje corresponde a un componente principal (PC), que en conjunto, determinan el 87.7% de la variabilidad. PC1: variabilidad entre muestras (39.1%); PC2: variabilidad entre grupos (26.4%); PC3: variabilidad entre intensidades (22.2%).

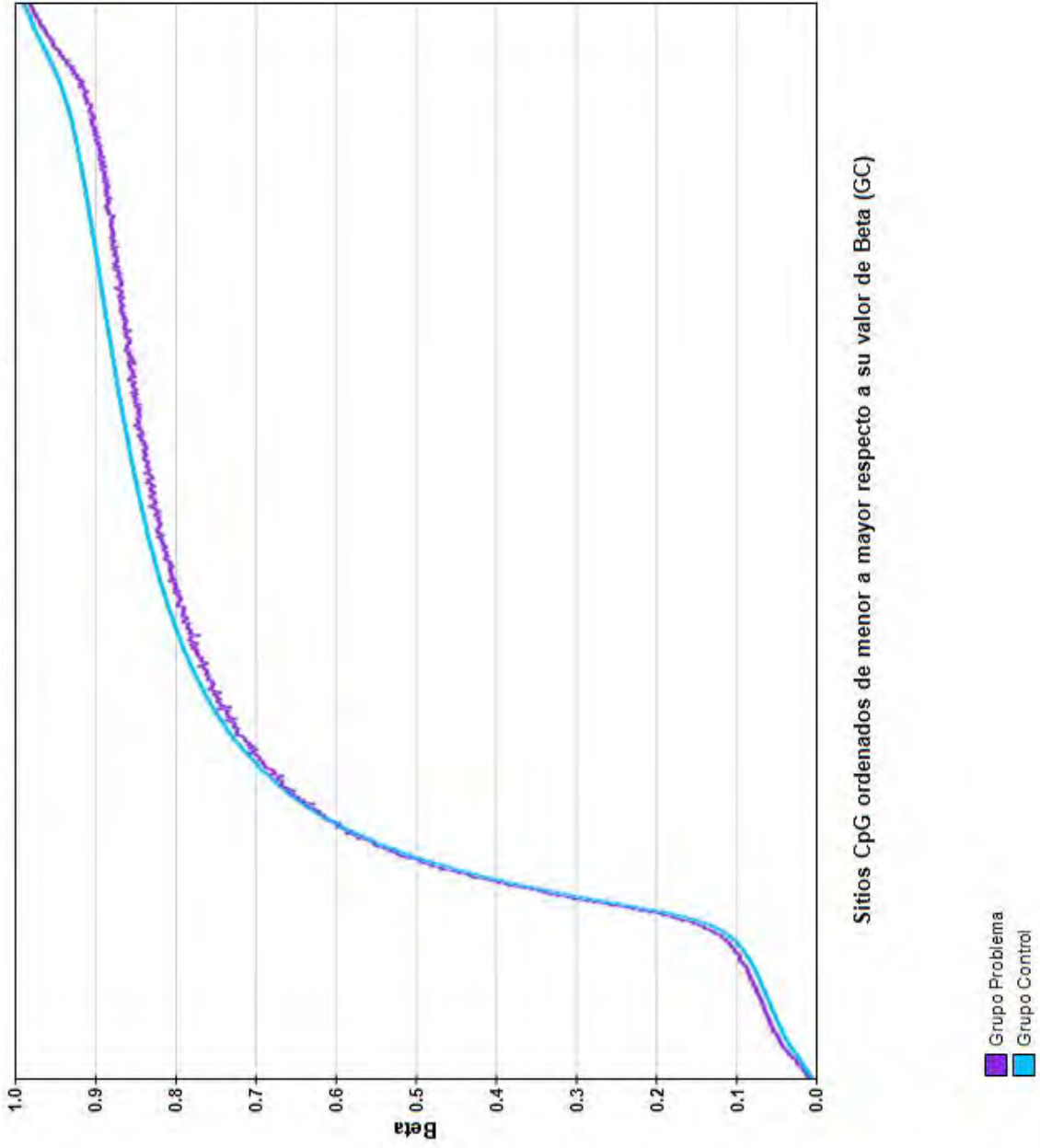
Para poder identificar si la diferencia en el perfil global de metilación entre el GC y el GP es debido a una ganancia o pérdida de metilación en el último, se realizó una comparación de los valores de Beta, que se observa en la **Figura No. 19**.

En este gráfico, se muestra el promedio de los valores de  $\beta$  de cada sitio CpG para los dos grupos (para GC se promediaron los valores de las dos muestras que lo integran, y para GP, de tres muestras), ordenados de menor a mayor para el grupo control, visualizando el comportamiento del GP respecto a estos. Es interesante observar que, en un rango de  $\beta$  de 0 a 0.1, la línea correspondiente al GP se encuentra ligeramente arriba del GC (los sitios CpG que comprende este rango presentan una leve ganancia de metilación); en un rango de  $\beta$  de 0.1 a 0.7 se observan comportamientos parecidos entre los grupos (los sitios CpG hemimetilados en el GC, también lo están en el GP, sin ganancias o pérdidas de metilación considerables); y en un rango de  $\beta$  mayor a 0.7 hasta 1, la diferencia entre grupos es más evidente, pues la línea que corresponde al GP se encuentra por debajo que la de GC (los sitios CpG que se encuentran en este rango presentan una pérdida de metilación considerable).

El hecho de que la separación entre las líneas de cada grupo sea más evidente, y que este rango de  $\beta$  ocupe la mayor parte del eje X (el rango de  $\beta$  de 0.7 a 0.9 presenta la mayor frecuencia, según Figura No. 17) sugiere que, en las muestras del GP, hay una tendencia a la pérdida de metilación en los sitios CpG evaluados. Después de esto, es pertinente identificar los sitios CpG específicos en los que hay una mayor diferencia de metilación en el GP, comparado con el GC



**Figura No. 19**  
Comparación de los valores promedio de Beta por sitio CpG entre grupos. Gráfico lineal que muestra el comportamiento de GP (morado) respecto al GC (azul) por rangos específicos de Beta, cuando sus valores son ordenados de menor a mayor en el GC.

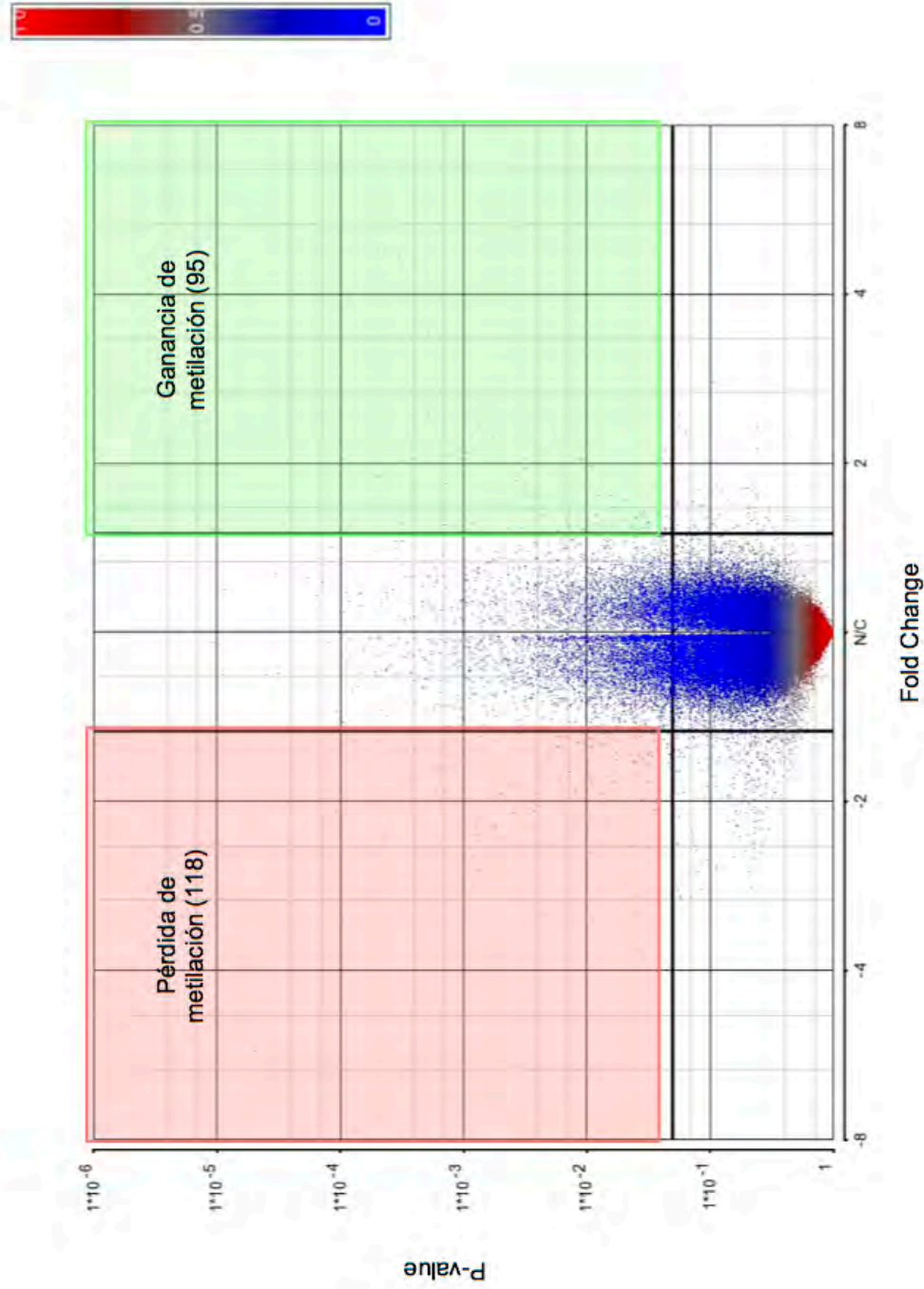


### 11.3.2 ANÁLISIS DIFERENCIAL

El análisis diferencial tiene como finalidad identificar, mediante pruebas estadísticas, los sitios CpG que tuvieron pérdidas o ganancias de metilación significativas en el GP, en comparación con el GC. Como se había mencionado, la prueba estadística que se realizó en este trabajo fue ANOVA de una vía.

Los resultados obtenidos en esta prueba se observan en la **Figura No. 20**, que muestra los sitios CpG con metilación diferencial significativa. Para identificar los sitios CpG con metilación diferencial significativa (213), se utilizaron los parámetros de Fold-change (hacen referencia a la diferencia del valor de  $\beta$  del sitio CpG evaluado en el GP comparado con el GC), en el eje X, de  $\leq -1.5$  y  $\geq 1.5$ , y un p-value, en el eje Y, de 0.05, que indican, respectivamente, una pérdida de metilación 1.5 veces o menor, una ganancia de metilación 1.5 veces o mayor, y una significancia estadística del 99.5%. Las líneas de corte que se observan en ambos ejes corresponden a los parámetros mencionados. En este gráfico, se muestra los sitios CpG como puntos en una escala de color dependiendo de su p-value, distribuidos respecto a este (en el eje Y) y su Fold-change (en el eje X).

Los puntos incluidos en la zona roja (118) son los sitios CpG que tuvieron una pérdida de metilación significativa, con un valor de Fold-change menor, mientras más se encuentran desplazados hacia la izquierda; y los puntos incluidos en la zona verde (95) son los sitios CpG que tuvieron una ganancia de metilación significativa, con un valor de Fold-change mayor, mientras más se encuentran desplazados hacia la derecha, de acuerdo con la prueba de ANOVA de una vía. En esta figura se pueden observar los criterios elegidos para seleccionar los 213 sitios CpG con metilación diferencial significativa, sin embargo, no es evidente la comparación entre los valores de Beta entre las muestras que conforman cada grupo.



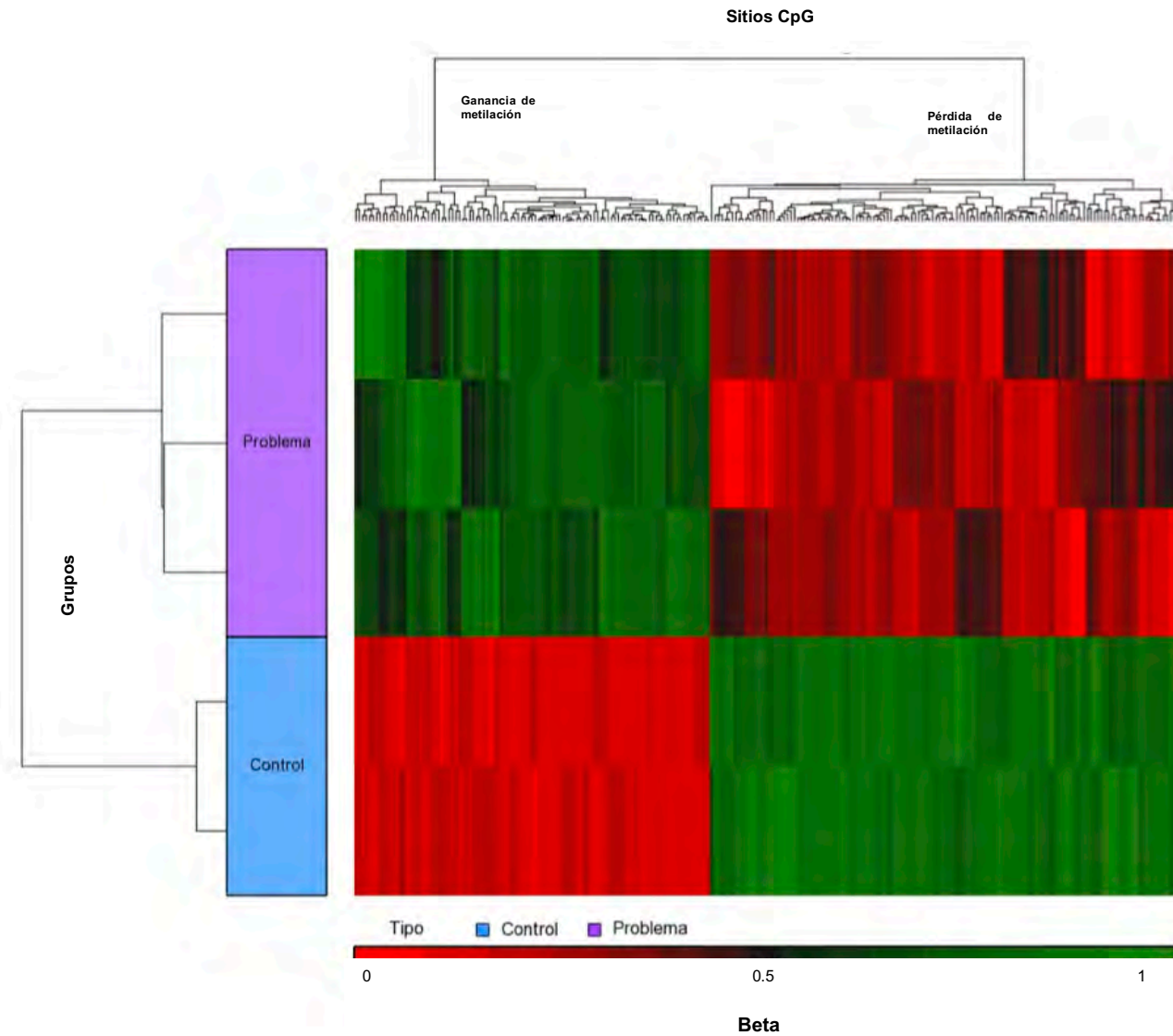
**Figura No. 20** Sitios CpG que presentaron pérdida o ganancia de metilación significativa en el GP. Gráfico de volcán que muestra los sitios CpG como puntos distribuidos respecto a su Fold-change ( $\leq -1.5$  y  $\geq 1.5$ ) en el eje X y p-value (0.05) en el eje Y. Los puntos incluidos en la zona roja (118) son los sitios CpG que tuvieron una pérdida de metilación significativa (izquierda), y los puntos incluidos en la zona verde (95) son los sitios CpG que tuvieron una ganancia de metilación significativa (derecha).

En la **Figura No. 21** se pueden observar los 213 sitios CpG que tuvieron una metilación diferencial significativa, comparando el estado de metilación del GP, con el del GC.

De forma horizontal, se observa un agrupamiento jerárquico de las muestras en sus respectivos grupos. El bloque que se posiciona a lado del cuadro morado (arriba) representa al grupo problema (GP), y el bloque que se posiciona a lado del cuadro azul (abajo) representa al grupo control (GC).

De forma vertical, se observa un agrupamiento jerárquico de los sitios CpG con metilación diferencial significativa, identificados anteriormente.

En el *heatmap* (o “mapa de calor”), del lado izquierdo arriba, se observan los 95 sitios CpG que tuvieron una ganancia de metilación en el GP, identificados en un rango de tonos de verde, ya que tuvieron un valor de Beta cercano a 1, en comparación con el GC, del lado izquierdo abajo (que se observa en un tono de rangos de rojo). Del lado derecho arriba, se observan los 118 sitios CpG que tuvieron una pérdida de metilación en el GP que, al contrario, son identificados en un rango de tonos de rojo, ya que tuvieron un valor de Beta cercano a 0, en comparación con el GC, derecho abajo (que se observa en un rango de tonos de verde).



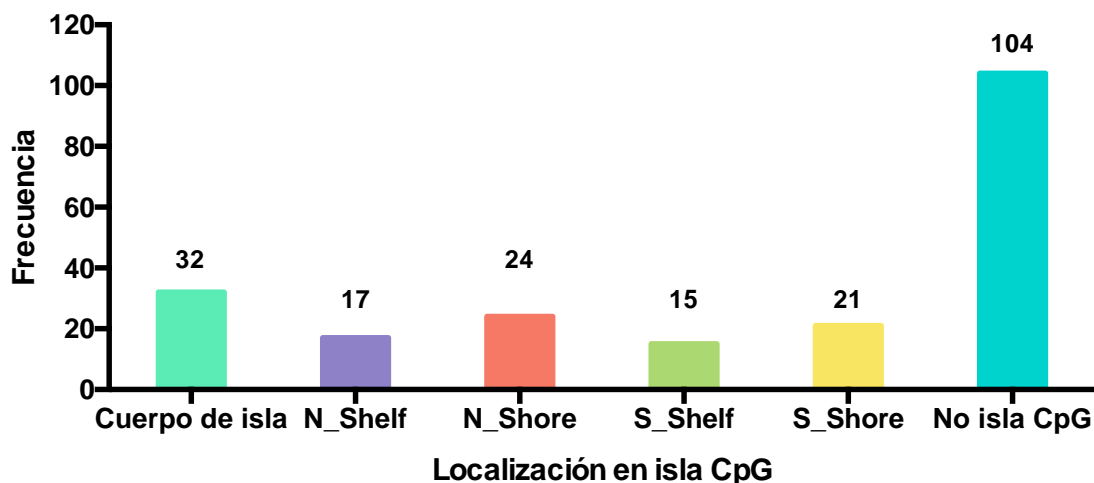
**Figura No. 21** Sitios CpGs con cambios significativos de metilación en los grupos de estudio. Agrupamiento jerárquico de los sitios CpG con metilación diferencial significativa identificados en el GP (morado) con respecto al GP (azul). En el heatmap, se observan en un rango de tonos de verde los sitios CpG que tuvieron una ganancia de metilación significativa en el GP (izquierda arriba), en comparación con el GC (izquierda abajo); y en un rango de tonos de rojo los sitios CpG que tuvieron una pérdida de metilación significativa en el GP (derecha arriba), en comparación con el CG (derecha abajo).

### 11.3.3 ANÁLISIS BIOLÓGICO

El análisis biológico sirve para obtener información relevante acerca de los sitios CpG con metilación diferencial significativa, como su ubicación en regiones evaluadas de islas CpG o regiones génicas, el gen en el que se encuentra el sitio CpG, el cromosoma, y la función asociada al gen, así como los procesos biológicos en los que estos pueden estar implicados, con el fin de dar sentido biológico a la información obtenida, en relación a la regulación de la expresión génica que ejerce la metilación del DNA en regiones específicas, y el efecto que esto tiene.

El análisis biológico se divide en tres niveles. El primer nivel de este análisis identifica la localización de los sitios CpG con metilación diferencial significativa, tanto en islas CpG (**Figura No. 22**) como en regiones génicas (**Figura No. 23**).

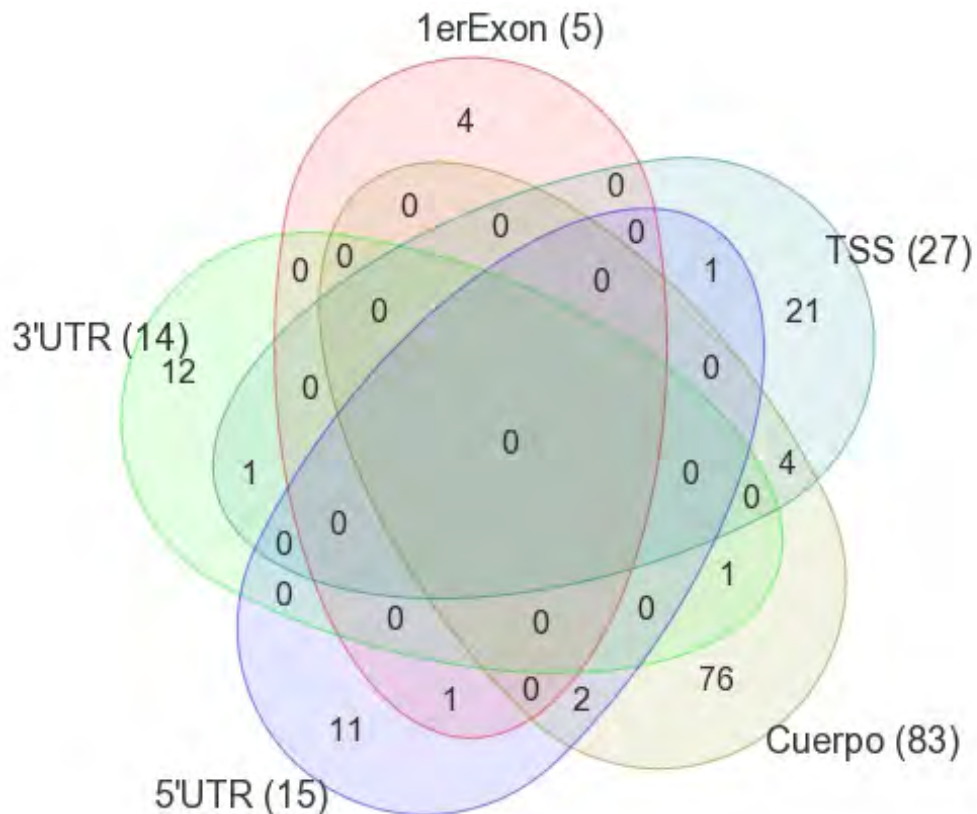
En la **Figura No. 22** se muestran las frecuencias que tienen los sitios CpG con metilación diferencial significativa en las regiones en islas CpG evaluadas: cuerpo de la isla y regiones flanqueantes (shelves y shores). Se puede observar que la mayoría de los sitios CpG con metilación diferencial significativa no se encuentran asociados a una isla CpG (frecuencia de 104), siguiendo los sitios que se encuentran en cuerpos de islas CpG (frecuencia de 32), después en shores (frecuencias de 24 y 21), y por último, en shelves (frecuencias de 17 y 15). Este gráfico ayuda a identificar si algunos de los sitios CpG identificados se encuentran en regiones con relevancia en la regulación de la expresión de genes, que será tratado de forma más amplia en la discusión de resultados.



**Figura No. 22** Frecuencias de ubicación de los sitios CpG con metilación diferencial significativa en islas CpG y regiones flanqueantes, en el metiloma. Gráfica de (continúa)

barras que muestra la frecuencia que presentan los 213 sitios CpG en el cuerpo de la isla (turquesa), las regiones flanqueantes: N\_shelf (morado), N\_shore (rojo), S\_shelf (verde), S\_shore (amarillo), así como sitios CpG no asociados con islas CpG (azul).

En la **Figura No. 23** se muestran las frecuencias que tienen los sitios CpG con metilación diferencial significativa en las regiones génicas evaluadas: TSS, 5'UTR, 1er Exón, cuerpo del gen y 3'UTR. Ya que un sitio CpG puede ubicarse en más de una región, los resultados se presentan en un diagrama de Venn. En este mismo, se observa que la mayoría de los sitios CpG se encuentran ubicados en el cuerpo del gen (83), seguido por la región TSS (27), 5'UTR (15), 3'UTR (12), y por último 1er exón (5), considerando que algunos de estos se encuentran compartidos entre regiones. Este gráfico ayuda a la identificación de cambios de metilación relevantes en sitios CpG, con base a la ubicación que tienen en las regiones génicas evaluadas. La relevancia y función que puede tener la ganancia o pérdida de metilación de estos sitios en la regulación de la expresión de genes (y otras funciones biológicas) se revisará de forma más amplia en la discusión de resultados.



**Figura No. 23** Regiones génicas en las que se encuentran los sitios CpG con metilación diferencial significativa. Diagrama de Venn que muestra las frecuencias de ubicación de (*continúa*)

los sitios CpG con metilación diferencial significativa en las regiones génicas evaluadas y las intersecciones entre ellas: cuerpo (café), TSS (azul), 5'UTR (morado), 3'UTR (verde) y 1er Exón (rojo).

El segundo nivel del análisis biológico consistió en identificar los genes en los que se encontraron los sitios CpG con la metilación diferencial significativa, para así ubicarlos en su respectivo cromosoma y ubicar el gen correspondiente a dicha región tratando a su vez, de obtener la función asociada. Estos resultados se dividen en los sitios CpG que tuvieron una ganancia de metilación (mayor Fold-change) en la **Tabla No. 16**, pérdida de metilación (menor Fold-change) en la **Tabla No. 17** y los que se intersectan en regiones génicas promotoras (TSS, 5'UTR, 1er Exon y Cuerpo) en la **Tabla No. 18**, como se puede observar a continuación.

**Tabla No. 16** Genes con ganancia de metilación en niños expuestos a preeclampsia y obesidad materna durante su gestación

Gen	Cromosoma	Localización	Función asociada (Uniprot, 2017)
PSORS1C1	6	TSS	Susceptibilidad a psoriasis
MAD1L1	7	Cuerpo	Checkpoint del ciclo celular
NAT14	19	TSS	Actividad de N-acetiltransferasa
CLDN4	7	TSS	Molécula estructural en espacio intracelular
SPTB	14	Cuerpo	Formación de la estructura del citoesqueleto
PROM2	2	TSS	Unión a colesterol
OCA2	15	Cuerpo	Transporte de tirosina
ODF3L1	15	TSS	Formación de fibra densa externa



TMCO4	1	Cuerpo	Proteína de transmembrana
SFXN1	5	5'UTR	Transporte de hierro en la mitocondria

Gen, cromosoma, localización (región génica) y función asociada de los sitios CpG con ganancia de metilación significativa identificados en el análisis diferencial

**Tabla No. 17** Genes con pérdida de metilación en niños expuestos a preeclampsia y obesidad materna durante su gestación

Gen	Cromosoma	Localización	Función asociada (Uniprot, 2017)
MAML3	4	Cuerpo	Coactivador transcripcional de proteínas NOTCH
PIAS4	19	Cuerpo	Actividad de sumo ligasa, actividad de correpresor de transcripción
HLA-DQA2	6	Cuerpo	Procesamiento y presentación de antígeno
CDSN	6	5'UTR; Cuerpo	Homodimerización de barrera epidermal
INTS1	7	Cuerpo	Procesamiento de snRNA
GSTM1	1	Cuerpo	Conjugación de glutatión
PSD4	2	Cuerpo	Factor de intercambio de guanina
LHFP	13	Cuerpo	Unión a DNA

UBR3	2	Cuerpo	Habilidad de ubiquitin-ligasa
LGALS8	1	Cuerpo	Regulación positiva de maduración de autofagosoma

Gen, cromosoma, localización (región génica) y función asociada de los sitios CpG con pérdida de metilación significativa identificados en el análisis diferencial

**Tabla No. 18** Genes con ganancia o pérdida de metilación ubicados en zonas de regulación de la expresión génica en niños expuestos a preeclampsia y obesidad materna durante su gestación

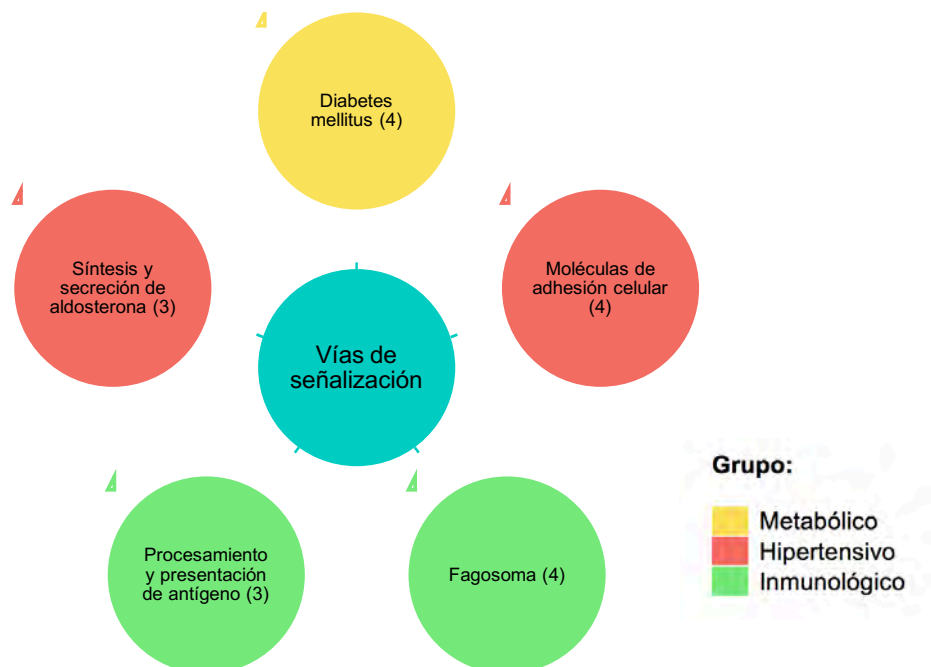
Gen	Cromosoma	Localización	Función asociada (Uniprot, 2017)	Estado de metilación
CDSN	6	5'UTR; Cuerpo	Homodimerización de la barrera epidermal	Pérdida de metilación
ASTN1	1	TSS; Cuerpo	Molécula de adhesión neuronal que se requiere para la migración normal de neuroblastos, durante el desarrollo del cerebro y del cerebelo	Pérdida de metilación
PLEKHG6	12	TSS; 5'UTR	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina que activa la GTPasa RHOA (induce la formación de filamentos de miosina)	Ganancia de metilación
HIVEP3	1	5'UTR; 1er	Factor de	Ganancia de

		Exon	transcripción	metilación
SH3BP5	3	5'UTR; Cuerpo	Inhibe la actividad auto- y de transfosforilación de BTK	Ganancia de metilación

Gen, cromosoma, localización (región génica), función asociada y estado de metilación de los sitios CpG con metilación significativa identificados que comparten localización en regiones génicas promotoras.

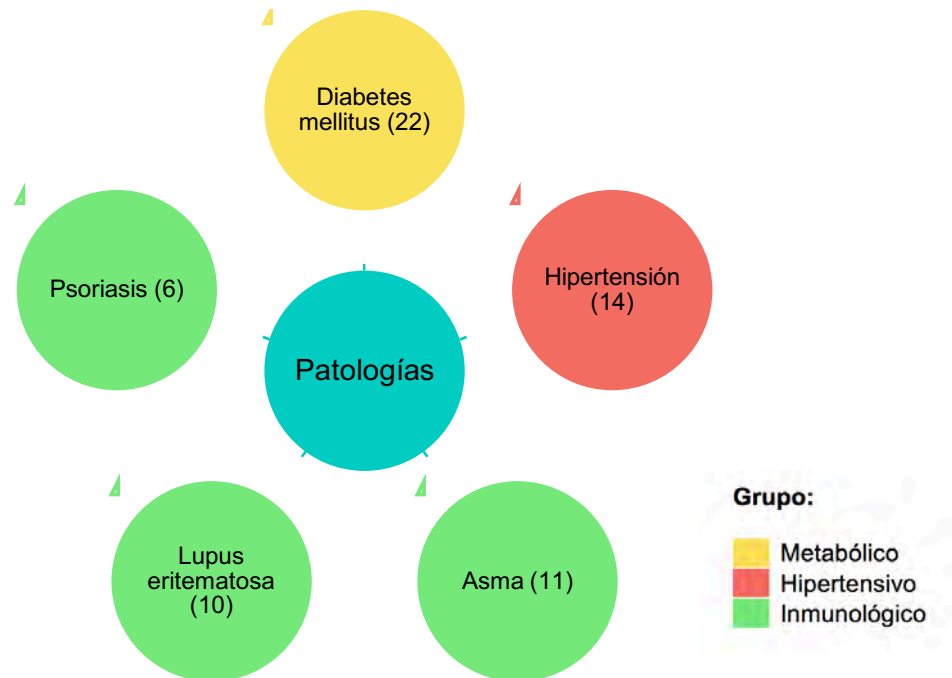
El tercer y último nivel corresponde a un análisis ontológico de la totalidad de sitios CpG con metilación diferencial significativa (213) para identificar las vías de señalización (**Figura No. 24**) y patologías (**Figura No. 25**) asociadas con los genes en los que estos sitios se encuentran. La utilidad de este análisis es identificar las funciones en conjunto que pueden tener los genes asociados y el efecto que tenga la regulación de la expresión de dichos genes, en específico, de forma que se pueda guiar acerca de desregulaciones en las vías y/o predisposición a las patologías encontradas, explicar e identificar posibles fenotipos encontrados en los individuos del GP y sugerir estudios enfocados en la evaluación de tales vías y/o patologías, con base a los conceptos de programación fetal y plasticidad del desarrollo.

En la **Figura No. 24** se observan las cinco vías de señalización en las que se encuentran implicados una mayor cantidad de genes asociados con los sitios CpG con metilación diferencial significativa, y el grupo de vías de señalización en el que se clasificaron. En las vías que se encontraron más genes implicados fueron: diabetes mellitus, moléculas de adhesión celular y fagosoma, con cuatro genes, cada una. Las vías de procesamiento y presentación de antígeno, así como síntesis y secreción de aldosterona tienen tres genes implicados, cada una. Cada una de ellas fue incluida en un grupo, para el análisis del fenotipo obtenido. En la discusión de resultado se muestran los genes relacionados con estas vías de señalización, y los estudios que existen acerca del efecto de modificaciones epigenéticas en ellas.



**Figura No. 24** Ontología asociativa con las vías de señalización de mayor número de genes encontrados a través de la metilación diferencial. Entre paréntesis, se señala el número de genes relacionados con la vía de señalización mencionada. El color en que se muestra cada vía, indica el grupo de vías de señalización en el que fueron clasificadas para la discusión de resultados (DAVID, 2017; KEGG, 2017).

En la **Figura No. 25** se observan las cinco patologías en las que se encuentran implicados una mayor cantidad de genes asociados con los sitios CpG con metilación diferencial significativa, y el grupo de patologías en el que se clasificaron. En las patologías que se encontraron más genes implicados fueron: diabetes mellitus (22), hipertensión (14), asma (11), lupus eritematosa (10) y psoriasis (6). Cada una de ellas fue incluida en un grupo, para el análisis del fenotipo obtenido. En la discusión de resultado se muestra la evidencia que existe acerca del efecto de modificaciones epigenéticas en ellas, así como la importancia que tienen los mecanismos epigenéticos como posibles etiologías de estas patologías, ya que todas ellas se pueden considerar como complejas.



**Figura No. 25** Ontología asociativa con las patologías de mayor cantidad de genes encontrados en la metilación diferencial. Entre paréntesis, se señala el número de genes relacionados con la patología mencionada. El color en que se muestra cada patología, indica el grupo de patologías en el que fueron clasificadas para la discusión de resultados (DAVID, 2017; OMIM, 2017).

# 12.

## Discusión de resultados

Las complicaciones durante embarazo representan una problemática importante de salud, no solamente para la mujer embarazada, sino también en los niños nacidos. Según la OMS (2003), alrededor de 15% de los embarazos, en el mundo, cursan con una complicación que podría comprometer la vida de la madre y el producto, de no ser tratada adecuadamente. Los niños nacidos expuestos a la preeclampsia y la obesidad durante el embarazo tienen un mayor riesgo de una variedad de enfermedades, tales como enfermedades endocrinas, nutricionales, metabólicas y enfermedades de la sangre y los órganos hematopoyéticos (Wu, 2009).

En los niños nacidos expuestos a preeclampsia, aumenta el riesgo de mortalidad y morbilidad neonatal, así como el de parto prematuro (mayor riesgo de síndrome de dificultad respiratoria, taquipnea transitoria del recién nacido, hipertensión pulmonar persistente e insuficiencia respiratoria), restricción del crecimiento intrauterino y trombocitopenia neonatal. De igual forma, está asociada con un mayor riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar, y puede afectar el desarrollo neurológico de los recién nacidos de formas variables (Backes, 2011). La obesidad durante el embarazo se considera un estado de alto riesgo debido a que está asociado con muchas complicaciones adversas obstétricas y perinatales como diabetes gestacional, hipertensión, preeclampsia, tromboembolismo, macrosomía, mayor incidencia de cesáreas y mortalidad perinatal (Bautista, 2013).

En México, el panorama es grave, ya que el estudio de la morbilidad materna se ha centrado en las complicaciones de salud que culminan con la muerte de la madre, pero no en la morbilidad obstétrica aguda o crónica, que no conduce a la muerte, pero puede tener consecuencias en la calidad de vida, teniendo escasas fuentes que ofrecen información estadística. En una de ellas, ENADID 2009, se muestra información sobre la sintomatología que presentan las mujeres durante el embarazo. Sin embargo, no son concluyentes respecto a la presencia de complicaciones (Pérez, 2013). Adicionalmente, estas encuestas no consideran síntomas relacionados con la obesidad durante el embarazo, por lo tanto, no se considera a esta enfermedad como una complicación propia durante esta etapa.

La falta de evidencia en estudios con la población mexicana a gran escala, entre otros factores, llevó al planteamiento de realizar un estudio piloto. El término "estudio piloto" se utiliza de dos maneras en la investigación científica. Puede referirse a los llamados

estudios de factibilidad, que son “la versión a pequeña escala, o los ensayos realizados en preparación para un estudio principal”. Un estudio piloto también puede ser la preprueba de un instrumento de investigación en particular. Una de las ventajas de realizar un estudio piloto es que puede advertir con antelación sobre dónde podría fallar el proyecto de investigación principal, donde los protocolos de investigación podrían no ser seguidos o si los métodos o instrumentos propuestos son inadecuados o demasiado complicados (van Teijlingen, 2002).

Un obstáculo primario en el estudio presente fue establecer el criterio clasificatorio entre el grupo control (GC) y el grupo problema (GP), debido a la falta en los consensos clínicos de las definiciones para el embarazo normoevolutivo y el embarazo de riesgo por complicaciones asociadas y sus niveles de gravedad. Por ello, se propuso la realización de un perfil clínico clasificatorio utilizando ciertas variables cuantitativas y cualitativas de la evaluación durante el embarazo y del niño menor de tres años, con base en los datos consultados de la bibliografía que se reporta en las tablas generadas con los datos disponibles en los historiales clínicos de los sujetos de estudio. El primer logro del trabajo presente muestra los parámetros ideales a considerar en un embarazo normoevolutivo y en uno de riesgo alto por complicaciones de preeclampsia y obesidad durante el embarazo, siendo las variables cuantitativas los mejores indicadores clasificatorios para la evolución del embarazo. No obstante, al ser este un estudio piloto con la limitante en el número de sujetos de estudio, las variables cualitativas podrían dar una respuesta mayor en el grado de severidad; razón por las que deberán aún ser contempladas en estudios futuros.

Los procesos críticos para la maduración del feto son altamente sensibles a las alteraciones en el ambiente intrauterino. El feto fisiológicamente inmaduro es altamente susceptible a interrupciones en el flujo sanguíneo intrauterino placentario y los insultos de las exposiciones acumuladas. La evidencia sugiere que varias enfermedades complejas del adulto pueden comenzar durante desarrollo fetal, y los insultos durante los períodos sensibles del desarrollo pueden predisponer al individuo a un riesgo creciente de enfermedades en la etapa adulta (Backes, 2011). La necesidad de estudios adicionales para comprender las vías causales que pueden conducir al desarrollo desordenado del feto (tentativamente epigenéticas), así como el impacto potencial de las complicaciones durante el embarazo en la alteración de la expresión de genes clave implicados en la



programación fetal y en los procesos de la enfermedad en adultos fue el estímulo que llevó a querer estudiar el perfil de metilación en la niñez temprana expuesta a preeclampsia y obesidad durante el embarazo en este estudio.

Se conoce como metiloma o perfil de metilación a la distribución genómica de la secuencia de DNA metilado presente en una célula, que es capaz de sufrir modificaciones con respecto al entorno y/o a la etapa de desarrollo (Kanherkar, 2014). La preeclampsia y la obesidad durante el embarazo, tanto de forma individual, como en conjunto, se consideran insultos ambientales que afectan el desarrollo embrionario y fetal a partir de la desregulación del metiloma.

En el creciente campo de la epigenética, existen varios métodos disponibles para determinar el estado de metilación de las muestras de DNA. Sin embargo, el método para elegir que mejor se adapte a responder una cuestión biológica particular todavía resulta ser una tarea difícil. Hay varios factores clave que deben ser considerados al elegir un método para el análisis de metilación del DNA:

- Los objetivos del estudio (por ejemplo, el descubrimiento de cambios epigenéticos de novo o la investigación de sitios de metilación conocidos de genes específicos de interés);
- La cantidad y calidad de la(s) muestra(s) de DNA;
- Los requisitos de sensibilidad y especificidad del estudio;
- La robustez y simplicidad del método;
- La disponibilidad del programa de bioinformática para el análisis e interpretación de los datos;
- La disponibilidad de equipos especializados y reactivos;
- Costo.

Cuando se conocen los genes candidatos que se van a evaluar, se pueden utilizar técnicas de estudio como PCR específica de metilación, *High Resolution Melting* (HRM), conversión con bisulfito seguida de secuenciación, entre otras. Sin embargo, cuando se ignoran los genes candidatos, se pueden utilizar técnicas como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Luminometric Methylation Assay* (LUMA), o chips de microarreglos de metilación; siendo esta última la técnica elegida, ya que se buscaba encontrar regiones de metilación diferencial entre grupos.

La búsqueda de regiones metiladas diferencialmente utilizando DNA convertido con bisulfito podría hacerse con el uso de diferentes técnicas. Algunos de ellas son más fáciles de realizar y analizar que otras, porque solamente se utiliza una fracción del genoma, centrándose en regiones de interés biológico, como las regiones promotoras. Los ensayos que se centran en estas regiones específicas, como el *Infinium Human Methylation 450 Bead Chip array* de Illumina®, pueden presentar muchas ventajas, como el ahorro de tiempo y dinero. La matriz puede detectar el estado de metilación desde ~ 500 ng de DNA, repartido en más de 485.000 sitios CpG, en el 99% de genes conocidos, incluyendo regiones génicas e islas CpG. El análisis de una cantidad tan enorme de datos ha sido tema respecto a sus ventajas; aunque también hay consciencia de que hasta el 6% de las sondas podrían dar falsos positivos, debido a la reactividad cruzada.

El método más popular para el perfilado de metilación es la modificación con bisulfito de sodio utilizados para el análisis de genoma completo y métodos de bajo rendimiento que pueden acceder a la metilación de un único locus. Hasta la fecha, más de 360 publicaciones utilizaron matrices de metilación de Illumina. El número mínimo de muestras por kit es 24, y el chip para la hibridación acomoda 12 muestras, por lo que sigue siendo un ejercicio bastante costoso para algunos laboratorios y no es adecuado para proyectos pequeños (Kurdyokov, 2016).

Algunas desventajas del chip de microarreglos utilizado es que solamente es adecuado para el estudio del DNA humano, y la hibridación cruzada entre secuencias similares. Las altas relaciones señal/ruido y el hecho de que la hibridación competitiva en microarreglos es una medida relativa, que limita el rango dinámico de datos de alta confianza. Esto hace que la detección de secuencias de baja abundancia sea difícil y la resolución cuantitativa de cambios en secuencias altamente representadas sea igualmente desafiante.

Adicionalmente, existe la preocupación de que la variedad de formatos de microarreglos disponibles, las metodologías preparativas y los enfoques analíticos pueden limitar la reproducibilidad de los datos (Hurd, 2009).

Un procedimiento exitoso para los análisis de metilación es fundamental trabajar con DNA de alta calidad y concentración. En este trabajo se procuró trabajar con los más altos índices de calidad tanto para la extracción y cuantificación como para la pureza de

éste. La electroforesis en gel de agarosa se utiliza comúnmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma, incluyendo fragmentos de DNA de diferentes tamaños. Para separar el DNA usando electroforesis en gel de agarosa, las muestras se mezclan con componentes que les agregan densidad, como el glicerol o la sacarosa (buffer de carga). Estos proporcionan a las muestras más densidad que la del buffer de electroforesis. El DNA puede entonces cargarse en pozos pre-moldeados en el gel y se aplica una corriente. El esqueleto de fosfatos de la molécula de DNA está cargado negativamente, por lo tanto, cuando se colocan en un campo eléctrico, los fragmentos de DNA migrarán al ánodo cargado positivamente. Dado que el DNA tiene una relación masa/carga uniforme, las moléculas de DNA se separan por tamaño dentro de un gel de agarosa en un patrón tal que la distancia recorrida es inversamente proporcional al Log de su peso molecular (Krebs, 2014).

El bromuro de etidio (EtBr) es el reactivo más común para teñir el DNA en geles de agarosa. El EtBr trabaja intercalándose en la molécula de DNA de una manera dependiente de la concentración. Cuando se exponen a la luz ultravioleta, se activan electrones en el anillo aromático de la molécula de etidio, lo que conduce a la liberación de energía (luz) a medida que los electrones vuelven al estado fundamental. Esto permite una estimación de la cantidad y calidad de DNA en cualquier banda (Sharp, 1973).

La velocidad de migración de una molécula de DNA a través de un gel se encuentra determinada por lo siguiente: 1) tamaño de la molécula de DNA; 2) concentración de agarosa; 3) Conformación del DNA; 4) voltaje aplicado, 5) presencia de EtBr (debido a su carga positiva, el uso de EtBr reduce la tasa de migración del DNA en un 15%), 6) tipo de agarosa y 7) buffer de electroforesis (Lee, 2012).

El uso de DNA a partir de muestras biológicas sanguíneas, para el análisis de metilación, ha sido empleado para la evaluación de diferentes enfermedades complejas, como diabetes mellitus tipo 2, diversos tipos de cáncer y cardiopatías congénitas. Es importante destacar que la heterogeneidad celular puede actuar como un factor de confusión cuando se mide la metilación del DNA en sangre completa y se está explorando la posibilidad de ajustar los recuentos diferenciales de células. Sin embargo, aún no está claro si esta estrategia es suficiente para corregir la variación interindividual, las relaciones de linaje (mieloides versus linfoides) y los efectos potenciales de

diferencias prominentes de metilación en poblaciones celulares menos frecuentes (por ejemplo, células B, eosinófilos y células T reguladoras) (Reinius, 2012).

Un estudio reciente por parte de Reinius y cols. (2012) demostró que los patrones de metilación del DNA difieren más entre las poblaciones de células sanguíneas que entre las variaciones interindividuales. Existe una variación importante en los perfiles de metilación de sangre completa, células mononucleares, granulocitos y células de otros linajes. De igual forma, este análisis reveló que en las poblaciones de células mieloides, la mayoría de los sitios CpG estaban hipometilados, mientras que para las poblaciones linfoides, la mayoría se encontraban hemo o hipermetilados. Cuando se compararon las dos fracciones mayores de leucocitos en sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y granulocitos, hubo una gran superposición de sitios CpG diferenciadamente metilados. Sin embargo, al examinar los sitios diferenciadamente metilados que mostraban estado no metilado, los solapamientos se redujeron.

Además, se estudió la distribución genómica de los sitios diferenciados metilados en cada población celular. Esto reveló que la mayoría de los sitios CpG no metilados y metilados estadísticamente significativos estaban localizados en regiones intragénicas (cuerpos génicos) y no asociados con islas CpG. No hubo diferencias en esta distribución entre PBMCs y granulocitos o para cualquiera de los tipos de células purificadas. Las células B mostraron el perfil de metilación más único, lo que sugiere que los estudios en células B reflejan mal el estado general de metilación de las células sanguíneas en general.

Toda la evidencia anterior indica que los resultados de metilación de la sangre entera podrían ser ininteligibles. Para los genes individuales, incluso si los patrones de metilación general puede parecer similar, unos pocos sitios CpG en las regiones reguladoras pueden tener patrones de metilación opuestos (es decir, hipo/hiper) en los tipos de células sanguíneas principales. La interpretación de los perfiles de metilación de la sangre entera debe ser realizada con precaución (Reinius, 2012).

En el genoma humano hay alrededor de 28 millones de sitios CpG. Dependiendo de la región cromosómica, el tipo celular, la fase de desarrollo, los alelos y el origen, un sitio CpG puede encontrarse hipermetilado, hipometilado o hemimetilado. La metilación del DNA está implicada en la regulación de la represión transcripcional y el silenciamiento

génico. Junto con otros mecanismos epigenéticos, la metilación del DNA funciona como un interruptor que activa y desactiva los genes relevantes, un mecanismo crucial en el desarrollo, la diferenciación y la homeostasis (Reinius, 2012).

El epigenoma, en general, se caracteriza por una respuesta dinámica y flexible a estímulos intracelulares y extracelulares, a través del contacto célula-célula, por células vecinas, por fisiología, o totalmente por el ambiente al que está expuesto el organismo. Citocinas, factores de crecimiento, alteraciones en los niveles hormonales, así como la respuesta al estrés y factores neurotróficos son algunos ejemplos de moléculas que son moduladas por el medio ambiente, y que entran en la categoría de modificadores de epigenoma. En última instancia, el ambiente presenta estos diversos factores al individuo que influyen en el epigenoma, y el perfil epigenético y genético único de cada individuo también modula la respuesta específica a estos factores.

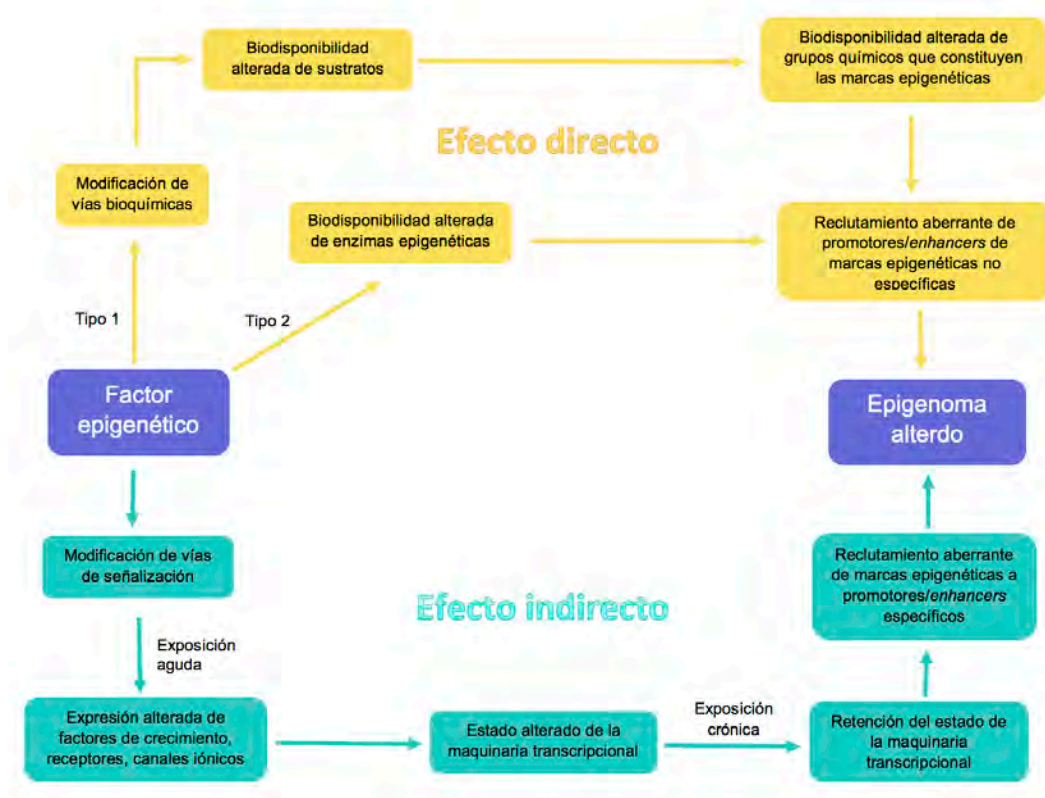
Los efectos de un modificador epigenético pueden manifestarse como un cambio global en la metilación del DNA que afecta a múltiples genes, o la expresión modificada de genes muy específicos. Los mecanismos y vías celulares que están implicados en la presencia de estos cambios epigenéticos globales o específicos no se saben con exactitud.

Kanherkar y cols. (2014) proponen que un modificador epigenético puede actuar por medio de un mecanismo directo o indirecto. Un efecto directo podría ocurrir de dos maneras; Tipo 1 y Tipo 2. En el Tipo 1, el efecto directo se produce cuando el modificador epigenético directamente altera el estado de las enzimas epigenéticas, ya sea mediante la unión a ellos y la prevención de llevar a cabo su función normal, dañándolos de alguna u otra manera, o regulándolos. La biodisponibilidad alterada de las enzimas epigenéticas resulta entonces en el reclutamiento aberrante de marcas epigenéticas en promotores y potenciadores a escala genómica. Tal efecto directo es evidente en todo el genoma, no afectando a ningún gen específico, pero resultando en un epigenoma alterado aleatoriamente.

Los efectos directos de tipo 2 se producen cuando un modificador epigenético provoca un cambio en un proceso bioquímico que da lugar a una disponibilidad alterada de un sustrato, intermediario, subproducto o cualquier otro metabolito que participa en la vía

bioquímica, que se utiliza para establecer marcar epigenéticas. Esto a su vez conduce a la disponibilidad alterada de marcas epigenéticas.

La segunda manera principal en que los factores pueden causar cambios epigenéticos se conoce como mecanismos indirectos. Se postula un mecanismo bifásico para los efectos indirectos en el que la exposición aguda a un factor influye en las vías de señalización celular que conduce a la expresión alterada de factores de crecimiento, receptores y canales iónicos, que a su vez, alteran la actividad de los factores de transcripción en los promotores génicos. Con una exposición más crónica, los factores de transcripción y otras proteínas reguladoras de genes, además de alterar la actividad de expresión génica, realmente reclutan o repelen enzimas epigenéticas asociadas a la cromatina, dando como resultado la adición o eliminación de marcas epigenéticas. De esta manera, las células se adaptan a los cambios persistentes en la expresión génica al causar modificaciones permanentes en la metilación del DNA y en la estructura de la cromatina, lo que lleva a una alteración duradera de la red epigenética afectada (Kanherkar, 2014). En la **Figura No. 26** se observan ambas vías epigenéticas esquematizadas.



**Figura No. 26** Las vías epigenéticas directa e indirecta. La figura representa dos diferentes rutas por las que un factor epigenético puede modificar el epigenoma, llevando a una (continúa)

expresión génica alterada. Los efectos epigenéticos ejercidos por un factor externo o ambiente intrínseco puede llevar a efectos directos e indirectos en el epigenoma. Amarillo representa los efectos directos de un factor epigenético y azul representa los efectos indirectos. Modificado de Kanherkar (2014).

Por lo tanto, se propone que la preeclampsia y la obesidad durante el embarazo, como insultos ambientales para el desarrollo embrionario y fetal, ejercen cambios en las marcas epigenéticas por ambos mecanismos de la vía epigenética directa (tipo 1 y 2), mediados por las alteraciones sistémicas en ambas complicaciones, afectando principalmente a la placenta, y traducidas en modificaciones en la cantidad, calidad y distribución de nutrimentos, estrés oxidativo, hipoxia e inflamación.

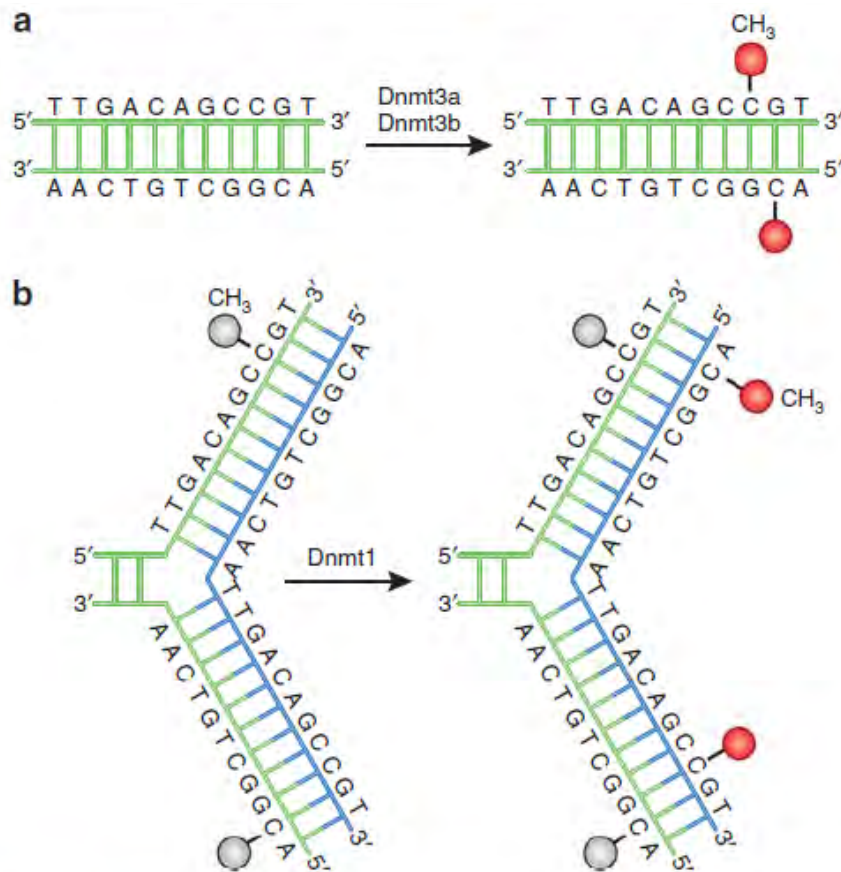
El epigenoma (y, por tanto, el metiloma) representa la capacidad de un organismo para adaptarse a través de la expresión de un conjunto de características o fenotipos desarrollados en respuesta a estímulos o insultos ambientales. El metiloma es particularmente susceptible a la desregulación durante la gestación debido a que la tasa de síntesis de DNA es alta y se establecen patrones elaborados de metilación del DNA y modificaciones de la cromatina necesarias para el desarrollo tisular normal (Dolinoy, 2007).

En específico, la metilación en el quinto carbono de la citosina es una de las marcas epigenéticas más estudiadas. Aunque muchos investigadores propusieron que la metilación del DNA podía regular la expresión génica, no fue hasta la década de 1980 que varios estudios demostraron que la metilación del DNA estaba involucrada en la regulación de genes y la diferenciación celular, entre otros procesos biológicos importantes (Moore, 2012).

Las enzimas que establecen, reconocen y eliminan la metilación del DNA se dividen en tres clases: escritoras, borradoras, y lectoras. Las escritoras son las enzimas que catalizan la adición de grupos metilo en los residuos de citosinas. Las borradoras modifican y eliminan al grupo metilo. Las lectoras reconocen y se unen a grupos metilo para influir, en última instancia, en la expresión génica.

La metilación del DNA es catalizada por una familia de metiltransferasas de DNA (Dnmts) que transfieren un grupo metilo a partir de la S-adenil metionina (SAM) al quinto residuo de carbono de una citosina para formar 5mC. Tres miembros de la familia Dnmt catalizan

directamente la adición de grupos metilo en el DNA: Dnmt1, Dnmt3a, y Dnmt3b. Dnmt3a y Dnmt3b pueden establecer un nuevo patrón de metilación de DNA sin modificar y por lo tanto se conocen como Dnmts de novo. Por otra parte, la función de Dnmt1 es copiar el patrón de metilación de DNA de la cadena parental a la cadena hija recién sintetizada, durante la replicación del DNA, por lo que también se llama Dnmt de mantenimiento, ya que mantiene el patrón original de metilación del DNA en un linaje celular (Moore, 2012). En la **Figura No. 27** se resumen los mecanismos de metilación del DNA.



**Figura No. 27** Vías de metilación del DNA. Una familia de DNA metiltransferasas (Dnmts) catalizan la transferencia de un grupo metil a partir de S-adenil metionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de citosina, para formar 5-metilcitosina (5mC). a) Dnmt3a y Dnmt3b son Dnmts de novo y transfieren grupos metil (rojo) al DNA desnudo. b) Dnmt1 es la Dnmt de mantenimiento y mantiene el patrón de metilación del DNA durante la replicación. Cuando el DNA lleva a cabo su replicación semiconservativa, la cadena parental mantiene el patrón original de metilación (gris). La Dnmt1 se asocia a los focos de replicación y adhiere precisamente los grupos metil (rojo) a las cadenas recién formadas. Modificado de Moore (2012).

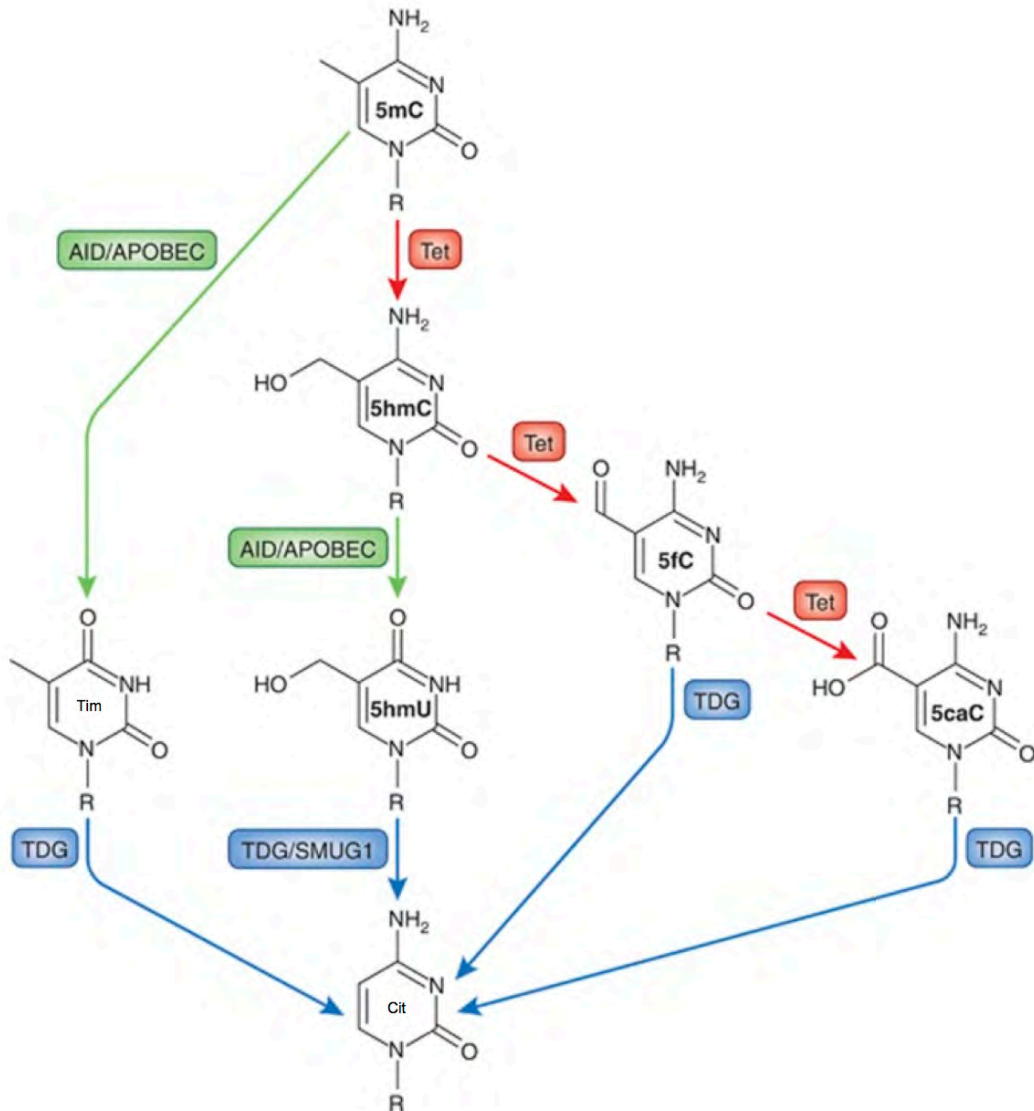


La desmetilación del DNA se caracteriza por ser pasiva o activa. La desmetilación del DNA pasiva se produce en las células en división. Mientras la Dnmt1 mantiene activa la metilación del DNA durante la replicación celular, su inhibición o disfunción permite a las citosinas no metiladas recién incorporadas a permanecer de esa forma y, en consecuencia, reduce el nivel de metilación global después de cada división celular.

La desmetilación activa del DNA puede ocurrir tanto en células en división y no en división, pero el proceso requiere reacciones enzimáticas para procesar la 5mC, con el fin de volverla de nuevo a una citosina desnuda.

Hasta el momento, no existe un mecanismo conocido en células de mamífero que pueden escindir el fuerte enlace covalente carbono-carbono que conecta una citosina a un grupo metilo. En su lugar, la desmetilación ocurre a través de una serie de reacciones químicas que modifican las 5mCs, por desaminación y/o reacciones de oxidación que llega a un producto que es reconocido por la vía de reparación por escisión de bases (BER) para reemplazar la base modificada con una citosina desnuda. Aunque, en general, es acordado que la vía BER es el paso final en la desmetilación del DNA, las enzimas específicas y los productos químicos intermediarios que se forman durante la desmetilación del DNA siguen siendo objeto de debate (Moore, 2012).

En la **Figura No. 28** se resumen las vías activas de desmetilación del DNA.



**Figura No. 28** Vías activas de desmetilación del DNA. La 5mC puede ser modificada químicamente en dos sitios: el grupo amino y el grupo metilo. El grupo amino de 5mC puede ser desaminado (verde) por AID/APOBEC, convirtiendo la 5mC en timina (Tim). El grupo metilo de la 5mC puede ser modificado por la adición de un grupo hidroxilo mediado por las enzimas TET, para generar 5-hidroximetil-citosina (5hmC). La 5hmC también puede ser modificada en dos sitios: el grupo amino y el grupo hidroximetil. AID/APOBEC puede desaminar (verde) a la 5hmC para producir 5-hidroximetil-uracilo (5hmU). Otra vía para la 5hmC es que TET la puede oxidar (rojo) a 5-formil-citosina (5fC) y después a 5-carboxi-citosina (5caC). Eventualmente, los productos de cada vía, Tim, 5hmU, 5fC y 5caC, son reconocidos y escindidos, para ser reemplazados por una citosina desnuda, mediado por TDG y/o SMUG1, ambos componentes de la vía de reparación por escisión de bases (azul). Modificado de Moore (2012).

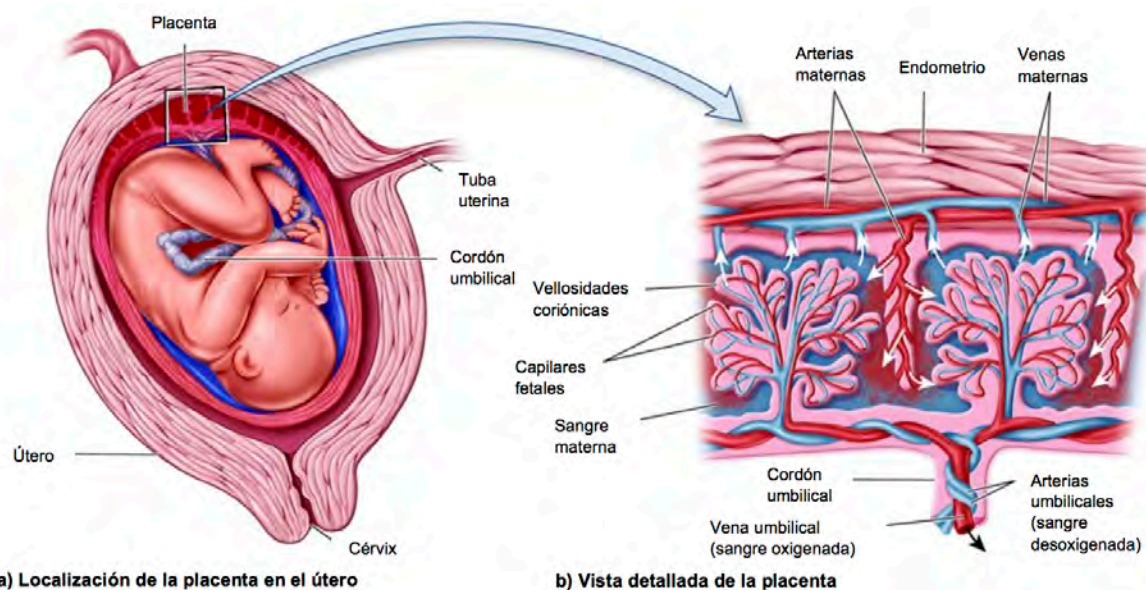
Puesto que la metilación del DNA puede, a su vez, reducir la expresión génica por alterar la unión de activadores transcripcionales, una segunda clase de proteínas con una alta afinidad por 5mC inhibe la unión de los factores de transcripción. La metilación del DNA es reconocida por tres familias diferentes de proteínas: las proteínas MBD, las proteínas UHRF, y las proteínas de dedos de zinc (Moore, 2012).

La nutrición es uno de los factores ambientales más influyentes y más estudiados. La nutrición durante el desarrollo embrionario y fetal es propiciada por la placenta, y es justo este órgano el que sufre más daño en las complicaciones del embarazo estudiadas.

La placenta se desarrolla a partir de tejido embrionario, y es más grande que el feto durante la mayor parte del embarazo. El desarrollo de la placenta precede al desarrollo fetal. Las funciones de la placenta incluyen:

- Producción de hormonas y enzimas;
- Intercambio de nutrimentos y gases entre la madre y el feto;
- Eliminación de desechos del feto.

Su estructura, que incluye una doble cubierta de células que separan la sangre materna de la fetal, actúa como barrera contra algunos compuestos dañinos y regula además la velocidad del paso de nutrimentos y otras sustancias hacia dentro y fuera de la circulación fetal (**Figura No. 29**). La función de barrera de la placenta se describe mejor como una valla que como un filtro que protege al feto contra todas las cosas dañinas. Muchas sustancias potencialmente dañinas (p. ej., alcohol, niveles excesivos de algunas vitaminas, drogas y ciertos virus) sí atraviesan la placenta hacia el feto. La placenta forma una barrera contra el paso de eritrocitos de la sangre materna, bacterias y muchas proteínas grandes. Además, evita la mezcla de sangre materna y fetal hasta el momento del parto, cuando tal vez se presente la rotura de vasos sanguíneos.



**Figura No. 29** Estructura de la placenta. a) Localización de la placenta en el útero. Se observa su unión con el endometrio, por su parte externa, y con el cordón umbilical, por su parte interna, para suministrar de nutrimentos al feto. b) Vista detallada de la placenta. Se observan las venas y arterias maternas, que llegan a la placenta a partir del endometrio, y depositan la sangre en ella, teniendo contacto con las vellosidades coriónicas, que harán llegar los nutrimentos y oxígeno, necesarios para el feto, por medio de las venas y arterias umbilicales. Revisado en Enero 28 de 2017. Disponible en: [http://biology-forums.com/gallery/33\\_01\\_08\\_11\\_10\\_36\\_29\\_12621022.jpeg](http://biology-forums.com/gallery/33_01_08_11_10_36_29_12621022.jpeg)

Respecto a la transferencia de nutrimentos, la placenta utiliza 30 a 40% de la glucosa liberada por la circulación materna. Si el aporte de nutrimentos es bajo, la placenta cubre sus necesidades antes de que los nutrimentos estén disponibles para el feto. Si el aporte de nutrimentos es menor que los requerimientos placentarios, se afecta el funcionamiento de la placenta para mantener el aporte de nutrimentos y la salud de la madre.

La transferencia de nutrimentos a través de la placenta depende de varios factores:

- Tamaño y carga de las moléculas disponibles para su transporte;
- Liposolubilidad de las partículas transportadas;
- Concentración de nutrimentos en la sangre materna y fetal.

Las moléculas pequeñas con carga pequeña o nula, y los lípidos atraviesan la placenta con mayor facilidad, en tanto que las moléculas grandes no se transfieren. Los tres

mecanismos primarios que regulan la transferencia de nutrimentos son: difusión pasiva, difusión facilitada, transporte activo y endocitosis/pinocitosis (Brown, 2014). En la **Tabla No. 19** se pueden observar la función y ejemplos de nutrimentos, para cada uno de estos mecanismos.

**Tabla No. 19** Mecanismos de transporte de nutrimentos a través de la placenta (Brown, 2014)

Mecanismo	Función	Ejemplo de nutrimento
Difusión pasiva/simple	Nutrimentos que se transfieren de la sangre con mayores concentraciones a la sangre con menores concentraciones	Agua, algunos aminoácidos y glucosa, ácidos grasos libres, cetonas, vitaminas E y K, algunos minerales (sodio, cloro), gases
Difusión facilitada	Los receptores (“acarreadores”) de las membranas celulares aumentan el índice de transferencia de nutrimentos	Algunos tipos de glucosa, hierro, vitaminas A y D
Transporte activo	Energía (del ATP) y receptores de membrana celular	Vitaminas solubles en agua, algunos minerales (calcio, cinc, hierro, potasio) y aminoácidos que requieren transferirse
Endocitosis y pinocitosis	Los nutrimentos y otras moléculas son deglutidos por la membrana de la placenta y liberados al depósito sanguíneo fetal	Inmunoglobulinas, albúmina

Con respecto a los niveles de nutrimentos en las complicaciones del embarazo estudiadas, se han reportado alteraciones en las circulaciones materna y fetal en embarazos preeclámpticos. Los niveles de aminoácidos maternos en aminoácidos y ácidos grasos se encuentran elevados en los embarazos complicados por la preeclampsia. Además, las concentraciones totales de aminoácidos son más altas e inversamente correlacionadas con el crecimiento fetal en la sangre del cordón umbilical

de los embarazos preeclámpticos. También se han informado alteraciones en los niveles de ácidos grasos de la sangre del cordón umbilical con preeclampsia, lo que sugiere una reducción de los ácidos grasos omega-3 y niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados.

Varios estudios han reportado actividad alterada en los niveles de mRNA de transportadores de nutrimentos placentarios en asociación con preeclampsia. Específicamente, las placentas de embarazos preeclámpticos tienen una capacidad reducida para transportar el aminoácido esencial taurina y aumentada para la arginina. Por lo tanto, la preeclampsia tiene efectos diferenciales sobre varios transportadores de aminoácidos que se encuentran en la placenta. Las expresiones de los transportadores de ácidos grasos placentarios también se alteran por la preeclampsia. Los niveles de mRNA de FATP1 y FATP4 en placenta son menores en la preeclampsia en comparación con los embarazos saludables, mientras que los niveles de CD36 y lipoproteín-lipasa permanecen sin cambios. Queda por establecer si los niveles de proteína y/o las actividades se ven afectados de manera similar (Gaccioli, 2016).

Por otra parte, hay investigaciones limitadas sobre los efectos de la obesidad materna en el transporte de nutrimentos de placenta. Solamente hay un estudio que examina el impacto de la obesidad en los transportadores de glucosa en la placenta humana. Este estudio no encontró diferencias en el mRNA de GLUT1 o la expresión de su proteína, pero reporto una disminución en el mRNA de GLUT4, sin afectar la expresión de su proteína. Sin embargo, el hecho de que no haya diferencias en el peso al nacer entre grupos de obesidad durante el embarazo y embarazo con peso normal, lo que plantea la posibilidad de que las diferencias pueden no estar presentes debido a los resultados fetales similares.

El impacto de la obesidad se ha explorado en el transporte de aminoácidos placentarios en seres humanos, y la disminución de la actividad y la expresión de SNAT4 se ha demostrado en las mujeres obesas en comparación con las mujeres delgadas, a pesar de ninguna diferencia en el peso al nacer, mientras tanto, SNAT1 y SNAT2 mantuvieron su expresión. Esto podría resultar en descendencia de peso similar en las mujeres obesas y con peso normal, pero con aumento de la adiposidad en los lactantes de las madres obesas.

A pesar de la falta de evidencias, hay algunas pruebas que sugieren un posible vínculo entre la obesidad materna, alteración del transporte de aminoácidos y el aumento del crecimiento fetal. Para entender mejor los mecanismos subyacentes que vinculan el ambiente uterino con el tamaño al nacer, se debería considerar la posibilidad de utilizar una definición más concisa del fenotipo asociado a obesidad como complicación durante el embarazo.

En contraste, hay muy poca información sobre el impacto de la obesidad materna y la expresión o actividad de las proteínas de transporte, pero existe evidencia de que la obesidad altera el transporte de ácidos grasos placentarios a través de cambios en los niveles de transportador y no de hidrólisis de TAGs. Un estudio de 2011 encontró que las placentas de las mujeres obesas-diabéticas mostraron un aumento en el mRNA de FABP4 y FABP5, y la expresión de la proteína FABP4, pero ningún cambio en FABP3 o FABPpm, en comparación con las mujeres obesas, no diabéticas o de peso normal. La evidencia más reciente sugiere que la susceptibilidad de la placenta a los factores maternos puede ser específica del sexo fetal, y puede ser importante explorar los resultados de una manera sexo-específica. En particular, se encontró que la tasa de captación de ácido oleico placentario fue 43% menor en descendencia masculina y 73% más alta en progenie femenina nacida de mujeres obesas, en comparación con mujeres con peso normal. Los cambios en los niveles de mRNA de la placenta también fueron dependientes del sexo fetal, con una menor expresión de FAT/CD36 y FABP5 entre la descendencia masculina de mujeres obesas, mientras que los niveles de expresión génica se mantuvieron sin cambios en las placentas femeninas, independientemente del IMC materno. Este estudio también encontró diferencias no detectables en la expresión génica placentaria de LPL, FATP4, FABP4 y FABPpm entre los grupos

Dada la escasez de trabajo en esta área y los resultados inconsistentes, no está claro si la obesidad está asociada con alteraciones específicas en el transporte de nutrientes placentarios y es evidente que se necesita más trabajo examinando las diferencias específicas de sexo (Brett, 2014).

En el ámbito específico de la metilación del DNA, la presencia anormal de estas marcas observada en la preeclampsia puede reflejar alteraciones en la regulación temporal normal de los patrones de expresión génica. Se ha informado que los micronutrientes, como el ácido fólico y la vitamina B12 son determinantes principales de los patrones de

metilación. En un estudio reciente, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ácido fólico entre los grupos, aunque los niveles de vitamina B12 fueron mayores en los grupos de preeclampsia. Se sabe que la deficiencia de estos micronutrientes aumenta las concentraciones de homocisteína. La homocisteína es un aminoácido que contiene azufre producido por la descomposición de la metionina. La homocisteína es remetilada a metionina, que es el precursor de la S-adenosilmetionina (SAM). El aumento de las concentraciones de homocisteína intracelular también aumentará la S-adenosilhomocisteína, que se une a las Dnmts con mayor afinidad que la SAM e inhibe la mayoría de las reacciones de metilación celular. Las asociaciones de homocisteína con patrones de metilación global no están bien establecidas.

Recientemente, se han estudiado los niveles alterados de factores angiogénicos en mujeres con preeclampsia, y se propone que pueden deberse a patrones de metilación específicos de genes alterados. La identificación de la metilación específica de genes puede proporcionar información valiosa sobre las vías susceptibles de ser reguladas epigenéticamente. La comprensión de estos mecanismos puede ayudar en la comprensión de las vías asociadas con los resultados adversos del embarazo (Kulkarni, 2011).

La preeclampsia también está asociada con la función reducida de la 11-b-hidroxiesteroide-deshidrogenasa-2 (11bHSD-2), una enzima que cataliza la conversión del cortisol circulante materno en cortisona inactiva. Por lo tanto, en la preeclampsia, el feto puede estar sobreexpuesto a los glucocorticoides circulantes maternos. Todas estas influencias tienen el potencial de “programar” la estructura y función de órganos, y los sistemas fisiológicos de retroalimentación, especialmente el sistema hipotálamo-hipófisis-adrenocorticoide (Tuovinen, 2010).

En el caso de la metilación anormal de DNA en la obesidad durante el embarazo, los mecanismos por los cuales los desafíos nutricionales la causan aún no se encuentran bien estudiados. Posibles alteraciones de la metilación pueden surgir durante el desarrollo fetal debido a la falta de disponibilidad de los donantes de metilo en la dieta de la mujer obesa. Las interacciones entre el medio ambiente y los mecanismos epigenéticos para mediar la expresión de genes podrían asociarse con el aumento del IMC y adiposidad, como en los siguientes ejemplos: el locus FTO (enzima DNA-desmetilasa), el gen MC4R (reduce su metilación tras una exposición a largo plazo a una



dieta rica en grasas), la proteína PPAR $\gamma$  (interactúa con las histonas acetiltransferasas durante la adipogénesis) y el efecto de la dieta sobre la metilación de POMC y leptina (Herrera, 2011).

Adicionalmente, se han reportado varios modelos animales de sobrenutrición durante el embarazo. Alimentar a las ratas con una dieta rica en grasas saturadas durante el embarazo produce hijos con resistencia a la insulina, metabolismo anormal del colesterol y aumento de la presión arterial en adultos. También se ha demostrado que la alimentación de una dieta obesogénica a ratas antes del apareamiento y a través de la lactancia conduce a obesidad materna, hiperfagia, aumento de la adiposidad, disminución de la masa muscular, reducción de la actividad locomotora y aceleración de la pubertad en los hijos. Los descendientes de ratas embarazadas alimentadas con una dieta de comida chatarra durante el embarazo y la lactancia presentaron mayor presión arterial, mayor adiposidad y resistencia a la insulina en comparación con la descendencia de control. También hubo alteraciones persistentes en la expresión de PPAR $\gamma$ , 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I y los adrenorreceptores  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 en el tejido adiposo de la descendencia, lo que puede conducir a un aumento de la adipogénesis y disminuir la lipólisis (Lillycrop, 2011).

Varios estudios han demostrado la participación de ROS en la reacción de metilación del DNA en condiciones fisiológicas y patológicas. De hecho, la sobreproducción de ROS podría afectar a los mecanismos epigenéticos. Los aniones superóxido participan en este proceso como agentes nucleofílicos ya que desprotonan la molécula de citosina en la posición C-5, acelerando con ello la reacción del DNA con el intermedio cargado de forma positiva, SAM. El aumento de los aniones superóxido también conduce a la hipermetilación global del DNA y estimula la expresión de Dnmt1 después del bloqueo del anclaje de melanocitos. Por otra parte, la hipermetilación de DNA de un solo sitio CpG, cercano al sitio de inicio de la transcripción, se asocia con estrés oxidativo en individuos adultos nacidos prematuros (Yara, 2015). También se ha estudiado el impacto de la hipoxia en la metilación del DNA, encontrando que, en tumores de ratones y humanos, la hipoxia contribuye a la hipermetilación del DNA, reduciendo la actividad de la enzima TET (Thienpont, 2016).

Aunque apenas han empezado a estudiar los papeles y las interacciones de la metilación anormal del DNA en relación con la inflamación y la inmunidad, la evidencia sugiere que

la inflamación puede causar la metilación aberrante del DNA. Se ha informado que la inflamación crónica es un factor asociado con el aumento de la metilación del DNA tanto en la gastritis crónica como en el cáncer gástrico. Otro estudio importante demostró que la citocina inflamatoria IL-6 podría ejercer un impacto epigenético en las células a través de la regulación de un gen de Dnmt. Aún no se puede excluir que la hipermetilación del DNA pueda inducir una respuesta inflamatoria. De hecho, ya que los inhibidores de la señalización de citocinas (SOCS) se inactivan por hipermetilación, podría especularse que la metilación aberrante del DNA, a través de la inhibición de SOCS, contribuye a la señalización exagerada de citocinas. Por lo tanto, la inflamación persistente puede causar la metilación aberrante del DNA, que a través de una inhibición de SOCS exagera aún más la señalización de IL-6, perpetuando un círculo vicioso (Stenvinkel, 2007).

Está claro que la placenta no es simplemente un participante pasivo en el embarazo, suministrando sustratos maternos al feto. Más bien, se adapta al medio materno y cambia tanto su estructura como su función, con el resultado neto de un cambio en el suministro de sustrato al feto y en el ambiente hormonal experimentado por este. La placenta asume un papel activo en la programación de la experiencia fetal en el útero que conduce a la enfermedad en la vida adulta (Myatt, 2006).

Un estudio de Nomura, et. al. (2014) examinó si la diabetes gestacional, la preeclampsia y la obesidad durante el embarazo tienen un efecto sobre los niveles de metilación global en el tejido placentario y la sangre del cordón umbilical. Los datos obtenidos proporcionan pruebas sugestivas de que diferentes condiciones de riesgo materno durante el embarazo (es decir, diabetes gestacional, preeclampsia y obesidad) se asociaron independientemente con los niveles de metilación global en el tejido placentario (bajos para diabetes gestacional y preeclampsia, y altos para obesidad durante el embarazo, comparados con un grupo control) y las asociaciones observadas eran específicas de tejido. Estos hallazgos revelan un potencial mecanismo biológico a través del cual tres complicaciones del embarazo pueden influir en el epigenoma en los tejidos placentarios y, por lo tanto, afectar la programación fetal del desarrollo.

Este estudio permitió evaluar la utilidad de la sangre periférica como tejido sustituto de la placenta, que tiene su propia función como órgano de intercambio para todos los gases respiratorios, nutrientes y residuos entre el feto y la mujer embarazada. Sin embargo, solamente se asoció significativamente la metilación global en el tejido placentario, pero

no en la sangre del cordón umbilical, con cualquiera de las tres condiciones de riesgo maternas durante el embarazo (Nomura, 2014).

De los 213 sitios CpG con metilación diferencial significativa identificados (causada por los mecanismos anteriormente propuestos), se identificaron ciertas características biológicas, como su localización, función génica asociada y procesos biológicos en los que participan.

En el caso de la distribución en islas CpG, se observa que la mayoría de sitios CpG no se encuentran en ellas, seguidos por los que se encuentran en el cuerpo de la isla, y, con menor frecuencia, los que se encuentran en regiones flanqueantes al cuerpo (shelves y shores).

Para la ubicación de los sitios CpG en regiones génicas, se encontró que algunos de ellos compartían regiones, sin embargo, la mayor frecuencia fue en el cuerpo del gen, seguido por las regiones promotoras (TSS, 5'UTR y 1er Exón).

La comprensión de los papeles de la metilación del DNA en regiones específicas es esencial para la comprensión de los procesos biológicos.

Recientemente se propuso definir las shelves y shores de las islas CpG. La mayoría de los cambios de metilación ocurren a corta distancia de las islas CpG, también denominadas "shores", en lugar de en las islas mismas. La metilación también puede ocurrir en regiones aún más distantes del cuerpo de la isla CpG, conocidas como "shelves" (Ma, 2013). Como se había mencionado anteriormente, la metilación de estas regiones flanqueantes al cuerpo de la isla, también se relacionan con la expresión génica reducida.

La mayoría de las islas CpG permanecen no metiladas en las células somáticas, cuando los genes con islas CpG en su TSS se encuentran activos. En contraste, algunos genes reprimidos tienen islas CpG metiladas en su región promotora. Las islas CpG metiladas en regiones promotoras están usualmente restringidas a genes en los que hay estabilización a largo plazo de estados reprimidos. Los ejemplos incluyen genes con impronta, genes localizados en el cromosoma X inactivo y genes que se expresan exclusivamente en células germinales y que, presumiblemente, sería inadecuado para la expresión en células somáticas.

Existen fluctuaciones sustanciales en los niveles de metilación del promotor de los genes que son pobres en islas CpG en la región TSS, por lo tanto, aún no se conoce papel de la metilación en el control de los TSSs que son pobres o no contienen islas CpG.

Adicionalmente, se ha propuesto que el estado de no metilación de las islas CpG en regiones promotoras contribuye a una arquitectura de la cromatina transcripcionalmente permisiva (Blackledge, 2011). Estudios en individuos con cáncer muestran que un estado de metilación alterado en islas CpG de regiones promotoras recluta enzimas que pueden remodelar los nucleosomas, por tanto, la cromatina (Ballestar, 2002). El hecho de que la mayoría de los sitios CpG con metilación diferencial significativa no se encuentren asociados con islas CpG sugiere que los cambios que se están observando en los niveles de metilación son más específicos y limitados a esta clase de marca epigenética, en regiones particulares de genes que solamente permiten la modulación de la expresión génica, y no a la asociación que tiene la metilación del DNA con las demás marcas epigenéticas en regiones promotoras, y otros mecanismos biológicos asociados.

La mayoría de los cuerpos génicos son pobres en sitios CpG, están ampliamente metilados y contienen múltiples elementos repetitivos y transponibles. La metilación de los sitios CpG en los exones génicos es una de las principales causas de las mutaciones de transición de citosina a timina, lo que conduce a mutaciones causantes de enfermedades en la línea germinal y mutaciones causantes de cáncer en células somáticas. Es importante mencionar que las islas CpG también existen dentro de los cuerpos génicos. Aunque sus funciones aquí permanecen desconocidas, se ha propuesto que estas regiones pueden representar “promotores huérfanos”, que podrían utilizarse en etapas tempranas de desarrollo y que han escapado a la metilación en la línea germinal, de modo que se mantenga su alta densidad de CpG. También se piensa que esta metilación es principalmente un mecanismo para silenciar elementos repetitivos de DNA, tales como retrovirus, elementos LINE1, elementos Alu, entre otros.

La metilación del cuerpo génico no está asociada con la represión. De forma contraria, se han confirmado amplias correlaciones positivas entre la transcripción activa y la metilación del cuerpo génico

Estudios recientes demuestran que puede haber funciones alternativas para la metilación del DNA en los cuerpos génicos. Los exones se encuentran más metilados que los

intrones, y las transiciones en el grado de metilación se producen en los límites exón-intrón, lo que sugiere un posible papel de la metilación en la regulación de splicing. Estas observaciones proponen una función previamente desconocida para la metilación del DNA a nivel transcripcional dando como resultado un splicing alternativo. A pesar de que las islas CpG del cuerpo génico pueden llegar a estar extensivamente metiladas, no bloquea la elongación de la transcripción.

Esto conduce a una paradoja aparente en la que la metilación en el promotor está inversamente correlacionada con la expresión, mientras que la metilación en el cuerpo del gen está positivamente correlacionada con la expresión. Así, en los mamíferos, es la iniciación de la transcripción pero no la elongación de la transcripción que parece ser sensible al silenciamiento a causa de la metilación del DNA. Por lo tanto, no es simplemente la presencia de una marca de 5mC misma que rige su relación con la transcripción, sino más bien la interpretación de la marca en un contexto genómico y celular particular (Jones, 2012).

Acerca de los 10 genes asociados con los sitios CpG que tuvieron una ganancia en la metilación diferencial significativa es importante saber si estos han sido estudiados en contexto de metilación, pues la regulación de su expresión podría estar implicada en ciertos procesos, vías de señalización y/o patologías.

La revisión de estos arrojó la siguiente información:

- PSORS1C1: implicado en el riesgo de esclerosis sistémica (Broen, 2014; Allamore, 2011).
- MAD1L1: la hipermetilación de la región promotora de este gen, y su silenciamiento, resulta en desregulación del ciclo celular, por lo que está implicado en cáncer ovárico avanzado (Jansen, 2006).
- NAT14: N-acetiltransferasa que presenta co-regulación con complejos de acetilación de histonas (Putiri, 2014).
- CLDN4: una baja en su expresión reduce la capacidad de invasión del trofoblasto, posiblemente alterando las metaloproteínas de la matriz (Hu, 2015).

- SPTB: un estado hipometilado y de alta expresión y actividad se relaciona con la expresión de proteínas de membrana durante el desarrollo y diferenciación eritroide en humanos (Remus, 2005).
- PROM2: su estado hipometilado se relaciona con adenocarcinoma de pulmón (Rohan, 2006)
- OCA2: involucrado en la melanogénesis. Una expresión no adecuada se relaciona con el síndrome de Angelman (Cassidy, 2010) y el Síndrome de Prader Willy (Henkhaus, 2012).
- ODF3L1: variantes en metilación de sus promotores relacionadas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Morrow, 2016).
- TMCO4: cambios en la metilación relacionados con tumorigénesis mamaria (Mitchell, 2012).
- SFXN1: se estudió su posible estado ambiguo de metilación en células cancerosas, pero no se encontraron diferencias con células no cancerosas (Rodríguez, 2008).

De estos genes, destaca la función de CLDN4, ya que, como se mencionó antes, una invasión trofoblástica alterada es parte de la fisiopatología de la preeclampsia. Esto hace evidente la necesidad de más estudios para identificar la posible relación del gen con la preeclampsia.

Respecto a los 10 genes asociados con los sitios CpG que tuvieron una pérdida en la metilación diferencial significativa, la revisión de estos genes en el contexto de metilación del DNA mostró la siguiente información:

- MAML3: metilación relacionada con la activación de la vía NOTCH en carcinomas de células escamosas (Sun, 2014).
- PIAS4: regulación de transcripción proinflamatoria en hepatocitos (Sun, 2013).
- HLA-DQA2: cambios en la metilación resaltan la consecuencia de la interrupción de un aislante dentro de la región MHC-II y puede ser un mecanismo de desarrollo normal o uno utilizado por las células tumorales para escapar de la vigilancia inmunológica (Majumder, 2011).

- CDSN: expresión relacionada con la susceptibilidad a psoriasis (Clop, 2013).
- INTS1: metilación de promotores relacionada con neoplasia cervical (Brebi, 2014).
- GSTM1: metilación asociada con leucemia mieloide aguda (Ohgami, 2012).
- PSD4: metilación asociada con cáncer hepático (Udali, 2015).
- LHFP: inhibición de la expresión por hipermetilación en cáncer de próstata (Yu, 2004).
- UBR3: su expresión anormal puede afectar la regulación de la proteína de reparación de DNA, APE1, así como la estabilidad del genoma (Meisenberg, 2011).
- LGALS8: metilación asociada con leucemia linfoblástica aguda (Nordlund, 2012).

La revisión de los genes asociados con sitios CpG con metilación diferencial significativa que comparten localización en regiones promotoras (menos CDSN, porque ya se explicó en los genes relacionados con sitios CpG que tuvieron ganancia de metilación) en el contexto de metilación del DNA mostró la siguiente información:

- ASTN1: metilación en región promotora relacionada con carcinomas anogenitales (Dürst, 2016).
- PLEKHG6: patrones de metilación relacionados con diferenciación y maduración de células dendríticas (Zhang, 2014).
- HIVEP3: relacionado con la penetrancia del VIH en poblaciones humanas (Heyn, 2013).
- SH3BP5: regula la actividad de BTK y se relaciona con la señalización citoplasmática de células B (UniProt, 2017).

De acuerdo a las vías de señalización en las que participan una mayor cantidad de los genes relacionados con los sitios CpG con metilación diferencial significativa, en la primera de ellas, Diabetes mellitus, los genes relacionados fueron:

- Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, C(HLA-C):
- Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP alpha 1(HLA-DPA1):

- Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DQ alpha (HLA-DQA2)
- Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo N2(PTPRN2)

Respecto a los hallazgos en el área de la epigenética para esta enfermedad, la desregulación de las modificaciones epigenéticas de las histonas en la cromatina, incluyendo la metilación de lisina, han sido implicadas en la regulación genética aberrante asociada con la patología de la diabetes y sus complicaciones. Los estudios de genoma completo han demostrado cambios específicos en el tipo de células y en los patrones de metilación de las histonas, en condiciones diabéticas. Además, los estudios en células vasculares han demostrado cambios duraderos en las modificaciones epigenéticas en los promotores de genes inflamatorios clave después de la exposición a condiciones diabéticas, lo que sugiere un posible mecanismo para la memoria metabólica. Estudios recientes han demostrado papeles para la metilación de las histonas, metilación del DNA, así como microRNAs en la nefropatía diabética (Villeneuve, 2011).

En la segunda vía, moléculas de adhesión celular (CAMs), aparte de encontrar HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DQA2, también se encontró claudina 4 (CLDN4). Los estudios epigenéticos de los genes implicados en las vías de CAMs son, en su mayoría, relacionados con cáncer. Se ha demostrado que la complejidad de la carcinogénesis ya no puede explicarse únicamente en cambios genéticos, sino de alteraciones epigenómicas. Todas las alteraciones de adhesión celular que se han observado en el cáncer hasta el momento pueden ser causadas por mutaciones genéticas o alteraciones del epigenoma. Tales alteraciones epigenéticas pueden causar cambios permanentes en los patrones de expresión génica y, por lo tanto, pueden contribuir esencialmente a algunas de las características fenotípicas conocidas de las células cancerosas, como la pérdida del control del crecimiento, la comunicación intercelular alterada y la motilidad. Los dos últimos pueden asociarse esencialmente con la regulación negativa de las moléculas de adhesión celular, lo que puede ser relevante en el contexto de la invasividad y el pronóstico del cáncer (Katto, 2011).

En la vía de señalización de fagosoma, se encontraron implicados los genes de trombospondina 2 (THBS2), así como HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DQA2. En relación con esta vía, se han encontrado estudios de patoepigenética de las enfermedades infecciosas, ya que el fagosoma juega un papel importante en la respuesta inmune ante



estas. Estudios recientes revelaron que además de los virus, las bacterias patógenas también son capaces de desregular la maquinaria epigenética de sus células diana. La mayoría de las bacterias que infectan humanos son intracelulares obligadas o facultativas, que producen toxinas bacterianas y proteínas de superficie dirigidas a la membrana de la célula huésped o sintetizan las proteínas efectoras que entran en el núcleo de la célula huésped. Estos productos bacterianos típicamente provocan modificaciones de histonas. Los patógenos bacterianos son capaces de inducir alteraciones de los patrones de metilación del DNA de la célula huésped. Dichos cambios en el epigenotipo de la célula huésped y en el patrón de expresión génica pueden obstaculizar la respuesta inmune antibacteriana y crear condiciones favorables para la colonización bacteriana, el crecimiento o la propagación. La desregulación epigenética mediada por productos bacterianos también puede facilitar la producción de citocinas inflamatorias y otros mediadores inflamatorios que afectan al epigenotipo de sus células diana (Niller, 2015).

En la vía de señalización de procesamiento y presentación de antígeno, se encontraron los genes de HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DQA2. Las moléculas de MHC-I y MHC-II juegan un papel esencial en la respuesta inmune adaptativa en virtud de su capacidad para presentar péptidos, respectivamente, a células T CD8+ y CD4+. La presentación de péptidos derivados de patógenos en el contexto de moléculas de MHC-II por parte de células presentadoras de antígeno (CPA) a células T CD4+ del sistema inmune es central para el inicio de una respuesta inmune adecuada a patógenos. En particular, las células dendríticas son CPA altamente especializadas que son capaces de activar células T. Dado su papel central en la inmunidad adaptativa, los genes MHC-I y MHC-II se regulan de forma apretada a nivel transcripcional para satisfacer los requerimientos locales de una respuesta inmune específica de antígeno eficaz. Actualmente, se están estudiando los factores de transcripción que interactúan con los promotores y los mecanismos epigenéticos que modulan el tipo de célula específica de la regulación de MHC-I y MHC-II (van den Elsen, 2011).

Por último, en la vía de síntesis y secreción de aldosterona (hormona esteroidea), se encontraron relacionados los genes GNAS complex locus (GNAS), protein-cinasa dependiente de calcio/calmodulina 1D (CAMK1D) y la fosfolipasa C beta 3(PLCB3). Las hormonas esteroideas participan en el desarrollo de los órganos, la reproducción, la

homeostasis corporal y las respuestas al estrés. La maquinaria esteroidea se expresa de una manera específica para el desarrollo y el tejido, con la expresión de estos factores siendo estrictamente regulada por una serie de factores de transcripción. La evidencia de que existe regulación epigenética de las enzimas esteroideogénicas claves está aumentando, aunque no parece ser una vía reguladora predominante. Las hormonas esteroideas ejercen su acción en los tejidos diana a través de receptores nucleares esteroideos pertenecientes a las familias NR3A y NR3C. Los niveles de expresión de los receptores nucleares y las modificaciones postraduccionales regulan su función y dictan su sensibilidad a los ligandos esteroideos. Es más probable que los receptores nucleares y los factores de transcripción estén regulados epigenéticamente que las proteínas implicadas en la esteroideogénesis y tengan un impacto secundario en la expresión de estas enzimas esteroideogénicas. Existen estudios que reportan la relación de la regulación epigenética de receptores de mineralocorticoides en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, y en la expresión de células de Leydig, responsables del desarrollo primario de los órganos sexuales, en la etapa fetal (Martínez-Arguelles, 2010).

En referencia a las patologías en las que participan una mayor cantidad de los genes relacionados con los sitios CpG con metilación diferencial significativa, específicamente diabetes mellitus, se mencionaron anteriormente los avances implicados en esta patología y en el campo de la epigenética.

Hay evidencia de contribuciones epigenéticas a la hipertensión. Por ejemplo, se sabe que la metilación del DNA en las islas CpG y las vías de acetilación de las histonas limitan el desarrollo de la nefrona, predisponiendo así la hipertensión asociada con la exposición a una dieta con alto contenido de sal. El estrés mental induce la feniletanolamina n-metiltransferasa, que puede actuar como una Dnmt, e imitar los efectos silenciadores, vinculando la proteína-2 en el gen transportador de norepinefrina, que a su vez, puede exagerar la respuesta autonómica. Se sabe que un disruptor de silenciamiento telomérico, Dot1, modula la expresión de un gen del factor de crecimiento del tejido conectivo asociado con la remodelación de los vasos sanguíneos, lo que podría alterar el sistema vascular. Dot1a también interactúa con el gen Af9 para producir alta permeabilidad al canal de sodio y silencia el gen de la hidroxisteroide deshidrogenasa-11 $\beta$ 2, evitando así el metabolismo del cortisol a la cortisona y los receptores de aldosterona (Millis, 2010).

Respecto al asma, se sabe que es causado por factores hereditarios y ambientales. Es claro que los estudios genéticos no explican adecuadamente la heredabilidad y la susceptibilidad al asma. En el contexto de la epigenética, las modificaciones no heredables del DNA pueden ayudar a explicar el componente hereditario del asma. Además, las marcas epigenéticas son influenciadas por el medio ambiente, incluyendo la contaminación y el tabaquismo, que son factores de riesgo de asma. Estos cambios epigenéticos inducidos por el desencadenante ambiental pueden estar implicados en la distorsión del sistema inmune hacia un fenotipo Th2, después de la exposición in utero y aumentando así el riesgo de asma. Alternativamente, se pueden modular directa o indirectamente los procesos inmunológicos e inflamatorios en asmáticos a través de los efectos sobre la capacidad de respuesta al tratamiento. Por lo tanto, el estudio de la epigenética puede desempeñar un papel importante en la comprensión y tratamiento posible del asma y otras enfermedades alérgicas (Durham, 2011).

Estudios anteriores han implicado influencias epigenéticas en la etiología y patogénesis del lupus eritematoso sistémico (LES). Se ha discutido la contribución de los cambios en la metilación del DNA a la patogénesis del lupus. Estos incluyen el papel del DNA apoptótico, la radiación ultravioleta, los retrovirus endógenos, las contribuciones dietéticas y el envejecimiento. Parece que la hipometilación de genes específicos sobreexpresados en células T durante el LES, como ITGAL, CD40LG, TNFSF7, KIR2DL4 y PRF1 (perforina), y CD5 en células B parecen desempeñar un papel importante. Además, las modificaciones de las histonas, como el aumento de la acetilación global de H4 en los monocitos, están altamente asociados con el LES. Los ncRNA, especialmente miR-21, miR-148a y miR-126, controlan otros elementos de la regulación epigenética. Por todo esto, terapias epigenéticas para el LES pueden ser viables en el futuro, particularmente si están diseñadas para dirigirse a regiones específicas dentro del genoma (Jeffries, 2011).

La psoriasis es un trastorno cutáneo crónico que afecta a aproximadamente el 2% de la población. Se cree que la psoriasis es una enfermedad autoinmune órgano-específica desencadenada por un sistema inmunológico celular activo. La proliferación intensa y la diferenciación anormal de los queratinocitos son rasgos característicos de la enfermedad y se han identificado papeles clave para las células T, las células dendríticas y las citocinas inflamatorias en la patogénesis de la psoriasis. La patología de la psoriasis es

compleja, involucrando tanto componentes genéticos como ambientales. La evidencia de estudios familiares sugiere una predisposición genética a la enfermedad; sin embargo, el patrón de herencia exacta es desconocido. A la luz de estos hallazgos, se sugirió que los factores epigenéticos desempeñan un papel en la patogénesis de la psoriasis, ya que los desencadenantes ambientales están comprometidos en el curso de la psoriasis. Los factores que influyen en el curso de la psoriasis incluyen trauma, infecciones, estrés, drogas, el consumo de tabaco y el alcohol, aunque todavía se desconoce cómo estos factores individuales funcionan e interactúan en sujetos de estudio con psoriasis. Los genes sensibles a la metilación implicados en la patogénesis del lupus se expresan aberrantemente en sujetos de estudio con psoriasis. La expresión de perforina, por ejemplo, se incrementó en la epidermis de lesiones psoriásicas. Otro gen sensible a la metilación sobreexpresado tanto en lupus como en psoriasis fue LFA-1, que se ha utilizado como diana para terapia biológica en la psoriasis (Zhang, 2011).

En los dos análisis ontológicos se pueden observar tres divisiones fenotípicas, que aplican tanto para las vías de señalización, como para las patologías en las que están implicados los genes: metabólica, hipertensiva y relacionada con el sistema inmune. Estas tres divisiones coinciden con reportes previos que detallan los efectos a largo plazo de la exposición a complicaciones durante la gestación, como el estudio de Thomsen, et. al. (2015) en una cohorte noruega expuesta a preeclampsia (fenotipo: niños pequeños para la edad gestacional, hipertensión crónica, diabetes mellitus tipo 2, etc.) y el estudio de Wu, et. al. (2009) en una cohorte de Dinamarca (los niños nacidos a término que fueron expuestos a la preeclampsia tenían un mayor riesgo de una variedad de enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, así como enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos). Por otra parte, un reporte del IOM y el National Research Council de Estados Unidos, menciona que la obesidad en el embarazo predispone a los nacidos a obesidad infantil, y otras patologías no relacionadas con la ganancia de peso, como modificaciones en el desarrollo neurológico, alergias/asma y cáncer (Rasmussen, 2009).

Las limitaciones que presenta este proyecto, aun considerando que es un estudio piloto, son principalmente el tamaño de la población, y las pocas muestras que conforman a cada grupo, lo que convierte a cada uno en no representativo de su condición. Adicionalmente, la información disponible para los criterios de evaluación del perfil clínico

no consideraba algunas características durante el embarazo, complicando así la clasificación de muestras en sus respectivos grupos, y el seguimiento de la evolución del embarazo, para evaluar criterios relacionados con la preeclampsia y obesidad en el embarazo, o que pudieran estar afectando de forma independiente. Sumado a esto, se debe considerar el hecho de que las edades de los individuos nacidos son diferentes, por lo que es posible que ciertas variaciones en el perfil de metilación pueden deberse a factores propios de la vida posnatal y no de las condiciones durante el embarazo. Por último, es importante considerar que la expresión de un gen no depende solamente del estado de metilación de sitios CpG en regiones específicas, sino que es algo más complejo, y en lo que también pueden estar influyendo las demás marcas epigenéticas, mutaciones, regulación por parte de otros genes, entre otros mecanismos.

# 13.

## Conclusiones

Se logró establecer un perfil clínico clasificatorio utilizando criterios cuantitativos y cualitativos de evaluación durante el embarazo y del niño menor de tres años, para embarazos normoevolutivos y embarazos que cursaron con preeclampsia y obesidad, siendo los criterios cuantitativos de evaluación durante el embarazo los mejores indicadores clasificatorios.

Adicionalmente, se encontraron diferencias en el perfil de metilación de DNA en células de sangre periférica de niños menores de tres años que fueron expuestos a preeclampsia y obesidad durante el embarazo, comparados con un grupo control de embarazo normoevolutivo. Las diferencias encontradas se relacionan específicamente con la metilación de regiones génicas no asociadas a islas CpG. De igual forma, estas diferencias se encuentran implicadas en vías de señalización y patologías metabólicas, hipertensivas y relacionadas con el sistema inmune, sugiriendo que la programación prenatal al ambiente que fueron expuestos da un fenotipo característico; sin embargo, se deben realizar estudios posteriores para confirmar estos hallazgos.

Por último, se propone que la preeclampsia y la obesidad durante el embarazo actúan como ambientes adversos para el desarrollo embrionario y fetal, ejerciendo modificaciones en la metilación del DNA. La metilación anormal del DNA se encuentra mediada por las alteraciones sistémicas en ambas complicaciones, como la cantidad, calidad y distribución de nutrimentos, estrés oxidativo, hipoxia y ambiente inflamatorio.

**14.**

Perspectivas



Es necesario incrementar el tamaño de la población de estudio, tanto en grupos expuesto a complicaciones durante el embarazo, como en embarazos normoevolutivos, así como evaluar las complicaciones en grupos por separado, para obtener resultados significativos, y propios de cada una.

Aumentar el tamaño de la población ayudaría a validar los criterios de clasificación. Para lograr una mejor evaluación de los grupos, es necesario aumentar también los criterios durante el embarazo, y del niño, e igualmente considerar características del padre. De igual forma, se debe considerar la cuantificación y análisis de marcadores biológicos propios de la fisiopatología de cada una de las complicaciones del embarazo evaluadas.

Respecto a la muestra, es importante considerar evaluar a los individuos en el mismo periodo de edad, para disminuir la influencia de factores propios de la alimentación y el desarrollo en el perfil de metilación del DNA, así como considerar la evaluación de otros tejidos, principalmente la placenta.

Adicionalmente, deben realizarse estudios en los genes relacionados con sitios CpG que tuvieron metilación diferencial significativa, para evaluar y confirmar que tienen diferencias de metilación en regiones génicas específicas; así como estudios complementarios de expresión.

Otro factor a considerar, e importante objetivo para estudiar posteriormente, es la influencia de la etapa posnatal temprana, en específico, en el perfil de metilación del DNA, pues la gran mayoría de estudios se han enfocado en las condiciones de exposición durante la gestación, y no se sabe con certeza cómo los dos años después del nacimiento influyen o modifican las marcas de metilación, y el establecimiento de los fenotipos de predisposición.

Para esto, es fundamental dar un seguimiento detallado al crecimiento y desarrollo de los niños, identificando posibles modificaciones antropométricas, metabólicas, y marcadores adicionales, que tengan sentido con los hallazgos encontrados en el perfil de metilación, de tal forma que se pueda considerar como un importante marcador molecular de establecimiento de fenotipos específicos y/o predisposición a enfermedades complejas, útil para el desarrollo de políticas públicas relacionadas con el desarrollo óptimo de los individuos durante las etapas prenatal y posnatal temprana.

# Referencias

1. ABCAM. (2017). Overview Scheme of Bisulfite Conversion. Recuperado el 10 de Enero de 2017. Disponible en: <http://a.static-abcam.com/CmsMedia/Media/overview-scheme-of-bisulfite-conversion.jpg>
2. Aguilar Palafox M. I. y Fernández Ortega M. A. (2007). Lactancia materna exclusiva. Departamento de Medicina Familiar, Facultad de Medicina, UNAM. Vol. 50, No. 004.
3. Allanore Y., Saad M., Dieudé P., Avouac J., Distler J., Amouyel P. et. al. (2011). Genome-Wide Scan Identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as Novel Risk Loci for Systemic Sclerosis. *Plos Genetics*; 7(7), e1002091. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002091>.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). (2002). Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Practice Bulletin No. 33.
5. Antonov, A. N. (1947). Children born during the siege of Leningrad in 1942. *J Pediatr*; 30: 250-9.
6. Arroyo Cabrales L. M., Canseco Herrera M., Castillo Romero M. G. y Belmont Gómez A. (2012) Madres adictas: determinación de niveles de drogas y evaluación del crecimiento y desarrollo de sus hijos en los primeros seis meses. *Perinatol Reprod Hum*; 26 (3): 180-186.
7. Arteaga Martínez, S. y García Peláez, M. (2013). Embriología humana y biología del desarrollo. México: Médica Panamericana. 570 p.
8. Backes C., Markham K., Moorehead P., Cordero L., Nankervis C. y Giannone P. (2011). Maternal Preeclampsia and Neonatal Outcomes. *Journal Of Pregnancy*; 2011, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/214365>.
9. Ballestar E. (2002). The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis*, 23(7), 1103-1109. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/23.7.1103>.
10. Bannister, A. y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*; 21(3), 381-395. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
11. Barker, D. (1997). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition*, 13(9), 807-813. [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(97\)00193-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(97)00193-7).
12. Barker, D. (2001). The malnourished baby and infant. *British Medical Bulletin*, 60(1), 69-88. <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/60.1.69>.
13. Barnes M., Heaton T., Goates M. y Packer J. (2016). Intersystem Implications of the Developmental Origins of Health and Disease: Advancing Health Promotion

- in the 21st Century. *Healthcare*, 4(3), 45. <http://dx.doi.org/10.3390/healthcare4030045>.
14. Bautista-Castaño I., Henriquez-Sanchez P., Alemán-Perez N., Garcia-Salvador J., Gonzalez-Quesada A., García-Hernández J. y Serra-Majem L. (2013). Maternal Obesity in Early Pregnancy and Risk of Adverse Outcomes. *Plos ONE*; 8(11), e80410. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080410>.
  15. Bedregal P., Shand B., Santos M. J., y Ventura-Juncá P. (2010). Aportes de la epigenética en la comprensión del desarrollo del ser humano. *Revista médica de Chile*; 138(3), 366-372.
  16. Bernal Díaz, E. (2012). Embarazo adolescente. Complicaciones y factores de riesgo: Centro de Salud Barrio México. Enero-junio 2011. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México.
  17. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. et al. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288-295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>.
  18. Blackledge, N. y Klose, R. (2011). CpG island chromatin: A platform for gene regulation. *Epigenetics*, 6(2), 147-152. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.2.13640>.
  19. Brady M, Winikoff B (eds). (1992). Rethinking postpartum health care. Proceeding of a seminar presented under the Population Council's Robert H. Ebert Program on Critical Issues in Reproductive Health and Population. The Population Council, N.Y. pp. 5-7.
  20. Brebi P., Maldonado L., Noordhuis M., Ili C., Leal P., Garcia P. et. al. (2013). Genome-wide methylation profiling reveals Zinc finger protein 516 (ZNF516) and FK-506-binding protein 6 (FKBP6) promoters frequently methylated in cervical neoplasia, associated with HPV status and ethnicity in a Chilean population. *Epigenetics*; 9(2), 308-317. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.27120>.
  21. Brett K., Ferraro Z., Yockell-Lelievre J., Gruslin A. y Adamo K. (2014). Maternal-Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *International Journal Of Molecular Sciences*; 15(9), 16153-16185. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150916153>.
  22. Broen J., Radstake T. y Rossato M. (2014). The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nature Reviews Rheumatology*; 10(11), 671-681. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.128>.
  23. Brosens I., Robertson W. y Dixon H. (1967). The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *The Journal Of Pathology And Bacteriology*; 93(2), 569-579. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1700930218>.

24. Brosens J., Parker M., McIndoe A., Pijnenborg R. y Brosens I. (2009). A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*; 200(6), 615.e1-615.e6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.11.037>.
25. Brown KH. Breastfeeding and complementary feeding of children up to 2 years of age. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*; 2007; 60: 1-10.
26. Brown, J., León Jiménez, G., e Isaacs, J. (2014). *Nutrición en las diferentes etapas de la vida (5a ed.)*. México, Ciudad de México: McGraw-Hill Interamericana. 633 p.
27. Burton G. y Jauniaux E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*; 25(3), 287-299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>.
28. Burton G., Yung H., Cindrova-Davies T. y Charnock-Jones, D. (2009). Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. *Placenta*; 30, 43-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.003>.
29. Butte, N. F. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: Normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*; 71:1256S-61S.
30. Calvo Botella H. (2004). *Maternidad, infancia y drogas: implicaciones clínicas*. Adicciones, Vol.16 Núm. 4. 20 p.
31. Canavan T. y Deter R. (2014). The effect of maternal body mass index on fetal growth: Use of individualized growth assessment and two-level linear modeling. *Journal Of Clinical Ultrasound*; 42(8), 456-464. <http://dx.doi.org/10.1002/jcu.22158>.
32. Carlson, B. y Kantaputra, P. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. Barcelona: Elsevier España. 521 p.
33. Cassidy Suzzane B y Allanson Judith E. (2010). *Management of Genetic Syndromes*. (3a ed). Editorial Willey-Blackwell. Nueva Jersey, Estados Unidos.
34. Chaiworapongsa T., Chaemsaitong P., Yeo L., y Romero R. (2014). Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology*; 10(8), 466-480. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2014.102>
35. Chalkiadaki A. y Guarente L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nature Reviews Endocrinology*; 8(5), 287-296. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.225>.
36. Challier J., Basu S., Bintein T., Minium J., Hotmire K., Catalano P. y Hauguel-de Mouzon S. (2008). Obesity in Pregnancy Stimulates Macrophage Accumulation

- and Inflammation in the Placenta. *Placenta*; 29(3), 274-281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2007.12.010>.
37. Cheung L., Gustavsson C., Norstedt G., y Tollet-Egnell, P. (2009). Sex-different and growth hormone-regulated expression of microRNA in rat liver. *BMC Molecular Biology*; 10(1), 13. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-10-13>.
  38. Chmurzynska A. (2010). Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutrition Reviews*; 68(2), 87-98. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00265.x>.
  39. Choi J. (2010). Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biology*; 11(7), R70. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-7-r70>.
  40. Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O., Jauniaux E., Charnock-Jones D. y Burton G. (2007). Nuclear Factor- $\kappa$ B, p38, and Stress-Activated Protein Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways Regulate Proinflammatory Cytokines and Apoptosis in Human Placental Explants in Response to Oxidative Stress. *The American Journal Of Pathology*; 170(5), 1511-1520. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.061035>.
  41. Clop A., Bertoni A., Spain S., Simpson M., Pullabhatla V., Tonda R. et. al. (2013). An In-Depth Characterization of the Major Psoriasis Susceptibility Locus Identifies Candidate Susceptibility Alleles within an HLA-C Enhancer Element. *Plos ONE*; 8(8), e71690. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071690>.
  42. Colomiere M., Permezel M., Riley C., Desoye G. y Lappas, M. (2009). Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *European Journal Of Endocrinology*; 160(4), 567-578. <http://dx.doi.org/10.1530/eje-09-0031>.
  43. Consejo Nacional de Población (CONAPO). (2011). Perfiles de salud reproductiva: República Mexicana. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016. Disponible en: [http://www.conapo.gob.mx/en/CONAPO/Republica\\_Mexicana\\_Perfiles\\_de\\_Salud\\_Reproductiva](http://www.conapo.gob.mx/en/CONAPO/Republica_Mexicana_Perfiles_de_Salud_Reproductiva).
  44. Consejo Nacional de Población (CONAPO). (2015). Encuesta nacional de la dinámica demográfica (ENADID) 2014. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016. Disponible en: [http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Principales\\_resultados\\_de\\_la\\_Encuesta\\_Nacional\\_de\\_la\\_Dinamica\\_Demografica\\_2014](http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Principales_resultados_de_la_Encuesta_Nacional_de_la_Dinamica_Demografica_2014).
  45. Consejo Nacional de Población (CONAPO). (2016). Indicadores de la dinámica demográfica 1990-2010 y de proyecciones de población 2010-2030 de México y

- las entidades federativas. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016. Disponible en: [http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Consultas\\_Interactivas](http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Consultas_Interactivas).
46. Craici I., Wagner S., Bailey K., Fitz-Gibbon P., Wood-Wentz C., Turner S. et. al. (2013). Podocyturia Predates Proteinuria and Clinical Features of Preeclampsia: Longitudinal Prospective Study. *Hypertension*; 61(6), 1289-1296. <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.113.01115>.
  47. De Wolf F., Robertson W. y Brosens I. (1975). The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*; 123(2), 164-174. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(75\)90522-0](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(75)90522-0).
  48. Dean W., Santos F., Reik W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol*; 14: 93–100.
  49. Dechend R., Gratzke P., Wallukat G., Shagdarsuren E., Plehm R., Brasen J. et. al. (2005). Agonistic Autoantibodies to the AT1 Receptor in a Transgenic Rat Model of Preeclampsia. *Hypertension*; 45(4), 742-746. <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000154785.50570.63>.
  50. Delisle, H. (2002). Programming of chronic disease by impaired fetal nutrition. [Geneva]: Dept. of Nutrition for Health and Development [y] Dept. of Noncommunicable Disease Prevention and Health Promotion, World Health Organization.
  51. Denison F., Roberts K., Barr S. y Norman J. (2010). Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction*; 140(3), 373-385. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-10-0074>.
  52. Department of Health and Human Services. (2009). Complicaciones del Embarazo. Recuperado el 2 de Diciembre de 2016. Disponible en: <https://www.womenshealth.gov/espanol/embarazo/esta-embarazada/complicaciones-embarazo.html>.
  53. Department of Health and Human Services. (2010). Stages of pregnancy. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016. Disponible en: <http://womenshealth.gov/pregnancy/you-are-pregnant/stages-of-pregnancy.html>.
  54. Devaney B., Kalb L., Briefel R., Zavitsky T., Clusen N. y Ziegler P. (2004). Feeding infants and toddlers study: overview of the study design. *J Am Diet Assoc*; 104: 8-13.
  55. Díaz S. (1994). The human reproductive pattern and the changes in women's roles. *Int J Gynecol Obstet*; 47, Suppl:S3-S9.

56. Dirección General de Información en Salud (DGIS). (2014). Mortalidad. Secretaría de Salud. Recuperado el 13 de Mayo de 2016. Disponible en: [http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinaiis/e\\_mortalidadgeneral.html](http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinaiis/e_mortalidadgeneral.html).
57. Dolinoy D., Huang D. y Jirtle R. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*; 104(32), 13056-13061. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0703739104>.
58. Donoso E., Carvajal J., Vera C., y Poblete, J. (2014). La edad de la mujer como factor de riesgo de mortalidad materna, fetal, neonatal e infantil. *Revista Médica De Chile*; 142(2), 168-174. <http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872014000200004>.
59. Durham A., Wiegman C., y Adcock I. (2011). Epigenetics of asthma. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*; 1810(11), 1103-1109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.006>
60. Dürst M., Hansel A. y Steinbach D. (2016). Method for early diagnosis of carcinomas of the anogenital tract. *Estados Unidos*.
61. Eremina V., Sood M., Haigh J., Nagy,A., Lajoie G., Ferrara N. et. al. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *Journal Of Clinical Investigation*; 111(5), 707-716. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200317423>.
62. Faber D., de Groot P. y Visseren, F. (2009). Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Obesity Reviews*; 10(5), 554-563. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789x.2009.00593.x>.
63. Farley D., Tejero M., Comuzzie A., Higgins P., Cox L. Werner S. et. al. (2009). Feto-placental Adaptations to Maternal Obesity in the Baboon. *Placenta*; 30(9), 752-760. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2009.06.007>.
64. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K. et. al. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*; 380(6573), 439-442. <http://dx.doi.org/10.1038/380439a0>.
65. Flores Huerta S., y Martínez Salgado H. (2012). Peso al nacer de los niños y niñas derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*; 69(1), 30-39
66. Fowden, A. L. (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*; 7: 351-63.
67. Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. (2011). Developmental programming and epigenetics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(6\_Suppl), pp.1943S-1952S.



68. Gaccioli F. y Lager S. (2016). Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Frontiers In Physiology*; 7. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00040>.
69. Gant N. F., Chand S., Whalley P. J. y MacDonald P. C. (1974). The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet. Gynecol*; 43, 854.
70. George E. y Granger J. (2013). Heme oxygenase in pregnancy and preeclampsia. *Current Opinion In Nephrology And Hypertension*; 22(2), 156-162. <http://dx.doi.org/10.1097/mnh.0b013e32835d19f7>.
71. Georgieff, M. K. (2007). Nutrition and the developing brain: Nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr*; 85(Suppl):614S–20S.
72. Gluckman P., Buklijas T., y Hanson M. (2016). The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Concept. *The Epigenome And Developmental Origins Of Health And Disease*, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801383-0.00001-3>.
73. Gluckman, P., Hanson, M. and Beedle, A. (2006). Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology*, 19(1), pp.1-19.
74. Godfrey K. M. (1998). Maternal regulation of fetal development and health in adult life. *Eur J Obstet Gynecol*; 78:141–50.
75. Gómez-Gómez M. y Danglot Banck C.. (2006). El neonato de madres con preeclampsia-eclampsia. *Revista Mexicana de Pediatría*, Vol. 73, Núm. 2, pp.82-88.
76. González S. J., Cristiano E., y Argibay P. (2011). Epigenética y epigenoma: Un paso más allá en la etiología y potencial tratamiento de las enfermedades neurológicas. *Medicina*; 71(4), 390-396.
77. Gruenwald P., Funakawa H., Mitani S., Nishimura T. y Takeuchi S. (1967). Influence of environmental factors on fetal growth in man. *The Lancet*, 289(7498), pp.1026-1029.
78. Gudjonsson JE1, Krueger G. (2012). A role for epigenetics in psoriasis: methylated Cytosine-Guanine sites differentiate lesional from nonlesional skin and from normal skin. *J Invest Dermatol*; 2012 Mar;132(3 Pt 1):506-8. doi: 10.1038/jid.2011.364.
79. Gutiérrez JP, Rivera Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando Hernández S, Franco A, et. al. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

80. Harding J, Liu L, Evans P, Oliver M, Gluckman P. (1992). Intrauterine feeding of the growth retarded fetus: can we help? *Early Hum Dev*; 29: 193–7.
81. Heil W., y Ehrhardt V. (2008). *Reference Ranges for Adults and Children: Pre-Analytical Considerations*. Roche: Rotkreuz, Suiza. 122 p.
82. Heinig, M. J. y Dewey, K. G. (1997). Health effects of breastfeeding for mothers: A critical review. *Nutrition Reviews*; 10:59–73.
83. Henkhaus R. S., Kim S.-J., Kimonis V. E., Gold J.-A., Dykens E. M., Driscoll D. J., y Butler M. G. (2012). Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Identification of Deletion Genetic Subtypes in Prader-Willi Syndrome. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*; 16(3), 178–186. <http://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0115>.
84. Herrera, B. M., Keildson, S., & Lindgren, C. M. (2011). Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*, 69(1), 41–49. <http://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.02.018>.
85. Herring, S. y Oken, E. (2010). Ganancia de peso durante el embarazo: Su importancia para el estado de salud materno-infantil. *Annales Nestlé (Ed. Española)*, 68(1), 17-28. <http://dx.doi.org/10.1159/000320346>.
86. Heyn H., Moran S., Hernando-Herraez I., Sayols S., Gomez A., Sandoval J. et. al. (2013). DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Research*; 23(9), 1363-1372. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.154187.112>.
87. Hochberg Z., Feil R., Constanica M., Fraga M., Junien C., et. al. (2011). Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. *Endocrine Reviews*; 32(2), 159–224. <http://doi.org/10.1210/er.2009-0039>.
88. Holoch, D. y Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71-84. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3863>.
89. Horton, R. (2008). Maternal and child undernutrition: an urgent opportunity. *The Lancet*, 371(9608), 179. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61869-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61869-8).
90. Hospital Materno Infantil Inguarán. (2012). *Valores de Referencia Femeninos de Biometría Hemática*. Ciudad de México, México: Secretaria de Salud del Gobierno de la Ciudad de México.
91. Hotamisligil G., Shargill N. y Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*; 259(5091), 87-91. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7678183>.
92. Hu Y., Blair J., Yuen R., Robinson W. y von Dadelszen P. (2015). Genome-wide DNA methylation identifies trophoblast invasion-related genes: Claudin-4 and

- Fucosyltransferase IV control mobility via altering matrix metalloproteinase activity. *Molecular Human Reproduction*; 21(5), 452-465. <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gav007>.
93. Huang, C., Li, Z., Wang, M. and Martorell, R. (2010). Early Life Exposure to the 1959-1961 Chinese Famine Has Long-Term Health Consequences. *Journal of Nutrition*, 140(10), pp.1874-1878.
  94. Hurd P. y Nelson C. (2009). Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Briefings In Functional Genomics And Proteomics*; 8(3), 174-183. <http://dx.doi.org/10.1093/bfgp/elp013>.
  95. Illumina. (2010). GenomeStudio® Methylation Module v1.8 User Guide. Part # 11319130 Rev. B.
  96. Illumina. (2011). Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide. Catalog #WG-914-1001. Part # 15019519 Rev B.
  97. Illumina. (2012). Infinium® HumanMethylation450 BeadChip: The ideal solution for affordable, large sample-size genome-wide DNA methylation studies. Data Sheet: Epigenetics. Pub. No. 270-2010-001.
  98. Illumina. (2015). Illumina Methylation BeadChips Achieve Breadth of Coverage using 2 Infinium® Chemistries. Technical note: Epigenetic Analysis. Pub. No. 270-2012-001.
  99. Instituto de Biotecnología (IBT). (2017). Cuantificación. Revisado el 07 de Febrero de 2017. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html>
  100. Institute of Medicine (IOM). (2009). *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington: National Academy Press.
  101. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2014). Estadísticas Vitales: Natalidad 2014. Recuperado el 13 de Mayo de 2016. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/184>.
  102. Instituto Nacional de Perinatología (INPer). (2003). *Normas y Procedimientos de Neonatología*. Ciudad de México, México: INPer, Dirección Médica, Subdirección de Neonatología.
  103. Irizarry, R., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P. et al. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics*; 41(2), 178-186. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.298>.
  104. Irwin L., Siddiqi A. y Hertzman C. (2007). Desarrollo de la primera infancia: un potente ecualizador. Informe final para la Comisión sobre los Determinantes Sociales de la Salud de la Organización Mundial de la Salud: Canadá. 74 p.

105. Jansen R. A., Liu J. C., Liyanarachchi S., Crijns A. P., Van P. S., et. al. (2006). Prognostic impact of MAD1L1 promoter hypermethylation in advanced ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 24(18), 261S-261S.
106. Jauniaux E., Watson A., Hempstock J., Bao Y., Skepper J. y Burton G. (2000). Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress. *The American Journal Of Pathology*; 157(6), 2111-2122. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64849-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64849-3).
107. Jeffries M. y Sawalha A. (2011). Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents. *International Journal Of Clinical Rheumatology*; 6(4), 423-438. <http://dx.doi.org/10.2217/ijr.11.32>.
108. Jeyabalan A. (2013). Epidemiology of preeclampsia: impact of obesity. *Nutrition Reviews*; 71, S18-S25. <http://dx.doi.org/10.1111/nure.12055>.
109. Jiménez-Chillarón J., Díaz R., Martínez D., Pentinat T., Ramón-Krauel M., Ribó S., y Plösch T. (2012). The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*; 94(11), 2242-2263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.012>.
110. Jones H., Jansson T. y Powell T. (2009). IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *AJP: Cell Physiology*; 297(5), C1228-C1235. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00195.2009>.
111. Jones P. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*; 13(7), 484-492. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3230>.
112. Jowett, A. (1991). The demographic responses to famine: The case of China 1958-61. *GeoJournal*, 23(2).
113. Kanherkar R., Bhatia-Dey N., y Csoka A. (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*; 2. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2014.00049>.
114. Katto J. y Mahlkecht U. (2011). Epigenetic regulation of cellular adhesion in cancer. *Carcinogenesis*; 32(10), 1414-1418. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgr120>
115. King, J. C. (2000). Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr*; 71:1218S-25S.
116. Kone, B. C. (2013). Epigenetics and the Control of the Collecting Duct Epithelial Sodium Channel. *Seminars in Nephrology*, 33(4), 383-391. <http://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.05.010>.

117. Krebs J., Kilpatrick S. y Goldstein E. (2014). *Lewin's Genes XI* (11a ed.). Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning.
118. Kulkarni A., Chavan-Gautam P., Mehendale S., Yadav H. y Joshi, S. (2011). Global DNA Methylation Patterns in Placenta and Its Association with Maternal Hypertension in Pre-Eclampsia. *DNA And Cell Biology*; 30(2), 79-84. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2010.1084>.
119. Kurdyukov S. y Bullock M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*; 5(1), 3. <http://dx.doi.org/10.3390/biology5010003>.
120. Kwong WY, Wild A, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*; 127: 4195–202.
121. Lane R. H. (2014). Fetal Programming, Epigenetics, and Adult Onset Disease. *Clin Perinatol*; 41. 815–831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2014.08.006>.
122. Lawrence, R. A. y Lawrence, R. M. (2005). *Breastfeeding: A guide for the medical professional*, 6a ed. Minneapolis: Mosby.
123. Lee P., Costumbrado J., Hsu C. y Kim Y. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal Of Visualized Experiments*; (62). <http://dx.doi.org/10.3791/3923>.
124. Lian I., Løset M., Mundal S., Fenstad M., Johnson M., Eide I. et. al. (2011). Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta*; 32(11), 823-829. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.005>.
125. Lillycrop K. y Burdge G. (2010). Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. *International Journal Of Obesity*; 35(1), 72-83. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.122>.
126. Lumeng C., Bodzin J. y Saltiel A. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal Of Clinical Investigation*; 117(1), 175-184. <http://dx.doi.org/10.1172/jci29881>.
127. Lumey L. y Stein A. (1997). In utero exposure to famine and subsequent fertility: The Dutch Famine Birth Cohort Study. *American Journal of Public Health*, 87(12), pp.1962-1966.
128. Ma X., Wang Y. W., Zhang M. Q., y Gazdar, A. F. (2013). DNA methylation data analysis and its application to cancer research. *Epigenomics*; 5(3), 301–316. <http://doi.org/10.2217/epi.13.26>.

129. Majumder P. y Boss J. M. (2011). DNA methylation dysregulates and silences the HLA-DQ locus by altering chromatin architecture. *Genes and Immunity*; 12(4), 291–299. <http://doi.org/10.1038/gene.2010.77>.
130. Maloney, C. y Rees, W. (2005). Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction*, 130(4), 401–410. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00523>
131. Martínez Arias A., Nichols J., y Schroter, C. (2013). A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos. *Development*, 140(17), 3499–3510. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.091959>.
132. Martinez-Arguelles D. y Papadopoulos V. (2010). Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*; 75(7), 467–476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.02.004>.
133. Maynard S., Min J., Merchan J., Lim K., Li J., Mondal S. et. al. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal Of Clinical Investigation*; 111(5), 649–658. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200317189>.
134. Meinrad Busslinger<sup>1</sup> and Alexander Tarakhovsky. (2014). Epigenetic control of Immunity. Cold Spring Harbour. doi: 10.1101/cshperspect.a019307.
135. Meisenberg C., Tait P., Dianova I., Wright K., Edelmann M., Ternette N. et. al. (2011). Ubiquitin ligase UBR3 regulates cellular levels of the essential DNA repair protein APE1 and is required for genome stability. *Nucleic Acids Research*; 40(2), 701–711. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr744>.
136. Mejía Monroy A. M., Téllez Becerril G. E., González Vargas Á. (2012). Morbilidad materna extrema (near miss) y muertes maternas. *Arch Inv Mat Inf*; IV(3):146–153.
137. Meng H., Cao Y., Qin J., Song X., Zhang Q., Shi Y., y Cao, L. (2015). DNA Methylation, Its Mediators and Genome Integrity. *International Journal Of Biological Sciences*; 11(5), 604–617. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.11218>.
138. Millis, R. (2010). Epigenetics and Hypertension. *Current Hypertension Reports*; 13(1), 21–28. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-010-0173-8>.
139. Minguet-Romero Ramón, Polita del Rocío Cruz-Cruz, Roberto Aguli Ruíz-Rosas, Marcelino Hernández-Valencia. (2014). Incidencia de nacimientos pretérmino en el IMSS (2007-2012). *Ginecol Obstet Mex* 2014;82:465–471
140. Minjarez-Corral M., Rincón-Gómez I., Morales-Chomina Y. A., et. al. (2014). Ganancia de peso gestacional como factor de riesgo para desarrollar complicaciones obstétricas. *Perinatol Reprod Hum*; 28 (3): 159–166.

141. Miranda M. y Navío C. (2013). Benefits of exercise for pregnant women. *Journal of Sport and Health Research*, 5 (2), 229-232.
142. Mitchell N. (2012). Genome-wide DNA methylation changes during breast tumorigenesis. Birmingham, Ala.: University of Alabama at Birmingham, Graduate School.
143. Moffett A. y Hiby S. (2007). How Does the Maternal Immune System Contribute to the Development of Pre-eclampsia?. *Placenta*; 28, S51-S56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2006.11.008>.
144. Mohn F., Weber M., Rebhan M., Roloff T., Richter J., Stadler, M. et al. (2008). Lineage-specific Polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *GBM Annual Spring Meeting Mosbach 2008*; 2008 (Spring). [http://dx.doi.org/10.1240/sav\\_gbm\\_2008\\_m\\_002210](http://dx.doi.org/10.1240/sav_gbm_2008_m_002210).
145. Moore, L., Le, T., & Fan, G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*; 38(1), 23-38. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
146. Morrow J., Cho M., Hersh C., Pinto-Plata V., Celli B., Marchetti N. et. al. (2016). DNA methylation profiling in human lung tissue identifies genes associated with COPD. *Epigenetics*, 11(10), 730-739. <http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2016.1226451>.
147. Murgatroyd C. y Spengler D. (2011). Epigenetics of Early Child Development. *Frontiers In Psychiatry*; 2. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2011.00016>
148. Muslera C. y González S. (2013). *Guía de Atención al Embarazo, Parto Normal y Lactancia Materna. (2a ed.)*. Gobierno del Principado de Asturias: SESPA.
149. Myatt L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal Of Physiology*; 572(1), 25-30. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.104968>
150. Nafee T., Farrell W., Carroll W., Fryer A. y Ismail K. (2008). Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG*; 115: 158-168.
151. National Centre for Health Outcomes Development (NCHOD). (1999). *Health Outcome Indicators: Normal Pregnancy and Childbirth. Report of a working group to the Department of Health. (P. Troop, M. Goldacre, A. Mason, & R. Cleary, Edits.)* Oxford: National Centre for Health Outcomes Development.
152. Nazar J. Claudio, Bastidas E. Javier, Zamora H. Maximiliano, y Lacassie Héctor J. (2014). *Obesidad y embarazo: implicancias anestésicas*. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*: 79(6), 537-545.

153. New England BioLabs. (2017). Bisulfite Conversion. Recuperado el 10 de Enero de 2017. Disponible en: [https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/NewSized%20Brochure%20Images/Epigenetics/Bisulfite\\_Conversion.jpg?device=modal](https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/NewSized%20Brochure%20Images/Epigenetics/Bisulfite_Conversion.jpg?device=modal).
154. Niller H. y Minarovits J. (2015). Patho-epigenetics of Infectious Diseases Caused by Intracellular Bacteria. *Patho-Epigenetics Of Infectious Disease*; 107-130. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-24738-0\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-24738-0_6).
155. Nomura, Y., Lambertini, L., Rialdi, A., Lee, M., Mystal, E., & Gracie, M. et al. (2014). Global Methylation in the Placenta and Umbilical Cord Blood From Pregnancies With Maternal Gestational Diabetes, Preeclampsia, and Obesity. *Reproductive Sciences*, 21(1), 131-137. <http://dx.doi.org/10.1177/1933719113492206>.
156. Nordlund J., Milani L., Lundmark A., Lönnerholm G. y Syvänen A. (2012). DNA Methylation Analysis of Bone Marrow Cells at Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia and at Remission. *Plos ONE*; 7(4), e34513. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034513>.
157. Núñez Urquiza, R. (2010). Reto: evitar muertes maternas en el Estado de México. Presentación, Instituto Nacional de Salud Pública: Centro de Información para Decisiones en Salud Pública.
158. Nutricia Research. (2015). Early life nutrition: the importance of the first 1000 days. Recuperado el 20 de Enero de 2017. Disponible en: [www.nutriciaresearch.com/early-life-nutrition/thousand-days](http://www.nutriciaresearch.com/early-life-nutrition/thousand-days).
159. Ohgami R., Ma L., Ren L., Weinberg O., Seetharam M., Gotlib J. y Arber D. (2012). DNA methylation analysis of ALOX12 and GSTM1 in acute myeloid leukaemia identifies prognostically significant groups. *British Journal Of Haematology*; 159(2), 182-190. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12029>.
160. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002) *Healthy Environments for Children - Initiating an Alliance for Action*. World Health Organization Statistical Information (WHOSIS), Geneva.
161. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). *Managing complications in pregnancy and childbirth: a guide for midwives and doctors*. Department of Reproductive Health and Research Family and Community Health. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Suiza.
162. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *Enfermedades Crónicas*. Revisado el 13 de Mayo de 2016. Disponible en: [http://www.who.int/topics/chronic\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/).



163. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Patrones de Crecimiento Infantil. Recuperado el 18 de Septiembre de 2016. Disponible en: [www.who.int/childgrowth/standards/es/](http://www.who.int/childgrowth/standards/es/)
164. Pang Z., Zhou J. y Huang L. (2008). Interleukin-10 May Participate in Regulating Trophoblast Invasion in Human Placentae Throughout Gestation. *American Journal Of Reproductive Immunology*; 60(1), 19-25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00586.x>.
165. Pantoja Ludueña, M. (2015). Los primeros 1000 días de la vida. *Rev Soc Bol Ped*; 54 (2): 60-1.
166. Parikh S. y Karumanchi S. (2008). Putting pressure on pre-eclampsia. *Nature Medicine*; 14(8), 810-812. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0808-810>.
167. Peralta L. Octavio. (1996). Salud Reproductiva en el Período Post-parto: Manual para el entrenamiento del personal de los servicios de salud. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva.
168. Perea E. (2010). Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis. *Medicine*, 10 (57), 3910-4.
169. Pérez Baleón G. F. y Sánchez Bringas Á. (2013). Dificultades en la captación de la morbilidad materna en México. Un análisis de la ENADID 2009. *Coyuntura Demográfica*, Núm. 3.
170. Poissonnet C., Burdi A. y Bookstein F. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Human Development*; 8(1), 1-11. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-3782\(83\)90028-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-3782(83)90028-2).
171. Poissonnet C., Burdi A. y Garn S. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Human Development*; 10(1-2), 1-11. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-3782\(84\)90106-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-3782(84)90106-3).
172. Portha B., Fournier A., Ah Kioon M. D., Mezger V., Movassat J. (2014). Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie*; 97, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.10.003>.
173. Poulain-Godefroy O., Lecoœur C., Pattou F., Fruhbeck G. y Froguel P. (2008). Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *AJP: Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*; 295(1), R1-R7. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00926.2007>.
174. Putiri E. L., Tiedemann R. L., Liu C., Choi J.-H. y Robertson K. D. (2014). Impact of human MLL/COMPASS and polycomb complexes on the DNA methylome. *Oncotarget*; 5(15), 6338-6352.

175. Puumala S. y Hoyme H. (2015). Epigenetics in Pediatrics. *Pediatrics In Review*; 36(1), 14-21. <http://dx.doi.org/10.1542/pir.36-1-14>
176. Radaelli T., Lepercq J., Varastehpour A., Basu S., Catalano P. y Hauguel-De Mouzon S. (2009). Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes mellitus. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*; 201(2), 209.e1-209.e10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2009.04.019>.
177. Raineri F., Confalone Gregorian M., Barbieri M. E., Zamorano M. S., Gorodisch R., et. al. (2015). Determinantes sociales y ambientales para el desarrollo de los niños y niñas desde el periodo del embarazo hasta los 5 años; Bases para un diálogo deliberativo. Fondo de las Naciones Unidad para la infancia: Argentina. 90 p.
178. Rajakumar A. (2004). Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*; 25(10), 763-769. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2004.02.011>.
179. Ramirez-Carrozzi, V., Braas, D., Bhatt, D., Cheng, C., Hong, C., Doty, K. et al. (2009). A Unifying Model for the Selective Regulation of Inducible Transcription by CpG Islands and Nucleosome Remodeling. *Journal Of End-To-End-Testing*; 138(1), 114-128. [http://dx.doi.org/10.1016/s9999-9994\(09\)20361-8](http://dx.doi.org/10.1016/s9999-9994(09)20361-8).
180. Ramsay J., Ferrell W., Crawford L., Wallace A., Greer I. y Sattar N. (2002). Maternal Obesity Is Associated with Dysregulation of Metabolic, Vascular, and Inflammatory Pathways. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 87(9), 4231-4237. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-020311>.
181. Ray Matt. (2006) Epigenetics: the science of change. *Environmental Health Perspectives*. Volumen 114, No 3.
182. Rebholz S., Jones T., Burke K., Jaeschke A., Tso P., D'Alessio D., y Woollett L. (2011). Multiparity leads to obesity and inflammation in mothers and obesity in male offspring. *AJP: Endocrinology And Metabolism*, 302(4), E449-E457. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00487.2011>.
183. Redman C. y Sargent I. (2010). Immunology of Pre-Eclampsia. *American Journal Of Reproductive Immunology*; 63(6), 534-543. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x>.
184. Reik W., Dean W. y Walter J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*; 293: 1089-93.
185. Reinius L., Acevedo N., Joerink M., Pershagen G., Dahlén S., Greco D. et al. (2012). Differential DNA Methylation in Purified Human Blood Cells: Implications

- for Cell Lineage and Studies on Disease Susceptibility. *Plos ONE*; 7(7), e41361. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041361>.
186. Remus R., Kanzaki A., Yawata A., Wada H., Nakanishi H., Sugihara T., et al. (2005). Relationships between DNA Methylation and Expression in Erythrocyte Membrane Protein (Band 3, Protein 4.2, and 3-Spectrin) Genes during Human Erythroid Development and Differentiation. *International Journal Of Hematology*; 82(5), 422-429. <http://dx.doi.org/10.1532/ijh97.05058>.
  187. Reynolds R. y Stirrat L. (2014). Effects of maternal obesity on early and long-term outcomes for offspring. *Research and Reports In Neonatology*, 43. <http://dx.doi.org/10.2147/rrn.s46783>.
  188. Richardson B. (2003) Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev*; 2: 245–61.
  189. Richardson, B. (2012). Epigenetics and lupus. *Arthritis Research & Therapy*; 14(Suppl 3), A1. <http://doi.org/10.1186/ar3935>.
  190. Roberts J., Bodnar L., Patrick T. y Powers R. (2011). The role of obesity in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal Of Women's Cardiovascular Health*; 1(1), 6-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2010.10.013>.
  191. Rodriguez J., Munoz M., Vives L., Frangou C., Groudine M. y Peinado M. (2008). Bivalent domains enforce transcriptional memory of DNA methylated genes in cancer cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*; 105(50), 19809-19814. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810133105>.
  192. Rohan S., Tu J., Kao J., Mukherjee P., Campagne F., Zhou X. et. al. (2006). Gene Expression Profiling Separates Chromophobe Renal Cell Carcinoma from Oncocytoma and Identifies Vesicular Transport and Cell Junction Proteins as Differentially Expressed Genes. *Clinical Cancer Research*; 12(23), 6937-6945. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1268>.
  193. Rosso, P. (1990). Nutrition and metabolism in pregnancy. New York: Oxford University Press: 117–118, 125, 150–151.
  194. Rudolph, A. M. (1984). The fetal circulation and its response to stress. *J Dev Physiol*; 6: 11–9
  195. Ryan H., Morrison J., Breathnach F., McAuliffe F., Geary M., Daly S. et. al. (2013). 534: The influence of maternal body mass index on fetal weight estimation in twin pregnancy. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*; 208(1), S228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.10.700>.
  196. Sánchez Bringas, Á. y Pérez Baleón, F. (2013). ¿Qué sabemos de la incidencia de la morbilidad materna en México? Recuperado el 02 de Diciembre de 2016.

- Disponible en:  
[http://cneqsr.salud.gob.mx/contenidos/descargas/GySenC/Volumen12\\_1/que\\_s\\_abemos\\_de\\_la\\_incidencia.pdf](http://cneqsr.salud.gob.mx/contenidos/descargas/GySenC/Volumen12_1/que_s_abemos_de_la_incidencia.pdf).
197. Sebire N. (2007). Pathophysiological significance of abnormal umbilical cord coiling index. *Ultrasound In Obstetrics And Gynecology*; 30(6), 804-806. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.5180>.
  198. Secretaría de Salud. (2007). Lineamiento técnico para la prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia (4a ed.). Ciudad de México: México.
  199. Secretaría de Salud. (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-2016, Para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la persona recién nacida. Banco de Normas Oficiales Mexicanas.
  200. Seki Y., Hayashi K., Itoh K., Mizugaki M., Saitou M. y Matsui Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol*; 278: 440-58.
  201. Sharp P., Sugden B. y Sambrook J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*; 12(16), 3055-3063. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00740a018>.
  202. Simic, S. et. al. (1995). Nutritional effects of the siege on newborn babies in Sarajevo. *Eur J Clin Nutr*; 49 (Suppl., 2): S33-6.
  203. Sistema Nacional de Salud (SNS). (2011). Guía de Práctica Clínica de Atención en el Embarazo y Puerperio. Andalucía: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
  204. Sliker R., Roost M., van Iperen L., Suchiman H., Tobi E., Carlotti F. et al. (2015). DNA Methylation Landscapes of Human Fetal Development. *PLOS Genetics*; 11(10), e1005583. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005583>.
  205. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). (2010). Control Prenatal del Embarazo Normal. *Protocolos de Asistencia en Obstetricia*, 20.
  206. Spong, C. (2013). Defining “Term” Pregnancy. *JAMA*, 309(23), 2445. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.6235>.
  207. Stenvinkel, P., Karimi, M., Johansson, S., Axelsson, J., Suliman, M., & Lindholm, B. et al. (2007). Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation? Aa novel risk factor for cardiovascular disease?. *Journal Of Internal Medicine*, 261(5), 488-499. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01777.x>.

208. Sun L., Fan Z., Chen J., Tian W., Li M., Xu H. et al. (2014). Protein inhibitor of activated STAT 4 (PIAS4) regulates pro-inflammatory transcription in hepatocytes by repressing SIRT1. *Oncotarget*; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9864>.
209. Sun W., Gaykalova D., Ochs M., Mambo E., Arnaoutakis D., Liu Y. et al. (2013). Activation of the NOTCH Pathway in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*; 74(4), 1091-1104. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-1259>.
210. Surani M. A. (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*; 414: 122–8.
211. Tal R., Shaish A., Barshack I., Polak-Charcon S., Afek A. y Harats D. (2010). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) overexpression induces preeclampsia-like manifestations in pregnant mice. *Fertility And Sterility*; 94(4), S182-S183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.712>.
212. Thermo Fisher Scientific. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. Recuperado el 27 de Enero de 2017. Disponible en: [http://rai.unam.mx/manuales/lgen\\_ND2000\\_user-manual.pdf](http://rai.unam.mx/manuales/lgen_ND2000_user-manual.pdf).
213. Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D'Anna, F., Kuchnio, A., & Ploumaki, A. et al. (2016). Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*, 537(7618), 63-68. <http://dx.doi.org/10.1038/nature1908..>
214. Thomsen L., Melton P., Tollaksen K., Lyslo I., Roten L., Odland, M. et al. (2015). Refined phenotyping identifies links between preeclampsia and related diseases in a Norwegian preeclampsia family cohort. *Journal Of Hypertension*, 33(11), 2294-2302. <http://dx.doi.org/10.1097/hjh.0000000000000696>.
215. Tordjman J., Poitou C., Hugol D., Bouillot J., Basdevant A., Bedossa P. et al. (2009). Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: Influence of glycemic status. *Journal Of Hepatology*; 51(2), 354-362. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.02.031>.
216. Torry D., Wang H., Wang T., Caudle M. y Torry R. (1998). Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*; 179(6), 1539-1544. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378\(98\)70021-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(98)70021-3).
217. Tuovinen S., Räikkönen K., Kajantie E., Pesonen A., Heinonen K., Osmond C. et al. (2010). Depressive symptoms in adulthood and intrauterine exposure to pre-eclampsia: the Helsinki Birth Cohort Study. *BJOG: An International Journal Of Obstetrics & Gynaecology*; 117(10), 1236-1242. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02634.x>.
218. Udali S., Guarini P., Ruzzenente A., Ferrarini A., Guglielmi A., Lotto V. et al. (2015). DNA methylation and gene expression profiles show novel regulatory

- pathways in hepatocellular carcinoma. *Clinical Epigenetics*; 7(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-015-0077-1>.
219. UniProt. (2017). SH3BP5. Recuperado el 28 de Enero de 2017. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/O60239>.
220. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (2016). Valores de Referencia Femeninos de Química Sanguínea. Ciudad de México: Facultad de Medicina: Torre de Investigación.
221. van den Elsen P. J., van Eggermond M. C. y Wierda R. J. (2011). Epigenetic control in immune function. *Adv Exp Med Biol*; 711: 36-49.
222. van Teijlingen E. y Hundley V. (2002). The importance of pilot studies. *Nursing Standard*; 16, 40, 33-36.
223. Varastehpour A., Radaelli T., Minium J., Ortega H., Herrera E., Catalano P. y Hauguel-de Mouzon S. (2006). Activation of Phospholipase A2 Is Associated with Generation of Placental Lipid Signals and Fetal Obesity. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 91(1), 248-255. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2005-0873>.
224. Vásquez-Garibay É. M. y Romero-Velarde E. (2008). Esquemas de alimentación saludable en niños durante sus diferentes etapas de la vida. Parte I. Primeros dos años de vida. *Bol Med Hosp Infant Mex*. Vol. 65.
225. Vaughan J. y Walsh S. (2002). Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertension In Pregnancy*; 21(3), 205-223. <http://dx.doi.org/10.1081/prg-120015848>.
226. Vickers, M. (2014). Developmental Programming and Transgenerational Transmission of Obesity. *Annals Of Nutrition And Metabolism*, 64(s1), 26-34. <http://dx.doi.org/10.1159/000360506>.
227. Victora C., Adair L., Fall C., Hallal P., Martorell R., Richter L., y Sachdev H. (2008). Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *The Lancet*; 371(9609), 340-357. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61692-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61692-4).
228. Villeneuve L. M., Reddy M. A. y Natarajan R. (2011). Epigenetics: Deciphering its role in Diabetes and its Chronic Complications. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*; 38(7), 401-409. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05497.x>.
229. Walsh C. P., Chaillet J. R. y Bestor T. H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*; 20: 116-17.

230. Walsh S. (2007). Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends In Endocrinology & Metabolism*; 18(10), 365-370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2007.09.003>.
231. Wang L., Zhang Z., Li Q., Yang R., Pei X., Xu Y. et al. (2008). Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Human Reproduction*; 24(3), 562-579. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den439>.
232. Wilhelm-Benartzi C., Koestler D., Karagas M., Flanagan J., Christensen B., Kelsey, K. et al. (2013). Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *British Journal Of Cancer*; 109(6), 1394-1402. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.496>.
233. Wu C., Nohr E., Bech B., Vestergaard M., Catov J., y Olsen J. (2009). Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*; 201(3), 269.e1-269.e10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2009.06.060>.
234. Wu G., Bazer F. W., Cudd T. A., Meininger C. J. y Spencer T. E. (2004). Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*; 134: 2169-72.
235. Wu C., Nohr E., Bech B., Vestergaard M., Catov J. y Olsen, J. (2009). Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 201(3), 269.e1-269.e10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2009.06.060>.
236. Yajnik, C. (2014). Transmission of Obesity-Adiposity and Related Disorders from the Mother to the Baby. *Annals Of Nutrition And Metabolism*, 64(s1), 8-17. <http://dx.doi.org/10.1159/000362608>
237. Yara S., Lavoie J. y Levy E. (2015). Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. *Epigenomics*, 7(2), 283-300. <http://dx.doi.org/10.2217/epi.14.84>.
238. Yu Y. (2004). High throughput screening of methylation status of genes in prostate cancer using an oligonucleotide methylation array. *Carcinogenesis*; 26(2), 471-479. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh310>.
239. Zhang H. y Zhang C. (2009). Regulation of Microvascular Function by Adipose Tissue in Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence of an Adipose-Vascular. *American Journal Of Biomedical Sciences*; 133-142. <http://dx.doi.org/10.5099/aj090200133>.
240. Zhang J., Zhang F., Didelot X., Bruce K., Cagampang F., Vatish M. et al. (2009a). Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics*; 10(1), 478. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-478>.

241. Zhang P., Su Y., y Lu Q. (2011). Epigenetics and psoriasis. *Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology*; 26(4), 399-403. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04261.x>.
242. Zhang X., Ulm A., Sominen H., Oh S., Weirauch M., Zhang H. et al. (2014). DNA methylation dynamics during ex vivo differentiation and maturation of human dendritic cells. *Epigenetics & Chromatin*; 7(1), 21. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8935-7-21>.
243. Zhou C., Zhang Y., Irani R., Zhang H., Mi T., Popek E. et. al. (2008). Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nature Medicine*; 14(8), 855-862. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1856>.



# Anexos

	Pág.
<b>Anexo No. 1</b> Carta de consentimiento informado	182



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título de protocolo: “Efectos del estado de nutrición y exposición a factores ambientales durante el embarazo en el perfil del metiloma del niño” (2ª fase)**

Investigador Principal: **Dr. Felipe Vadillo Ortega**

Sede donde se realizará el estudio: Instituto Nacional de Medicina Genómica

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a continuar con su participación en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La desnutrición, el sobrepeso y la obesidad durante el embarazo puede promover modificaciones en el hijo en crecimiento y predisponer para el desarrollo de diferentes complicaciones de salud durante la niñez o en la etapa adulta. La identificación temprana de esta enfermedad a través de estudios genéticos con muestras de sangre de su hijo puede proporcionar información necesaria para su prevención y tratamiento.

### 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Comparar el perfil del metiloma y metaboloma de los niños a los seis meses, un año y dos años de edad que estuvieron expuestos durante el embarazo a diferentes efectos nutricionales y contaminantes ambientales.

### 3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Con este estudio su hijo tendrá un seguimiento pediátrico muy cuidadoso con consultas médicas y valoraciones constantes durante los dos primeros años de edad. Es importante comentarle que este es un estudio de investigación en el que los resultados que se obtengan no significan ningún tipo de diagnóstico clínico y serán solamente de carácter informativo. Sin embargo, si usted cuenta con alguna duda o necesita de información en cuestiones de alimentación para usted y su hijo, se le pondrá brindar asistencia sin problema con el médico tratante.

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido.

### 4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar que su hijo participe en el estudio, ambos deberán acudir al Instituto Nacional de Pediatría a consulta cada 6 meses hasta cumplir los dos años de edad. A usted se brindará de toda la información respecto a la salud de su hijo y se le proporcionará la orientación médica necesaria. En caso de requerir algún medicamento para usted o su hijo, usted o su familia deberán cubrir esos gastos, que pueden ser cubiertos por su Seguro Popular.



De forma rutinaria en cada visita al médico, se le tomará a su hijo una muestra sanguínea de aproximadamente una cucharada sopera por el personal calificado del Instituto Nacional de Pediatría. Cabe mencionar que estos procedimientos son de riesgo mínimo y no generarán ningún daño a su hijo.

#### 5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

El riesgo para la toma de muestra sanguínea es muy bajo por lo que no se producirá daño a su hijo.

Este estudio consta de tres a cuatro consultas pediátricas en las cuales en cada uno se hará el registro de datos clínicos, antecedentes médicos, cuestionarios y listas nutricionales cada 6 meses a partir del día del nacimiento.

Al cumplir con los dos años, la información recabada será utilizada para estudios con datos estadísticos y en ningún momento se proporcionará su identidad (nombre) y la de su hijo.

En caso de que su hijo presente algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

#### 6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted ni su hijo, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide la participación de su hijo en el estudio, puede retirarse en el momento que lo desee, aún cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio, excepto los señalado en relación a la compra de medicamentos.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética del INMEGEN en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de: la Mtra. Garbiñe Saruwatari Zavala (Tel.: 5350-1900 ext.1157/1221; gsaruwatari@inmegen.gob.mx)
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

#### 7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del tutor o padre del paciente

\_\_\_\_\_  
Fecha y Teléfono



\_\_\_\_\_

**Testigo 1**

\_\_\_\_\_

**Fecha y Teléfono**

\_\_\_\_\_

**Testigo 2**

\_\_\_\_\_

**Fecha y Teléfono**

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_

**Dr. Felipe Vadillo Ortega**  
Investigador Responsable  
Tel. 5350 1900 ext. 1177

\_\_\_\_\_

**Fecha**