



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Cuantificación de glicina por UPLC en recién nacidos de madres con
y sin diabetes gestacional.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

LUIS FRANCISCO FERNÁNDEZ OSORNIO

Director: Dr. Adán Valladares Salgado
Asesora: M. C. Rosa Elba Galván Duarte

Ciudad de México, Mayo 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
3. Marco Teórico.....	9
3.1. Diabetes gestacional.....	9
3.2. Metabolismo de un carbono.....	10
3.2.1. Metabolitos involucrados en el metabolismo de un carbono y su importancia.....	13
3.2.1.1. Folatos.....	13
3.2.1.2. Colina y Betaína.....	13
3.2.1.3. Vitaminas B2, B6 y B12.....	14
3.2.1.4. Metionina.....	14
3.2.2. Glicina, propiedades generales y su importancia.....	14
3.3. Cromatografía líquida.....	16
3.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución.....	17
3.4. Espectrometría de masas.....	17
3.4.1. Fuente de ionización.....	18
3.4.2. Anilizador de masas.....	19
3.4.2.1. Cuadrupolo.....	19
3.4.2.2. Triple cuadrupolo.....	20
4. Planteamiento del problema.....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos	24
7. Metodología.....	25
7.1. Diseño del estudio.....	25
7.2. Universo de estudio.....	25
7.2.1. Criterios de inclusión.....	25
7.2.2. Criterios de exclusión.....	25
7.3. Variables del estudio.....	26
7.4. Procedimientos.....	28
7.4.1. Procedimiento para la cuantificación de glicina por UPLC.....	29
7.4.1.1. Reactivos.....	29
7.4.1.2. Equipo y condiciones.....	29
7.4.1.3. Preparación de estándares y controles de calidad.....	30

7.4.1.4. Preparación de las muestras.....	30
7.5. Análisis estadístico.....	30
8. Resultados.....	32
9. Discusión.....	36
10. Conclusiones.....	38
11. Propuestas.....	39
12. Anexos.....	40
13. Referencias.....	41

Índice de cuadros

Cuadro 1. Valores de corte de glucosa en las PTGO de 75g, 50g y 100g para el diagnóstico de diabetes gestacional.

Cuadro 2. Operacionalización de variables

Cuadro 3. Características antropométricas y bioquímicas de las madres

Cuadro 4. Características antropométricas y bioquímicas de los recién nacidos

Índice de figuras

Figura 1.- Metabolismo de un carbono

Figura 2.- Adenilación de la metionina

Figura 3.- Reacción de transferencia de metilo dependiente de SAM

Figura 4.- Remetilación de la homocisteína

Figura 5.- Estructura de la glicina.

Figura 6.- Esquema de la ionización por electrospray (ESI)

Figura 7.- Esquema del cuadrupolo

Figura 8.- Esquema del triple cuadrupolo

Figura 9.- Correlación entre el peso del recién nacido y la concentración de glicina de su madre

Figura 10.- Correlación entre la talla del recién nacido y la concentración de glicina de su madre

Figura 11.- Correlación entre el perímetro craneal del recién nacido y la concentración de glicina de su madre

Abreviaturas

5,10-CH₂THF – 5,10-metiltetrahidrofolato
5-CH₃THF – 5-metilentetrahidrofolato
ADA – Asociación Americana de Diabetes
ALT – Alanina transaminasa
AST – Aspartato transaminasa
DC – Corriente directa
DG – Diabetes gestacional
DHF – Dihidrofolato
DMT2 – Diabetes mellitus tipo 2
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ESI – Electrospray
EWAS – Estudio de asociación del epigenoma completo
FAD – Flavín adenín dinucleótido
GWAS – Estudio de asociación del genoma completo
HILIC – Cromatografía líquida por interacción hidrofóbica
HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución
IGF2 – Factor de crecimiento de tipo insulínico 2
MAT – Metionina adenosiltransferasa
M-DG – Madres con diabetes gestacional
M-SD – Madres sin diabetes gestacional
MTHFR – Metilentetrahidrofolato reductasa
m/z – Radio masa a carga
NAD⁺ – Nicotinamina adenina dinucleótido
PTGO – Prueba de tolerancia oral a la glucosa
RF – Radiofrecuencia
RNA – Ácido ribonucleico
RN-DG – Recién nacidos de madres con diabetes gestacional
RN-SD – Recién nacidos de madres sin diabetes gestacional
SAH – S-adenosil-I-homocisteina
SAM – S-adenosil-I-metionina
SHMT – Serina hidroximetiltransferasa
THF – Tetrahidrofolato
UPLC – Cromatografía líquida de ultra alta resolución

1. Resumen

En la diabetes gestacional (DG), a pesar de que los síntomas desaparecen y la mujer ya no presenta resistencia a la insulina después de unas semanas posteriores al parto, esta deja su huella e incrementa de 3 a 17 veces más el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en los próximos 5 a 10 años, pero no solo afecta a la madre, si no también se ha encontrado que al recién nacidos lo predispone a desarrollar obesidad y otras enfermedades metabólicas. En la última década se ha tratado de investigar cual es el posible mecanismo por lo cual esto ocurre, a pesar de que todavía no está del todo claro, una gran parte de los estudios se han centrado en el estado nutricional de la madre. El objetivo de este estudio fue comparar la concentración de glicina en recién nacidos de mujeres con DG (RN-DG) contra aquellos de madres sin DG (RN-SD), entre las madres con DG (M-DG) contra las que no cursaron con DG (M-SD) e identificar la correlación entre la concentración de glicina de las madres y las medidas antropométricas de los recién nacidos. Se cuantificó la concentración de glicina de 58 M-DG, 70 M-SD, 60 RN-DG y 76 RN-SD por medio de la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC). La media de la concentración de glicina en el grupo RN-SD fue de 0.91 $\mu\text{g/mL}$ y de 0.85 $\mu\text{g/mL}$ para el grupo RN-DG ($p=0.132$). En el grupo M-SD la media de la concentración de glicina fue de 0.84 $\mu\text{g/mL}$ y de 1.65 $\mu\text{g/mL}$ para las M-DG ($p=0.001$). Las correlaciones de la concentración de la glicina materna con el peso, talla y perímetro craneal del recién nacido fueron $r=0.086$, $p=0.349$; $r=0.135$, $p=0.138$; $r=0.107$, $p=0.240$; respectivamente. No se conoce del todo el mecanismo por el cual la concentración de glicina se altera entre las madres y porque es igual en entre los recién nacidos. Factores como el tratamiento de la DG, la etnia y el método por el cual se cuantificó la glicina, pueden modificar los resultados en diferentes estudios. En conclusión, se observó que la concentración de glicina fue mayor en las mujeres con DG en comparación con las mujeres sin DG. No hubo diferencia en la concentración de glicina entre los recién nacidos de madres con DG y los recién nacidos de madres sin DG. La concentración de glicina de la madre no se relacionó con la somatometría del recién nacido.

2. Introducción

La diabetes gestacional (DG) es definida por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) como la diabetes que es diagnosticada por primera vez en el segundo o tercer trimestre del embarazo y que claramente no es diabetes mellitus tipo 1 ni tipo 2 preexistente. En esta condición metabólica, el exceso de glucosa provocará que el páncreas del embrión produzca más insulina para eliminar dicho exceso. Se ha observado en diversos estudios que los hijos de madres que cursaron con DG el embarazo, presentan un mayor riesgo de desarrollar obesidad, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) entre otras enfermedades cuando estos sean adultos.

En las últimas décadas ha incrementado la investigación del genoma y su relación con diversas enfermedades complejas, las cuales son el resultado de la interacción del genoma y el medio ambiente, como la DMT2, así como para la DG. Diversos estudios destacan la importancia de la dieta durante el embarazo en relación con las modificaciones epigenéticas, como la metilación de la citosina a 5-metilcitosina, debido a que, si esta modificación se realiza en sitios cercanos a los promotores, los factores de transcripción no se podrán unir al sitio y eso resultará en una disminución de la tasa de la transcripción, por el contrario, si existe una hipometilación, los factores de transcripción se unirán a la región promotora, lo cual promoverá la transcripción.

Algunos nutrientes de la dieta como el ácido fólico, la betaína, la colina, la glicina, vitamina B₂, B₆ y B₁₂, están involucrados en el metabolismo de un carbono, el cual involucra la transformación de la homocisteína en metionina, que posteriormente se convierte en S-adenosilmetionina (SAM), esta molécula finalmente dona el grupo metilo a una gran diversidad de moléculas, como la citosina, formando 5-metilcitosina.

Durante las diferentes etapas de la vida los patrones de metilación del ácido desoxirribonucleico (DNA) se modifican, en especial en la embriogénesis, ya que, durante la fecundación la mayoría de las modificaciones epigenómicas somáticas establecidas se eliminan y posteriormente estas marcas epigenéticas se reprograman. Durante este proceso, el DNA es susceptible a modificaciones epigenéticas *de novo*, donde factores ambientales como el estado nutricional puede aumentar y/o disminuir la metilación en sitios CpG (Región del DNA donde en la secuencia de nucleótidos una

citosa precede a una guanina), lo puede predisponer al desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta, como lo son los eventos cardiovasculares, resistencia a la insulina, obesidad, entre otras enfermedades.

Como se menciona previamente, se ha demostrado que los micronutrientes de la dieta, especialmente aquellos involucrados en el metabolismo de un carbono, desarrollan un papel importante en la metilación de diversos intermediarios bioquímicos, como lo es el DNA. La alteración de la metilación del DNA provoca la desregulación de la transcripción de los genes. Por lo cual, si ocurriera una hipometilación o hipermetilación en un gen involucrado en el metabolismo y homeostasis de la glucosa y/o lípidos, esto generaría una marca epigenética en el recién nacido, la cual, en la edad adulta, podría predisponerlo a desarrollar síndrome metabólico entre otras enfermedades cardiovasculares. Debido a que la glicina está involucrada en diferentes pasos del metabolismo de un carbono, y a que esta se ha encontrado alterada en pacientes con DMT2, la glicina también podría verse alterada en la DG y podría desarrollar un papel importante en cuanto a la regulación epigenética. Es por esto que se propuso cuantificar la concentración de glicina en el binomio madre-recién nacido e identificar la correlación entre la somatometría del recién nacido y la concentración de glicina de la madre.

3. Marco teórico

3.1 Diabetes gestacional

La diabetes, según ADA, es un grupo de enfermedades caracterizadas por un alto nivel de glucosa, resultado de defectos en la capacidad del cuerpo para producir o utilizar insulina (1).

La DG es definida por la ADA la diabetes que es diagnosticada por primera vez en el segundo o tercer trimestre del embarazo y que claramente no es diabetes mellitus tipo 1 ni tipo 2 preexistente. El diagnóstico se realiza si la mujer se encuentra en riesgo de desarrollar DG, es decir, si tiene factores tales como la obesidad, glucosuria o un fuerte historial familiar de diabetes, entre la semana 24 y 28 de la gestación. El diagnóstico se realiza mediante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTGO) de uno o dos pasos. La prueba de un paso consiste en dar una carga de 75 g de glucosa de forma oral y medir la glucosa en ayuno, a una hora y a las 2 horas de la ingesta. El diagnóstico es positivo si alguno de los valores es superior a los límites reportados para la prueba de 75 g (Cuadro 1). La prueba de 2 pasos consiste en realizar una PTGO de 50 g y medir la glucosa en ayuno, a la hora y a las 2 horas, si algún punto excede a los reportados en la tabla 1, se procede a realizar una PTGO de 100 g y medir la glucosa en ayuno, a la hora y a las 2 horas, donde un diagnóstico positivo deberá de superar 2 puntos de los reportados en el cuadro 1 (1).

Se sabe que los recién nacidos cuyas madres cursaron con DG durante el embarazo, tienen un riesgo mayor de desarrollar en la vida adulta, enfermedades metabólicas como la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, enfermedades cardiovasculares. Uno de los fenómenos asociados a un embarazo con DG es la macrosomía fetal, es decir, que el neonato tenga un mayor peso, talla y perímetro craneal, a su vez, el hecho de nacer con macrosomía ha sido asociado como un riesgo para desarrollar las mismas enfermedades metabólicas (2,3).

El mecanismo por el cual el feto desarrolla macrosomía no es del todo claro, pero estudios en los últimos años han señalado que puede tener un trasfondo genético, en especial el aumento de factores de crecimiento como lo es el factor de crecimiento de tipo insulínico 2 (IGF2) entre otros genes alterados. En esta alteración puede suceder un desbalance en la regulación epigenética, donde la metilación del DNA este

alterada y a su vez, esto puede deberse en una alteración en el metabolismo de un carbono (4,5).

Cuadro 1. Valores de corte de glucosa en las PTGO de 75g, 50g y 100g para el diagnóstico de diabetes gestacional. Asociación Americana de Diabetes 2018.

	75g PTGO	50g PTGO	100g PTGO
	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Ayuno	≥ 92	-----	≥ 95
1 Hora	≥ 180	≥ 130	≥ 180
2 Horas	≥ 150	-----	≥ 155
3 Horas	-----	-----	≥ 140

3.2 Metabolismo de un carbono

El metabolismo de un carbono es parte del metabolismo de los folatos, consta de un grupo de reacciones donde se transfieren unidades de un carbono y desarrollan diversas funciones fisiológicas, como lo es la homeostasis de aminoácidos (glicina, serina y metionina), mantenimiento epigenético, remetilación de la homocisteína y el mantenimiento del equilibrio redox (figura 1). Asimismo, el metabolismo de un carbono es catalizado por varias enzimas en presencia de micronutrientes dietéticos, que incluyen folato, colina, betaína y vitaminas del grupo B (B₂, B₆, B₁₂). Por esta razón, el estado nutricional, particularmente la ingesta de la glicina es de interés para investigar determinar el papel de este metabolito en la diabetes gestacional, ya que participa en diferentes pasos de este metabolismo (6,7).

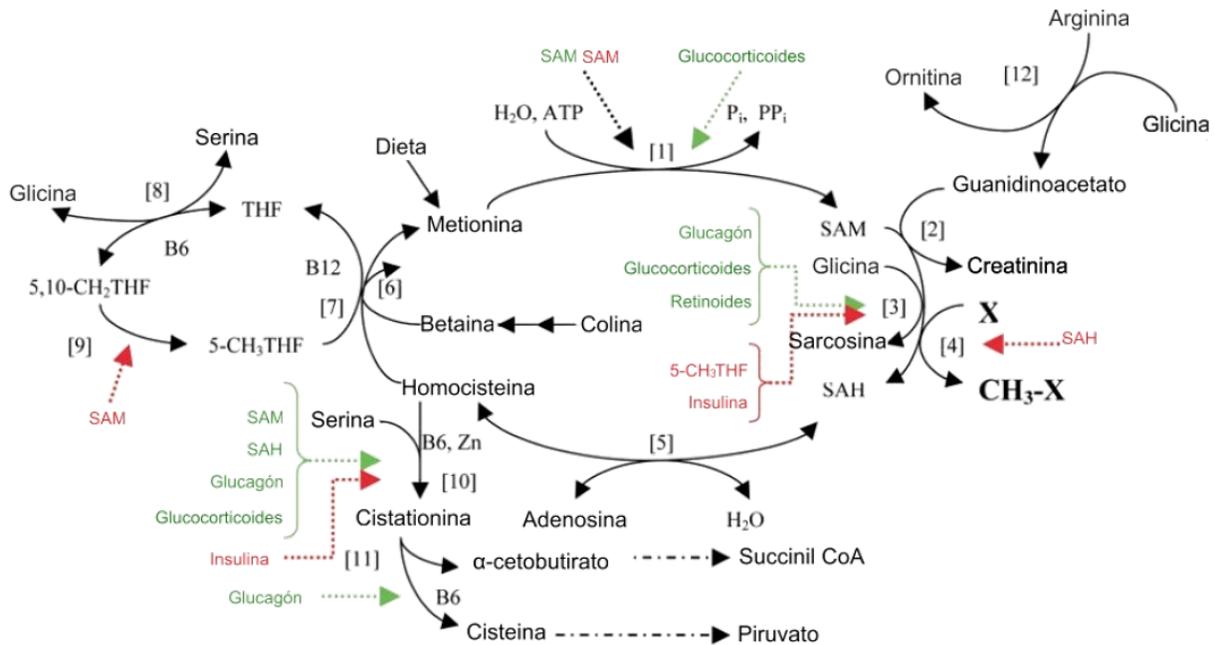


Figura 1. Metabolismo de un carbono. Las líneas verdes punteadas representan reguladores que incrementan las reacciones indicadas y las líneas rojas punteadas representan reguladores que disminuyen la actividad de las reacciones indicadas. [1] MAT: MATIII son activados y MATI es inhibido por SAM; [2] guanidinoacetato metiltransferasa; [3] GNMT; [4] Reacción de metiltransferasa general mostrada en la figura 7 (donde X representa al sustrato); [5] SAH hidrolasa; [6] BHMT; [7] Metionina sintasa; [8] Serina hidroximetiltransferasa; [9] MTHFR; [10] Cistationina β-sintasa; [11] Cistationina γ-liasa [12] L-arginina/glicina amidinotransferas. Modificado de: Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *hmg*. 2005;14(1):R139-R147.

La SAM es una de las moléculas de mayor relevancia en el metabolismo de un carbono, es el principal donador bioquímico del grupo metilo debido a que está asociado con varias metiltransferasas en diversos procesos. (6) La función de donar un grupo metilo se debe a la adenilación de la metionina (Figura 2), que convierte el tiometilo inactivo a un grupo sulfonio activo. La enzima que cataliza esta reacción es la metionina adenosiltransferasa (MAT) (6,7).

El DNA, ácido ribonucleico (RNA), proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos son sustratos para las reacciones de transferencia de metilo dependiente de SAM. Los productos de la reacción de metilación por SAM (Figura 3) son el sustrato metilado y S-adenosilhomocisteína (SAH) (8).

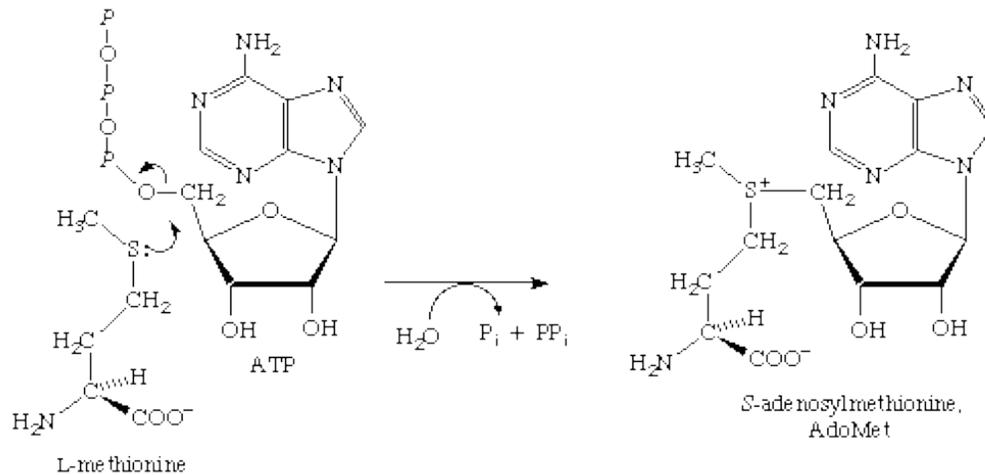


Figura 2. Adenilación de la metionina. La figura muestra la reacción catalizada por la metionina adenosiltransferasa (MAT), donde una molécula de adenosina trifosfato, dona su grupo adenosilo a la metionina para formar SAM. Recuperado de: <http://www.sbc.s.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/single/2516.html>. [Consultado el 14-03-2018.]

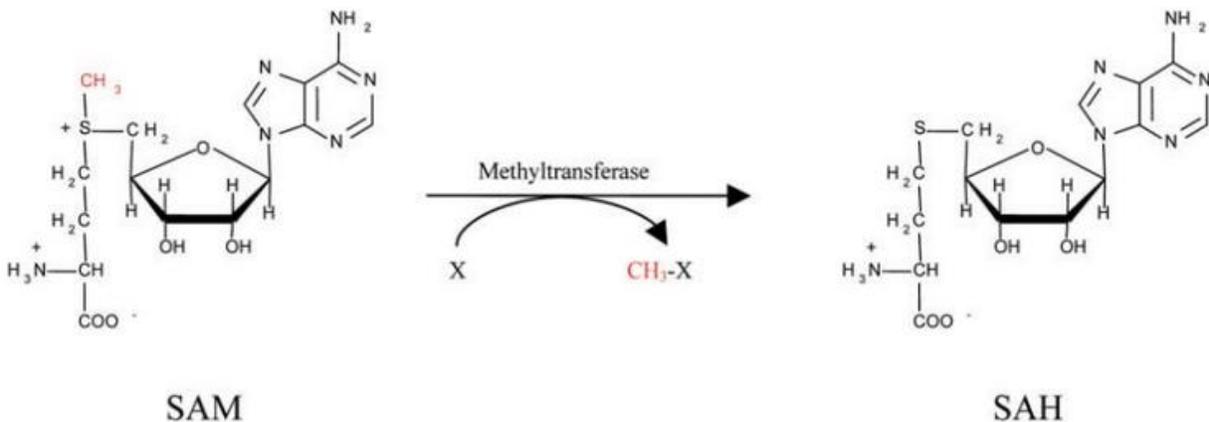


Figura 3. Reacción de transferencia de metilo dependiente de SAM. La figura muestra la reacción catalizada por una metiltransferasa de un aceptor de metilo X con el donador del grupo metilo, SAM y los productos SAH y el sustrato metilado CH₃-X. Recuperado de: Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *hmg*. 2005;14(1):R139--R47.)

La SAH está favorecida en equilibrio con adenosina y Hcy catalizado por la SAH hidrolasa, e inhibe la actividad de la mayoría de las metiltransferasas dependientes de SAM (8,9). La homocisteína se obtiene del metabolismo de la metionina. Dos procesos se encargan de eliminar la Hcy: remetilación (figura 3) y transulfuración. La remetilación de Hcy es llevada a cabo por 2 diferentes reacciones, una es catalizada por la metionina sintasa con el cofactor cobalamina (B12) y 5-metilentetrahidrofolato (5-CH₃THF) el cual dona un grupo metilo a la Hcy dando como productos tetrahidrofolato (THF) y metionina. La otra reacción es catalizada por la betaína-homocisteína

metiltransferasa, la cual dona un grupo metilo de la betaína a la Hcy, los productos de esta reacción son la dimetilglicina y metionina (Figura 4) (8,10,11).

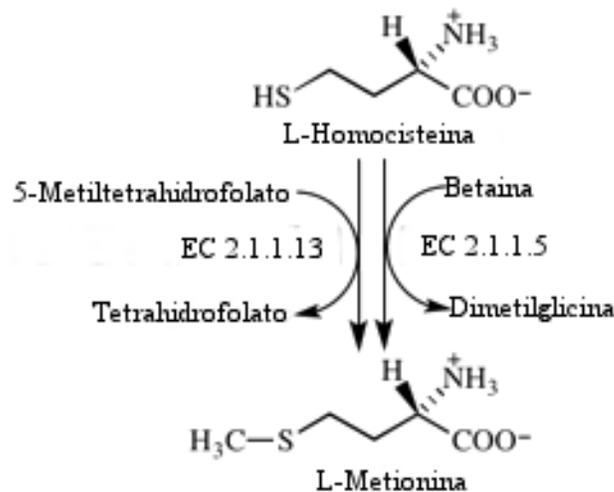


Figura 4. Remetilación de la homocisteína. Donde la primera vía involucra a la metionina sintasa, la cual cataliza la donación del grupo metilo por parte de la 5-metiltetrahidrofolato, dando como productos tetrahidrofolato y metionina. La segunda vía involucra la reacción catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa donde la betaína es la donadora de metilo, dando como productos dimetilglicina y metionina. Recuperado de: <http://www.sbc.s.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/AminoAcid/Met.html>. [Consultado el 14-03-2018].

3.2.1 Metabolitos involucrados en el metabolismo de un carbono y su importancia.

3.2.1.1 Folatos

Es uno de los grupos de micronutrientes más estudiados, todos ellos derivan del ácido fólico, el cual se reduce a dihidrofolato (DHF) y posteriormente a THF, sirviendo como donador de un carbono en la formación de 5-CH₃THF, el cual dona su grupo metilo a la homocisteína para convertirla en metionina. Las vitaminas del complejo B proveen el soporte enzimático necesario para estas transformaciones y de esta forma el folato de la dieta contribuye a repletar la SAM celular, por esta razón, la suplementación de folatos ha sido generalmente asociada con un incremento en la metilación de DNA y viceversa para la restricción de folatos (11-17).

3.2.1.2 Colina y Betaína

La colina es un donador indirecto de un grupo metilo en el metabolismo de un carbono, donde la colina de la dieta se oxida a betaína. La betaína entonces contribuye a la homeostasis de la de la metionina a través de la donación de un grupo metilo a la homocisteína (11,12,18-20).

3.2.1.3 Vitaminas B₂, B₆ y B₁₂

Su importancia reside en su actividad como catalizadores del metabolismo de un-carbono y del folato, la vitamina B₆ sirve como una coenzima para la serina hidroximetiltransferasa, enzima necesaria para convertir el THF a 5,10-metiltetrahidrofolato (5,10-CH₂THF). La riboflavina o vitamina B₂, es un precursor para los flavín adenín dinucleótido (FAD), también es un cofactor para metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima responsable en la reducción de 5,10-CH₂THF a 5,10-CH₃THF. La vitamina B₁₂ es la coenzima de la metionina sintasa, la cual cataliza la reacción de la Hcy a metionina (11,21-24).

3.2.1.4 Metionina

Es un aminoácido esencial, el cual es continuamente regenerado a partir de la homocisteína en el metabolismo de un carbono y sirve como precursor para generar SAM (11,25,26).

3.2.2 Glicina, propiedades generales y su importancia metabólica

Es el aminoácido más pequeño (figura 5) y el único no quiral de los 20 aminoácidos que forman a las proteínas, su peso molecular es de 75.07 g/mol. Se clasifica como un aminoácido no esencial en la dieta y es biosintetizada en el cuerpo a partir de glioxilato, serina, treonina y sarcosina. La glicina es degradada en 3 vías, la vía predominante en animales y plantas es un sistema enzimático denominado sistema de escisión de glicina, donde la glicina con el THF y nicotinamina adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) reaccionan y dan como productos de esta reacción dióxido de carbono, amonio y 5-10-CH₂THF. En la segunda vía, la glicina es degradada en 2 pasos, en el primero la glicina se transforma en serina por la serina hidroximetil

transferasa. Posteriormente la serina se convierte en piruvato. En la tercera vía, la glicina es convertida a glioxilato por la D-aminoácido oxidasa, el glioxilato se oxida por la lactato deshidrogenasa a oxalato. Su vida media en el cuerpo varía de 0.5 a 4 horas dependiendo de la dosis. (27-31).

Dentro de sus funciones fisiológicas es uno de los 20 aminoácidos involucrados en la síntesis de proteínas, aunque las proteínas lo utilizan muy poco, una de las proteínas que más lo utiliza en su estructura es la colágena, la cual contiene aproximadamente un 35% glicina ya que ayuda a la formación y estabilización de la estructura de la triple hélice de la colágena, por lo cual, a falta de glicina, el colágeno es deficiente y predispuesto a degradarse y calcificarse, lo cual puede explicar el desarrollo de la calcificación de la media arterial y un mayor riesgo cardiovascular asociado con diabetes mellitus. Está involucrada en varias vías metabólicas, como lo es la biosíntesis de porfirinas, purinas, serina, glutatión, sales biliares y creatinina. También actúa como neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (27,32-34)

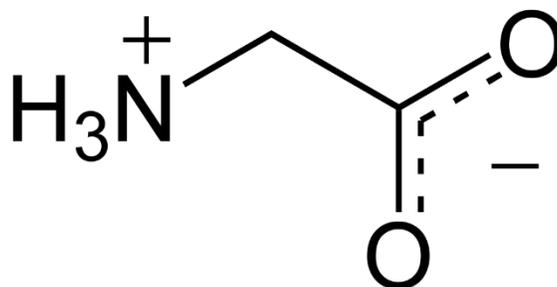


Figura 5.- Estructura de la glicina. Recuperado de: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b8/Glycine-zwitterion-2D-skeletal.svg/1200px-Glycine-zwitterion-2D-skeletal.svg.png>. [Consultado el 02-05-2019]

Varios estudios en la última década han reportado que las personas con DMT2 tienen menores concentraciones de glicina en comparación con las personas sin DMT2. Asimismo, han observado que la concentración de glicina aumenta a medida que la sensibilidad a la insulina aumenta también (35,37). Por esto, diversos estudios han propuesto a la glicina como nuevo biomarcador para predecir el riesgo de diabetes (35-37). y debido al aumento de la glicina a medida que aumenta la resistencia a la glicina, esta puede encontrarse alterada en pacientes con DG.

La glicina tiene un papel indirecto en el metabolismo de un carbono al participar en la homeostasis de los intermediarios de los folatos (12,38). La serina se escinde por acción de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) con THF dando como productos glicina y 5,10-metilentetrahidrofolato, esta reacción se encuentra en equilibrio y puede ser reversible. Dependiendo de la cantidad de glicina o serina disponible, la reacción producirá el aminoácido de menor concentración lo que provocará que el producto intermediario del ciclo de folatos aumente. Lo cual podría aumentar o disminuir la remetilación de la homocisteína a metionina, en cualquiera de los 2 casos se podría disminuir o aumentar la concentración, repercutiendo primordialmente en la metilación del DNA (18,38).

Existen diversos métodos para la cuantificación de este aminoácido, la derivatización y subsecuente cuantificación por cromatografía de fase reversa o espectrometría en región ultravioleta, visible o por fluorescencia dependiendo del agente utilizado para la derivatización. Electroforesis capilar y diversas técnicas de cromatografía desde la cromatografía en capa fina, cromatografía de gases o Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) también han sido utilizadas. (39-41)

No existe un método validado para la cuantificación de glicina, pero de todas las técnicas, la más utilizada es la UPLC acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS), debido a que en esta técnica no es necesario realizar una técnica de derivatización, puede analizar todos los aminoácidos de forma rápida y precisa en comparación a las otras técnicas, en especial por que el UPLC detecta mejor partículas pequeñas (<2µm) en comparación a el HPLC (<3-5µm).

3.3 Cromatografía Líquida

La cromatografía es una técnica de separación de componentes de una mezcla, entre una corriente de fluido en movimiento, llamada fase móvil y una fase estacionaria adyacente. A medida que la fase móvil eluye sobre la fase estacionaria los solutos son separados de acuerdo con la interacción de éstos con las fases, primero se eluyen aquellos que tienen mayor afinidad con la fase móvil y a continuación los que tienen mayor afinidad con la fase estacionaria. Los diferentes tipos de cromatografía líquida pueden clasificarse de diferentes maneras, pero la más habitual es la realizada en base

a la naturaleza de la fase estacionaria, las cuales son la de adsorción, reparto/adsorción, intercambio iónico y de exclusión molecular (42,43).

El mecanismo de retención varía únicamente en el tipo de interacciones que se producen, las cuales son: cromatografía de fase normal donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar y la cromatografía de fase reversa donde la fase estacionaria no es polar y la fase móvil es polar (42,43).

3.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución

El fundamento de la separación es el mismo que en la cromatografía líquida, pero debido a que las partículas en la fase estacionaria son de pequeño diámetro, requiere de diversos dispositivos como lo es un dispositivo de suministro de eluyentes (bombas y dispositivo de mezclado de eluyentes), un dispositivo de inyección, conexiones, un detector y un registrador (42-44)

Entre los detectores acoplados a UPLC más utilizados son espectrómetros de región ultravioleta, visible, arreglo de fotodiodos, índice de refracción, dispersión de luz evaporativa, dispersión de luz multi-ángulo, espectrómetro de masas (MS), conductividad, fluorescencia, quimioluminiscencia, rotación óptica, electroquímica, infrarrojo por transformada de Fourier, entre otros (45,46).

3.4 Espectrometría de masas

Técnica que se basa en la formación de iones en fase gaseosa que pueden ser separados eléctricamente (o magnéticamente) con base en su radio masa a carga (m/z). Su aplicación va desde lo cualitativo hasta lo cuantitativo, estos incluyen identificación de compuestos desconocidos, determinar la composición isotópica de una molécula, determinar la estructura de una partícula. Como técnica analítica posee una sensibilidad mayor con respecto a la mayoría de las técnicas analíticas y una alta especificidad para detectar pesos moleculares, información acerca de los isótopos en una mezcla y cuantificación de analítica presentes en una mezcla (47).

Los equipos de espectrometría poseen 4 componentes principales, fuente de ionización, analizador de masas, detector y analizador de información, los cuales se describen a continuación:

3.4.1. Fuente de ionización.

La reacción más importante en la espectrometría es la conversión de los analitos en iones de fase gaseosa. La ionización por electropray (ESI) es una de las 2 principales técnicas de ionización más usadas. Donde el eluyente de la cromatografía líquida entra a la fuente por una aguja de electropray a un campo eléctrico creado entre el alto voltaje aplicado a la aguja y el electrodo auxiliar formando una celda electrolítica como se muestra en la figura 6. La forma más común para cargar partículas es la adición o sustracción de iones de hidrogeno. La adición de iones de hidrogeno ocurre a un pH bajo y produce moléculas cargadas positivamente $[M + H]^+$. Los iones cargados negativamente $[M + H]^-$ son producidos por la sustracción de iones hidrogeno a un alto pH (48-51).

Cuando se aplica un potencial positivo a la aguja de electropray los iones emergen de la punta formando un cono de Taylor, posteriormente se forman gotas finas cargadas. Un gas nebulizador, nitrógeno (N_2), es usado para asistir el proceso de desolvatación generando gotas en aerosol cargadas. La gota eventualmente se desolvata hasta formar iones de fase gaseosa (50,52,53). Los iones en fase gaseosa del analito continúan a ser atraídos y se desplazan por el electrodo auxiliar o cono (Figura 6) hacia el espectrómetro de masas.

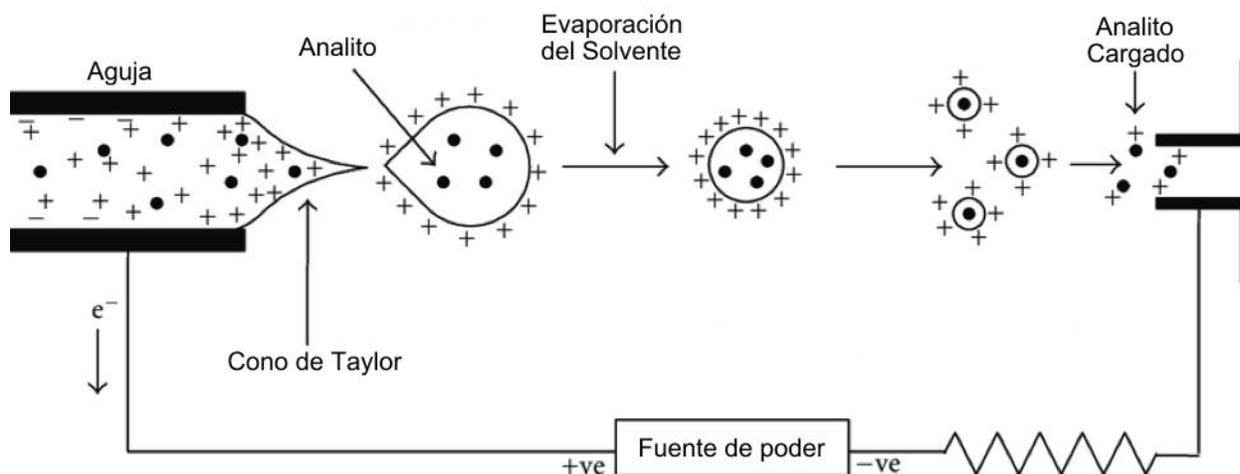


Figura 6.- Esquema de la ionización por electrospray (ESI). Modificado de: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/In_Class_Activities/Biological_Mass_Spectrometry%3A_Proteomics/Instructor%E2%80%99s_Manual/Section_2%3A_Electrospray/Section_2A._Electrospray_and_Quadrupole_Ion_Trap_Instrumentation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/In_Class_Activities/Biological_Mass_Spectrometry%3A_Proteomics/Instructor%E2%80%99s_Manual/Section_2%3A_Electrospray/Section_2A._Electrospray_and_Quadrupole_Ion_Trap_Instrumentation). [Consultado el 15-09-2018]

3.4.2. Analizador de masas.

Es el componente responsable de separar los analitos de acuerdo a su radio m/z . existen 5 tipos de analizadores, tiempo de vuelo, sector magnético, resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier, cuadrupolo y trampa de iones con cuadrupolo. Cada uno de estos detecta los iones de manera diferente, por lo tanto, se escoge el analizador de masas más adecuado dependiendo del tipo de análisis (50,52-54).

3.4.2.1. Cuadrupolo

Es el analizador de masas más usado debido a su bajo costo y facilidad de automatizar, consiste en cuatro superficies paralelas, usualmente en forma de un tubo cilíndrico, compuestos de molibdeno o cerámica chapada en oro como se muestra en la figura 7 (50). Los polos opuestos están electrónicamente conectados donde las fuentes de radiofrecuencia (RF) y la fuente de alimentación de corriente directa (DC) crean un campo eléctrico de dos dimensiones el cual afecta la trayectoria de los iones y la detección de iones. La separación de iones se basa estrictamente en el radio m/z de los iones a analizar. Un radio RF/DC constante es mantenido mientras la amplitud de la RF y los potenciales de la DC se alternan. permitiendo que solo los iones con

trayectorias estables recorran el eje Z en dirección al detector (55). El espectro de masa resultante generado cuando el radio RF/DC es alternado se refiere al cromatograma total del ion.

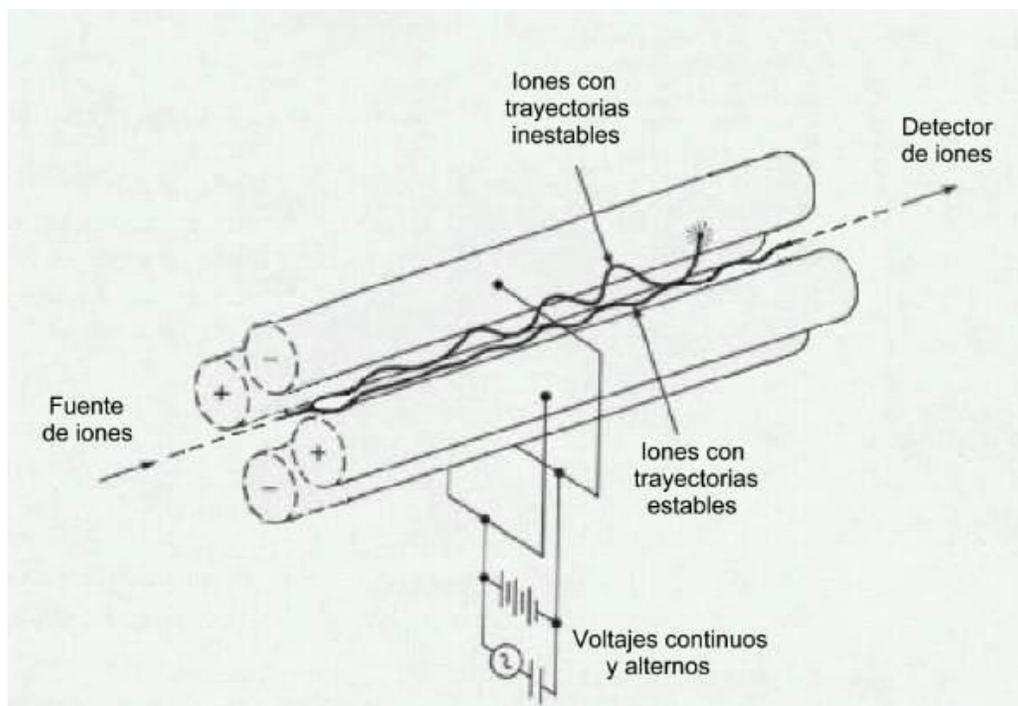


Figura 7.- Esquema del cuadrupolo. Recuperado de: <https://www.um.es/LEQ/Atmosferas/Ch-V-1/C51s8p1.html>. [Consultado el 15-09-2018]

3.4.2.2. Triple cuadrupolo

Usa tres cuadrupolos en serie, donde el primero y el tercer cuadrupolo (Q1 y Q3) funcionan como cuadrupolos de transmisión, mientras el segundo (Q2) sirve usualmente como una celda de coalicón donde los iones se fragmentan, Q2 opera únicamente por RF de forma que transmite todos los iones al Q3 donde los iones producidos son analizados y transmitidos al detector como se ilustra en la figura 8 (48-56).

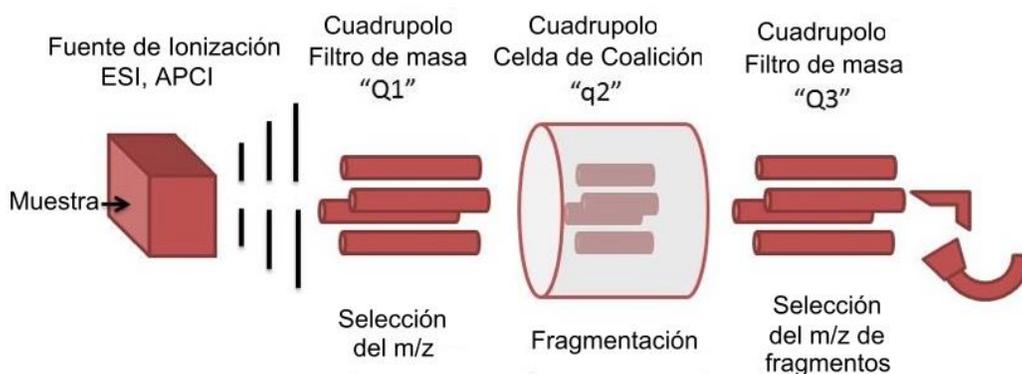


Figura 8.- Esquema de triple cuadrupolo. Modificado de: Saldarriaga NH, López MR, Vergara SJ. Recent Advances for Polycyclic Aromatic Analysis in Airborne Particulate Matter. IntechOpen. 2018. [Consultado el 15-09-2018]

En la técnica MS/MS, el segundo cuadrupolo se usa como celda de coalescencia, se selecciona un radio m/z específico y se transmite a la celda de coalescencia donde un gas inerte, típicamente argón, causa una disociación inducida por coalescencia y los fragmentos generados se escanean en Q3. Existen diferentes métodos de escaneo, el más usado es el monitoreo de reacción seleccionada, donde solo a un radio m/z de un ion se le permite viajar a través de Q1 a Q2 para fragmentarse y solo a un fragmento de ion se le permite alcanzar el detector. Adicionalmente, más de una transición puede ser monitoreado al mismo tiempo, esta técnica es conocida como monitoreo de múltiples reacciones (48,56,57).

4. Planteamiento del problema

Los hábitos de alimentación en nuestra población han cambiado. El sobrepeso, la obesidad y la alimentación modifican los patrones de metilación de genes, debido a la adición de un grupo metilo en el carbono 5' del anillo pirimidínico de la citosina, se modifica la expresión génica y, por tanto, se altera en cantidad la proteína codificada por el gen en el espacio y tiempo, favoreciendo el desarrollo obesidad, enfermedad cardiovascular, DMT2, y DG. Donde la concentración de glicina probablemente este alterando la metilación de la citosina y modificando la expresión génica. La cuantificación de glicina en sangre de cordón umbilical permitirá conocer si existe alguna alteración en la concentración de este metabolito en la DG y si esta alteración tiene relación con las medidas antropométricas del RN al momento del nacimiento.

Pregunta de investigación

¿Existe alguna diferencia en las concentraciones de glicina entre las madres con y sin DG y entre los recién nacidos de madre con y sin DG, y qué relación tiene la concentración de glicina de la materna con la somatometría del recién nacido?

5. Hipótesis

La concentración de glicina entre los recién nacidos será diferente, así como entre el grupo de las madres y estará asociada con la somatometría del recién nacido.

6. Objetivo

Comparar la concentración de glicina entre los recién nacidos de madres con DG y madres sin DG y determinar la concentración de glicina entre las madres con DG y sin DG para identificar la correlación del nivel de glicina con la somatometría del recién nacido.

7. Metodología

7.1 Diseño del estudio

Observacional, prolectivo, transversal y comparativo. Previa aceptación y firma del consentimiento informado (Anexo 1), se incluyeron a recién nacidos hijos de madre con DG y recién nacidos de madres sin diabetes durante el embarazo, diagnosticada de acuerdo con los criterios de la ADA

7.2 Universo de estudio

Las muestras de sangre del cordón umbilical de los recién nacidos, fueron obtenidas de la clínica de Gineco Obstetricia No. 4 del IMSS. Se tomaron 136 muestras de suero de recién nacidos y 128 muestras de madres de acorde a los siguientes criterios:

7.2.1 Criterios de inclusión

- ✓ Recién nacido hijo de madre con DG y madres sin DG
- ✓ Madres con embarazos únicos o múltiples.
- ✓ Madres mayores de 18 años y menores de 40 años de edad.
- ✓ Recién nacidos del género masculino y género femenino.

7.2.2 Criterios exclusión

- Recién nacidos hijos de madres con diabetes tipo 1 o tipo 2, MODY o diabetes secundaria.
- Recién nacido con Apgar menor de 6 al minuto.
- Recién nacidos con brevedad del cordón, en quienes no fue posible obtener la muestra sanguínea.
- Recién nacidos con datos clínicos de sepsis.
- Cualquier otra condición que a juicio del Médico se consideró como riesgo para el recién nacido.
- Embarazadas con historia de enfermedad renal crónica o creatinina sérica mayor a 1.4 mg/dl.

- Embarazadas con enfermedad hepática, insuficiencia cardiaca, arritmia o cardiomiopatía.
- Tabaquismo en el embarazo.
- Embarazadas que cursaron con corioamioititis al momento del nacimiento, o ruptura prematura de membranas.
- Embarazadas que recibieron esteroides 24 horas previas al nacimiento.
- Complicaciones graves durante la atención del trabajo de parto (cetoacidosis diabética, coma, choque hipovolémico que ameritara la administración de concentrado eritrocitario).

7.3 Variables del estudio

- Variable independiente
 - Diabetes gestacional
- Variable dependiente
 - Concentración de glicina, peso, talla y perímetro craneal del recién nacido.

Cuadro 2.- Operacionalización de variables

Variable	Definición	Tipo de Variable	Operacionalización
DG	Cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el embarazo y generalmente se resuelve al término del mismo.	Cualitativa nominal	Si / no
Peso neonatal	Valoración en gramos de la masa corporal del neonato, considerada dentro de la primera hora de vida.	Cuantitativa de razón	Expresado en gramos
Talla neonatal	Estatura de una persona, medida desde la planta del pie hasta el vértice de la cabeza.	Cuantitativa de razón	Expresado en centímetros
Perímetro Craneal neonatal	Medición del perímetro de la cabeza de un niño en su parte más grande, desde la parte por encima de las cejas y orejas y alrededor de la parte posterior de la cabeza	Cuantitativa de razón	Expresado en centímetros
Glicina	Aminoácido no polar constituyente de diversas proteínas, intermediario metabólico en diferentes rutas y desempeña función de neurotransmisor	Cuantitativa de razón	Expresada en µg/mL

7.4 Procedimientos.

En el Hospital de Gineco-Obstetricia No.4 se realizó el reclutamiento a través de una invitación para participar en el estudio. A las que aceptaron, se le dio una cita para evaluar cada caso, así como un número de identificación para seguimiento hasta el final de su embarazo. El reclutamiento se llevó a cabo en el periodo comprendido del 1º de octubre del 2016 al 31 de julio del 2018.

Las pacientes embarazadas con DG o embarazadas sin diabetes, diagnosticadas de acuerdo con los criterios de la ADA (1) que fueron programadas para obtención del producto vía cesárea, previa aceptación y firma del consentimiento informado; al momento de la canalización de la vena antecubital para la aplicación de venoclisis se le tomó una muestra de 3 mL de sangre periférica con EDTA y 4 mL de sangre sin anticoagulante con una jeringa estéril desechable.

Inmediatamente después del nacimiento, una vez que se entregó el recién nacido al médico pediatra, el responsable de obtener la muestra, identificó la vena umbilical del cordón y obtuvo una muestra de sangre de 10 mL en 2 tubos con EDTA, para la cuantificación de la glucosa y glicina, en el recién nacido. Una vez realizada la reanimación neonatal y estabilización del recién nacido, se realizó la somatometría correspondiente del recién nacido la cual incluyó la medición de la longitud corporal supina (realizada sobre una superficie horizontal dura, con cinta métrica milimétrica desde la corona hasta el talón), peso sin ropa (expresado en gramos en báscula electrónica), y perímetro cefálico. A continuación, se determinó la edad gestacional según sistema de valoración de Capurro y finalmente se clasificó como recién nacido con peso adecuado, peso bajo o peso alto para edad gestacional según tablas de Lubchenco.

Los parámetros bioquímicos se determinaron con el equipo ILab 300 de Instrumentation Laboratory (MA, USA).

7.4.1. Procedimiento para la cuantificación de glicina por UPLC

7.4.1.1. Reactivos

- Glicina (Sigma-Aldrich)
- Glicina-d5 98% atom D (Sigma-Aldrich)
- Formiato de amonio
- Acetonitrilo grado MS/MS
- Agua grado MS/MS
- Metanol grado MS/MS
- Gas Argón (Ultra puro, >99.9%)
- Gas Nitrógeno (Ultra puro, >99.9%)
- Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH=7.4

7.4.1.2. Equipo y condiciones

Se realizó la cromatografía líquida con un sistema Waters Acquity UPLC Class I acoplado a Xevo TQS. La separación cromatográfica por medio de una cromatografía líquida por interacción hidrofóbica (HILIC) por medio de una columna analítica Waters Acquity BEH HILIC 1.7 1,7 μm . 2,1 x 100 mm, una precolumna Waters Acquity BEH HILIC 1,7 μm . 2,1 x 5 mm. Conectado a un filtro en línea 0.22 μm mantenido a 10°C. El flujo fue de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ de una mezcla de solvente A (10mM formato de amonio, pH 3.5), y solvente B (acetonitrilo). El gradiente de la fase móvil consistió en 15% del solvente A y 85% del solvente B por 0-1.0 minutos, seguido por un gradiente lineal de 40% B 1.0-2.5 minutos, manteniendo 40% B por 0,5 minutos, y se colocó a las condiciones iniciales de 3.0 a 5.0 minutos. El tiempo de corrida total fue de 5 minutos. El auto-muestreador se mantuvo a 10°C.

La detección por MS/MS se realizó en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQS equipado con una fuente de ionización electrospray. Los analitos se detectaron por el modo de ionización positiva, El voltaje del capilar fue ajustado a 3500V y el de cono a 15V, la temperatura de desolvatación en 350°C y su flujo a 350L/h. El flujo de gas de cono se ajustó a 50L/h, el gas de coalición se ajustó a 1.5 mTorr.

Las transiciones iónicas fueron:

➤ Glicina: m/z 76.05-----→30.00

Los datos fueron capturados y procesados por medio del software MassLynx 4.1 de Waters.

7.4.1.3. Preparación de estándares y controles de calidad

Se disolvió el estándar de glicina y el estándar interno glicina-d5 en metanol:agua (50:50.v:v) para obtener una solución madre 1.0mg/mL. Posteriormente las soluciones madre se disolvieron con agua para preparar soluciones madre intermedias, de las cuales se prepararon estándares de calibración y controles de calidad.

A partir de las soluciones madre intermedias se diluyeron con una solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS, pH=7.4) para preparar estándares de calibración a 0.200, 0.300, 0.625, 1.250, 2.500 y 5.00 $\mu\text{g/mL}$ para cada analito. Se realizaron tres muestras de control de calidad [Control de baja calidad (LQC), control de media calidad (MQC) y control de alta calidad (HQC)] a partir de una solución madre 1.0 mg/mL que se diluyó con el PBS a concentraciones de 0.400, 1.00 y 4.00 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones stock, estándares y controles de calidad se almacenaron a -80°C .

7.4.1.4 Preparación de las muestras.

Se preparó una solución de estándares internos la cual contenía 0.500 $\mu\text{g/mL}$ de d5-glicina en metanol. La precipitación de las proteínas se llevó a cabo al agregar 200 μL de la solución de estándares internos a 50 μL de los estándares de calibración, controles de calidad y las muestras, posteriormente se mezcló por vortex y se centrifugó a 10,000 x g por 5 minutos, 40 μL del sobrenadante se removieron y se diluyeron con 200 μL de acetonitrilo:metanol (75:25, v/v) y se mezclaron por vortex. Una alícuota de 10 μL se inyectó al sistema de UPLC-MS/MS.

7.5 Análisis estadístico

Los datos antropométricos y bioquímicos se expresaron como medias y desviaciones estandar. La diferencia entre los niveles de las variables, entre los recién nacidos con y sin antecedentes de diabetes, se analizaron con la prueba “t” de Student o U Mann Whitney de acuerdo a la distribución de los datos, la correlación de los parámetros bioquímicos con la somatometría de los recién nacidos se analizó con la prueba correlación de Pearson. Todas las pruebas estadísticas se fijaron a un nivel de significancia del 95% y se realizaron con el programa SPSS versión 25 para Windows (SPSS Inc. Chicago II)

8. Resultados

Características de la población de estudio

Se obtuvieron un total de 128 madres, de las cuales, 70 no cursaron con DG (M-SD) y las otras 58 si lo hicieron (M-DG). Dentro del grupo existieron 8 embarazos gemelares, 6 de ellos en las madres sin DG dando un total de 76 neonatos (RN-SD) y 2 de las madres con DG para un total de 60 recién nacidos (RN-DG). Para cada individuo del estudio se le registraron sus medidas somatométricas y se cuantificaron algunos parámetros bioquímicos, como el perfil de lípidos, glucosa, transaminasas, ácido fólico, vitamina B12, los cuales se presentan en el cuadro 3 para las madres y en el cuadro 4 para recién nacidos.

El perfil de lípidos (C-HDL, C-LDL y TG), glucosa y la hemoglobina glucosilada se integraron en los resultados, debido a que estos parámetros se encuentran relacionados con la obesidad, síndrome metabólico y con la diabetes. Las transaminasas (ALT, AST) se reportaron para descartar un daño hepático.

Cuadro 3. Características antropométricas y bioquímicas de las madres.

	Madres (n=128)		Valor de <i>P</i>
	SD (n=70)	DG (n=58)	
Edad (Años)	29.4 ±5.13	32.4 ±5.81	*0.004
IMC Pregestacional (Kg)	26.55 ±3.02	26.29 ±2.50	0.677
HbA1 (%)	5.17 ±0.34	5.60 ±0.41	*0.001
Glucosa (mg/dL)	77.37 ±15.81	73.68 ±16.95	0.111
C-HDL (mg/dL)	49.54 ±13.99	50.29 ±14.24	0.781
C-LDL (mg/dL)	133.41 ±39.81	128.13 ±32.09	0.458
TG (mg/dL)	257.59 ±87.49	289.31 ±76.64	*0.019
ALT (U/L)	10.77 ±16.16	11.76 ±6.00	*0.005
AST (U/L)	16.97 ±9.90	19.00 ±6.14	*0.002
Glicina (µg/mL)	0.84 ±0.30	1.65 ±1.44	*0.001

IMC: Índice de masa corporal; HbA1: Hemoglobina glucosilada; C-HDL Colesterol lipoproteína de alta densidad; C-LDL: Colesterol lipoproteína de baja densidad; TG: Triacilglicéridos; ALT: Alanina transaminasa; AST: Aspartato transaminasa. En el cuadro se presentan los datos en medias y desviaciones estándar. * Indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

Cuadro 4. Características antropométricas y bioquímicas de los recién nacidos.

	Recién Nacidos (n=136)		Valor de P
	SD (n=76)	DG (n=60)	
Peso (Kg)	2.989 ±0.45	3.332 ±0.37	*0.001
Talla (cm)	48.53 ±2.13	49.66 ±1.69	*0.003
PC (cm)	34.50 ±1.37	35.09 ±1.18	*0.007
Glicina (µg/mL)	0.91 ±0.26	0.85 ±0.39	0.132

PC: Perímetro Craneal. En el cuadro se presentan los datos en medias y desviaciones estándar. * Indica que la diferencia es significativa.

El grupo M-DG presentó mayor edad, mayor porcentaje de HbA1, mayor concentración de triacilgliceroles, alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), y glicina, comparado con el grupo M-SD ($P < 0.05$)

En el grupo RN-DG se observó una mayor frecuencia del género masculino, mayor peso, talla y perímetro craneal en comparado con el grupo RN-SD ($p < 0.05$). La concentración de glicina entre los recién nacidos no fue diferente.

Las diferencias entre los grupos fueron calculadas por medio de las pruebas de t-student y U de Mann-Whitney dependiendo de la distribución de los datos, con una significancia del 95%.

No existió correlación entre la concentración de glicina de la madre y el peso del recién nacido, $r=0.086$, $N=122$, $p=0.349$ (ver figura 1); la talla del recién nacido, $r=0.135$, $N=122$, $p=0.138$ (ver figura 2) y el perímetro craneal del recién nacido, $r=0.107$, $N=122$, $p=0.240$ (ver figura 3). La correlación entre las variables fue calculada por medio de la correlación de Pearson.

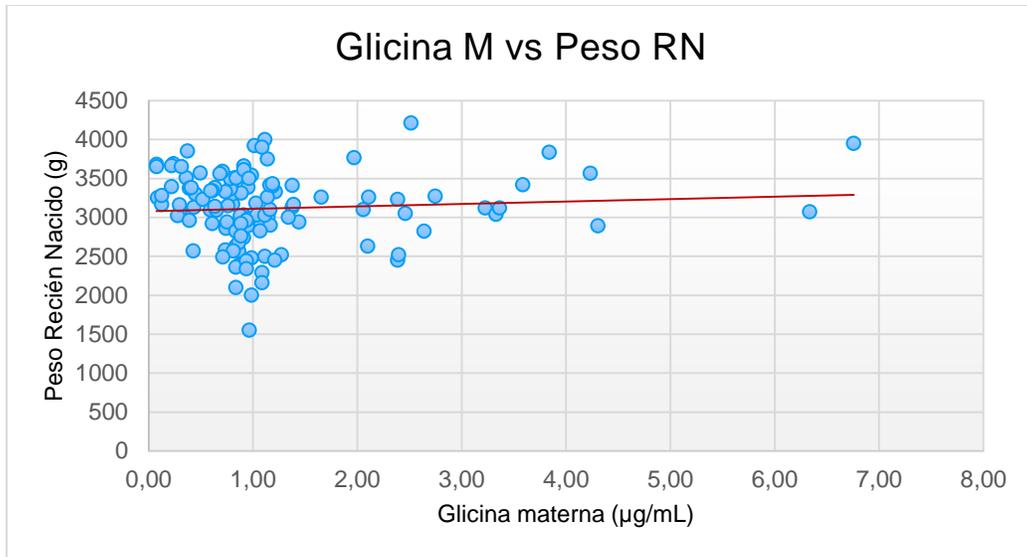


Figura 9. Correlación entre el peso del recién nacido y la concentración de glicina de su madre. $r=0.086$, $p=0.349$

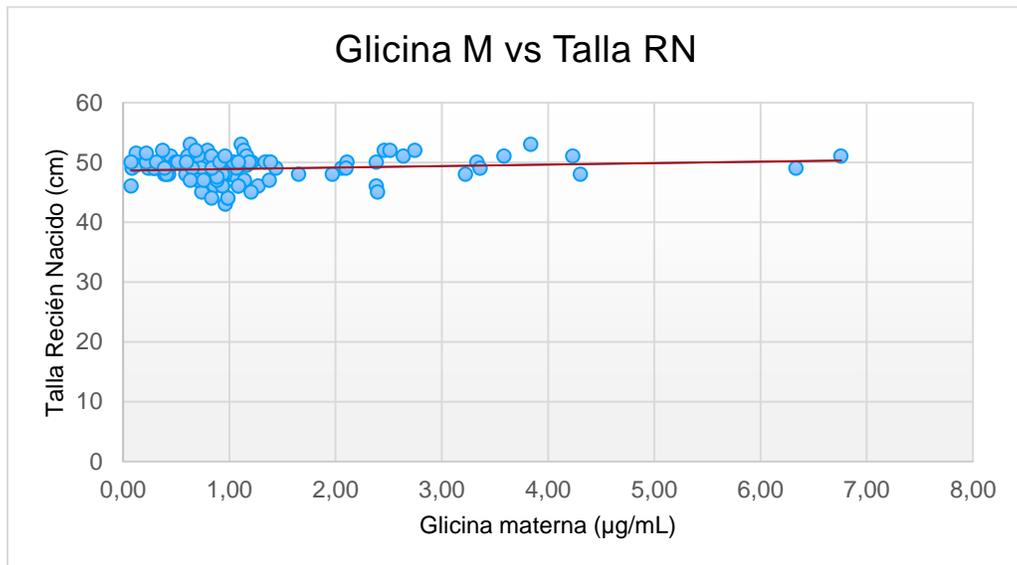


Figura 10. Correlación entre la talla del recién nacido y la concentración de glicina de su madre. $r=0.135$, $p=0.138$

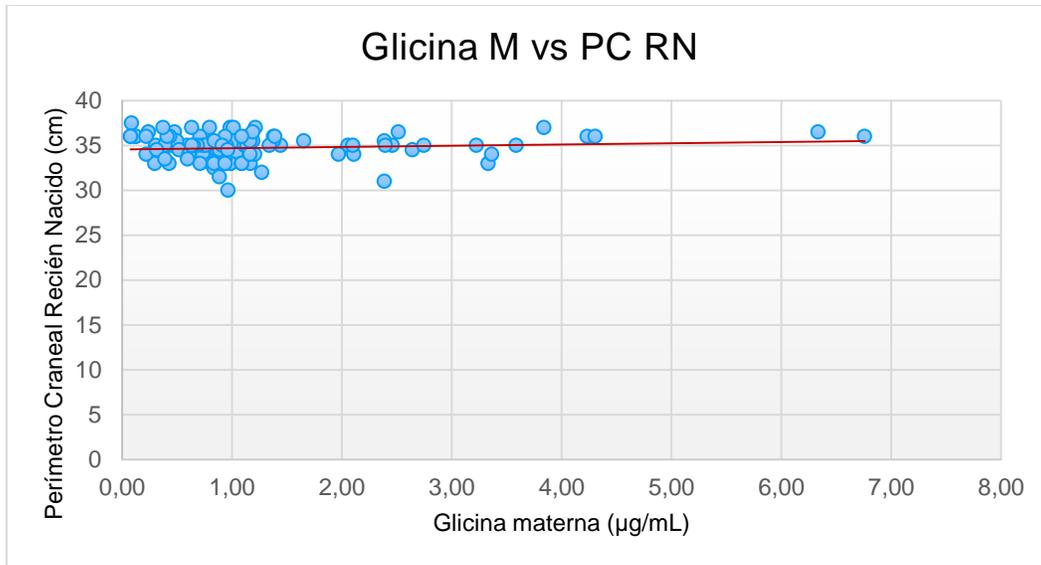


Figura 11. Correlación entre el perímetro craneal del recién nacido y la concentración de glicina de su madre. $r=0.107$, $p=0.240$

9. Discusión

La glicina es un aminoácido el cual participa en varias rutas del metabolismo de un carbono, esta vía metabólica es de suma importancia para la homeostasis de la SAM, principal molécula donadora de metilo y de la SAH. Varios estudios recientes han reportado que el desbalance de esta homeostasis esta correlacionado con una hipometilación o hipermetilación, dependiendo de cómo se alteren las concentraciones de estos metabolitos (7,9,11,12).

Por consecuente, la alteración de la metilación del DNA cerca de regiones promotoras de genes encargados en el metabolismo de lípidos, glucosa o en el desarrollo fetal, repercutirá en la alteración de la transcripción de estos genes. En algunos estudios, se reportó que la nutrición materna está involucrada con el desarrollo y estado de salud del feto, donde se evaluó la ingesta de donadores de metilos (metionina, betaína, colina y folatos), y la suplementación con ácido fólico antes y durante el embarazo en relación a la metilación global del DNA, en las mujeres con una mayor ingesta de los 3 donadores de metilos en el tercer trimestre, se encontró una mayor metilación del DNA (4,5,15).

En un estudio realizado por Su et al, 2016, se identificó una hipometilación del gen *IGF2* y una mayor expresión de éste en los grupos con macrosomía en comparación a los grupos sin macrosomía. Por lo cual es necesario conocer que metabolitos se encuentran alterados en las mujeres embarazadas con DG (4).

En este estudio se encontró que, el grupo M-DG tuvo una mayor concentración de glicina en comparación con el grupo M-SD. Existen pocos estudios donde se comparan las concentraciones de glicina entre embarazadas con DG y aquellas sin DG y los resultados entre estos estudios han sido contradictorios, sólo un estudio reportó un incremento de glicina en las embarazadas con DG en comparación a las embarazadas sin DG (58), lo cual está acorde con los resultados obtenidos en este estudio. Otros estudios han reportado que la glicina disminuye en la DG, la diferencia en los resultados, pudiera depender de la etnia, del tipo de tratamiento (dietario y/o farmacológico) que realice el hospital y del método para determinar la concentración de glicina, debido a que los estudios donde la glicina se encontró disminuida en la DG, utilizaron una derivatización previa al análisis por HPLC, y en el estudio donde la glicina

se encontró aumentada en la DG y en el presente estudio se utilizó un análisis por UPLC sin una derivatización previa (59, 60). En el estudio realizado en 2007 por Pappa et al, concluyen que, debido al incremento de acil coenzima A, la piruvato deshidrogenasa se encuentre inhibida y la glicina se convierta a glucosa (60). Posiblemente la acumulación de acil coenzima A sea un factor determinante para la homeostasis de la glicina y otros aminoácidos glucogénicos.

No existe diferencia significativa entre la concentración de glicina de los recién nacidos de madres con DG y aquellos de madres sin DG, no existen estudios hasta la fecha donde se comparen las concentraciones de glicina entre los recién nacidos de madres con DG y madres sin DG.

Diversos estudios han reportado que la glicina tiene un papel importante en desarrollo fetal, ya que contribuye a la síntesis de DNA, reprogramación epigenética y para la síntesis de colágena y serina. Es por ello que a medida que aumenta el embarazo, el requerimiento de este aminoácido es mayor, así como su utilización (61,62). Otros estudios identificaron que la transferencia de glicina de la madre a el feto se realiza de forma limitada, a comparación de los aminoácidos esenciales como la leucina (63,64), otros trabajos realizados en ovejas, han demostrado que la transferencia de glicina a la circulación fetal ocurre primordialmente en la placenta y que la glicina pasa en poca cantidad de la circulación materna al útero (65,66). Esto sugiere que la glicina sintetizada en la placenta, es la principal fuente de glicina en el recién nacido (64). Probablemente esta sea la razón por la cual la concentración de glicina no es diferente entre los neonatos.

En este estudio no se observó una correlación significativa de la glicina con la somatometría del recién nacido, no existen estudios que reporten una correlación estadísticamente significativa de la concentración de glicina con la somatometría del recién nacido, aunque en algunos estudios recientes, como el de Hsu et al, 2016, se ha identificado que el flujo de glicina de madres adolescentes (16 años) se ve reducido en gran medida a comparación de madres adultas (26 años) sanas. Indicando que el flujo de glicina es dependiente de la edad, y aunque no fue significativo, observaron una disminución de la talla y peso del recién nacido en la madre adolescente en

comparación a los recién nacidos de la madre adulta, debido a la falta de capacidad de la madre adolescente de mantener los niveles de glicina durante el embarazo (67).

10. Conclusiones

- La concentración de glicina fue mayor en las mujeres con DG en comparación con las mujeres sin DG.
- No hubo diferencia en la concentración de glicina entre los recién nacidos de madres con DG y los recién nacidos de madres sin DG.
- La concentración de glicina de la madre no está correlacionada con la somatometría del recién nacido.

11. Propuestas

Realizar estudios longitudinales donde se reporte el metaboloma, enfocado a los aminoácidos y otros micronutrientes que posiblemente afecten la gestación, proporcionando un seguimiento tanto a la madre como al recién nacido y realizar un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) y un estudio de asociación del epigenoma completo (EWAS) o que se analicen los polimorfismos y la regulación epigenética de los principales genes involucrados en la DG, diabetes mellitus tipo 2 y/o síndrome metabólico.

12. Anexos

SIRELCIS

Página 1 de 1



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



01 de febrero del 2017

Ref. 09-B5-61-2800/201700/0256

Dr. Valladares Salgado Adán
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica Siglo XXI (U INVEST MED EN BIOQUIM S XXI)
Nivel Central

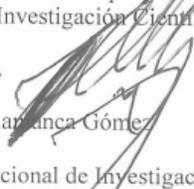
Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Cuantificación de los intermediarios del ciclo de metilación en el binomio madre-recién nacido con glucemia normal y con diabetes gestacional y su relación con la somatometría del recién nacido**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2017-785-006.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,


Dr. Fabio Salazar
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

 SNN/ iah. F-CNIC-2016-140

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "E" de la Unidad de Congressos s/n. Cuernavaca 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext 21210 canise@cis.gub.mx

13. Referencias

1. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017;40(1):S11-S24.
2. Kim C. Gestational diabetes: risks, management, and treatment options. *Int J Womens Health*. 2010;2:339–351.
3. Langer O, Yogev Y, Most O, Xenakis EMJ. Gestational diabetes: The consequences of not treating. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005;192(4):989-97.
4. Su R, Wang C, Feng H, Lin L, Liu X, Wei Y, et al. Alteration in Expression and Methylation of IGF2/H19 in Placenta and Umbilical Cord Blood Are Associated with Macrosomia Exposed to Intrauterine Hyperglycemia. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148399.
5. KC K, Shakya S, Zhang H. Gestational Diabetes Mellitus and Macrosomia: A Literature Review. *Annals of Nutrition Metabolism*. 2015;66(2):14-20.
6. Lim U, Song M-A. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol*. 2012;863:359--76.
7. Friso S, Udali S, De Santis D, Choi S-W. One-carbon metabolism and epigenetics. *Mol Aspects Med*. 2017;54:28-36.
8. Mato JM, Martinez-Chantar MI, Fau - Lu SC, Lu SC. S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Annals of Hepatology*. 2013;12:2665-2681
9. Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG. Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2014;113(4):243-52.
10. Chen NC, Yang F, Capecchi LM, Gu Z, Schafer AI, Durante W, et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *The FASEB Journal*. 2010;24(8):2804-17.
11. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(8):853-9.
12. Liu T, Li J, Xu F, Wang M, Ding S, Xu H, et al. Comprehensive analysis of serum metabolites in gestational diabetes mellitus by UPLC/Q-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(4):1125-35.
13. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv Nutr*. 2012;3(1):21-38.
14. Ly A, Hoyt L, Crowell J, Kim Y-I. Folate and DNA Methylation. Mary Ann Liebert, Inc, publishers. 2012.
15. Pauwels S, Duca RC, Devlieger R, Freson K, Straetmans D, Van Herck E, et al. Maternal Methyl-Group Donor Intake and Global DNA (Hydroxy)Methylation before and during Pregnancy. *Nutrients*. 2016;8(8).
16. Pauwels S, Ghosh M, Duca RC, Bekaert B, Freson K, Huybrechts I, et al. Maternal intake of methyl-group donors affects DNA methylation of metabolic genes in infants. *Clinical Epigenetics*. 2017;9(1):16.
17. Ly A, Ishiguro L, Kim D, Im D, Kim S-E, Sohn K-J, et al. Maternal folic acid supplementation modulates DNA methylation and gene expression in the rat offspring in a gestation period-dependent and organ-specific manner. *J Nutr Biochem*. 2016;33:103-10.
18. Vazquez A, Markert EK, Oltvai ZN. Serine Biosynthesis with One Carbon Catabolism and the Glycine Cleavage System Represents a Novel Pathway for ATP Generation. *PLoS One*. 2011;6(11):e25881.
19. Zeisel S. Choline, Other Methyl-Donors and Epigenetics. *Nutrients*. 2017;9(5):445.
20. Zhao N, Yang S, Hu Y, Dong H, Zhao R. Maternal betaine supplementation in rats induces intergenerational changes in hepatic IGF-1 expression and DNA methylation. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(8):1600940.
21. Taylor RM, Smith R, Collins CE, Mossman D, Wong-Brown MW, Chan E-C, et al. Methyl-Donor and Cofactor Nutrient Intakes in the First 2–3 Years and Global DNA Methylation at Age 4: A Prospective Cohort Study. *Nutrients*. 2018;10(3):273.
22. Potter C, Moorman AV, Relton CL, Ford D, Mathers JC, Strathdee G, et al. Maternal Red Blood Cell Folate and Infant Vitamin B12 Status Influence Methylation of Genes Associated with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(22):1800411.
23. Li X, Wang T, Zhao M, Huang T, Sun D, Han L, et al. DNA methylation variant, B-vitamins intake and longitudinal change in body mass index. *International Journal of Obesity*. 2018:1.
24. Yadav DK, Shrestha S, Lillycrop KA, Joglekar CV, Pan H, Holbrook JD, et al. Vitamin B12 supplementation influences methylation of genes associated with Type 2 diabetes and its intermediate traits. Future Medicine Ltd London, UK. 2017.
25. Amaral CLD, Bueno RdBeL, Burim RV, Queiroz RHC, Bianchi MdLP, Antunes LMG. The effects of dietary supplementation of methionine on genomic stability and p53 gene promoter methylation in rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011;722(1):78-83.

26. Parrish RR, Buckingham SC, Mascia KL, Johnson JJ, Matyjasik MM, Lockhart RM, et al. Methionine increases BDNF DNA methylation and improves memory in epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(4):401-16.
27. Razak MA, Begum PS, Viswanath B, Rajagopal S. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxid Med Cell Longevity.* 2017.
28. Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids.* 2011;40(4):1053-63.
29. Ballevre O, Cadenhead A, Calder AG, Rees WD, Lobleby GE, Fuller MF, et al. Quantitative partition of threonine oxidation in pigs: effect of dietary threonine. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 1990.
30. Lamers Y, Williamson J, Gilbert LR, Stacpoole PW, Gregory JF. Glycine Turnover and Decarboxylation Rate Quantified in Healthy Men and Women Using Primed, Constant Infusions of [1,2-13C2]Glycine and [2H3]Leucine. *J Nutr.* 2007;137(12):2647-52.
31. Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad, Ser B.* 2008;84(7):246-63.
32. Meléndez-Hevia E, de Paz-Lugo P, Cornish-Bowden A, Cárdenas ML. A weak link in metabolism: the metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis. *J Biosci.* 2009;34(6):853-72.
33. Razak MA, Begum PS, Viswanath B, Rajagopal S. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxid Med Cell Longevity.* 2017.
34. Israel Pérez-Torres AMZ-M, Guarner-Lans V. Beneficial Effects of the Amino Acid Glycine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2016;17(1):15-32.
35. Palmer ND, Stevens RD, Antinozzi PA, Anderson A, Bergman RN, Wagenknecht LE, et al. Metabolomic Profile Associated With Insulin Resistance and Conversion to Diabetes in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):E463-E8.
36. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost H-G, et al. Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach. *Diabetes.* 2013;62(2):639-48.
37. Klein MS, Shearer J. Metabolomics and Type 2 Diabetes: Translating Basic Research into Clinical Application. *Journal of Diabetes Research.* 2015;2016.
38. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017;25(1):27-42.
39. Walker V, Mills GA. Quantitative Methods for Amino Acid Analysis in Biological Fluids. *Ann Clin Biochem.* 1995;32(1):28-57.
40. Shah S, Rathod I, Kanakia D. Colorimetry method for estimation of glycine, alanine and isoleucine. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016;69(3):462.
41. Numata Y, Otsuka M, Yamagishi K, Tanaka H. Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic Acid, Glutamic Acid, Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy. *Analytical Letters.* 2017;50(4):651-62.
42. Copkun Ö. Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of İstanbul.* 2016;3(2):156-60.
43. Mark FV. *Chromatography: Principles and Instrumentation.* 1sted. New Jersey, USA:Wiley;2016.
44. Blum MF. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine.* 2014;75(2):C18-C21.
45. Swartz M. Hplc detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 2010;33(9):1130-50.
46. Bhardwaj S, Vandana A, Vijay B, Gupta MK. Ultra Performance Liquid Chromatography: A Revolutionized LC Technique. *International Journal of Drug Regulatory Affairs.* 2014;2(3):83-7.
47. El-Anead A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev.* 2009;44(3):20-30.
48. Argoti D. *Liquid chromatography-mass spectrometry for detection and characterization of DNA biomarkers and reactive metabolites.* Boston: Northeastern University; 2008.
49. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discovery.* 2003;2(2):140.
50. Wilm M. Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2011;10(7):M111.009407.
51. Ho CS, Lam CK, Chan MHM, Cheung RC-K, Law LK, Lit LCW, et al. *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications.* undefined. 2003.

52. Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga CJ, Udseth HR. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Analytical Chemistry*. 1990;62(9):882-99.
53. McLuckey SA, Wells JM. Mass Analysis at the Advent of the 21st Century. *Chem Rev*. 2001;101(2):571-606.
54. March RE. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1997;32(4):351-69.
55. Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CHL. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(3):496-504.
56. Hopfgartner G, Varesio E, Tschäppät V, Grivet C, Bourgogne E, Leuthold LA. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J Mass Spectrom*. 2004;39(8):845-55.
57. Mermelekas G, Vlahou A, Zoidakis J. SRM/MRM targeted proteomics as a tool for biomarker validation and absolute quantification in human urine. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2015;15(11):1441-54.
58. Rahimi N, Razi F, Nasli-Esfahani E, Qorbani M, Shirzad N, Larijani B. Amino acid profiling in the gestational diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2017;16(1):13.
59. Cetin I, de Santis MSN, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzoni S, et al. Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005;192(2):610-7.
60. Pappa KI, Vlachos G, Theodora M, Roubelaki M, Angelidou K, Antsaklis A. Intermediate metabolism in association with the amino acid profile during the third trimester of normal pregnancy and diet-controlled gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2007;196(1):65.e1-e5.
61. Williamson J, Lamers Y, Gregory JF, Theriaque DW, Shuster JJ, Stacpoole PW, et al. Production of 1-Carbon Units from Glycine Is Extensive in Healthy Men and Women. *J Nutr*. 2009;139(4):666-671.
62. Meier P, Teng C, Battaglia FC, Meschia G. The Rate of Amino Acid Nitrogen and Total Nitrogen Accumulation in the Fetal Lamb. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1981;167(4):463-468.
63. Cetin I, Marconi AM, Baggiani AM, Buscaglia M, Pardi G, Fennessey PV, et al. In Vivo Placental Transport of Glycine and Leucine in Human Pregnancies. *Pediatr Res*. 1995;37(5):571.
64. Paolini CL, Marconi AM, Ronzoni S, Di Noio M, Fennessey PV, Pardi G, et al. Placental Transport of Leucine, Phenylalanine, Glycine, and Proline in Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies. *jcem*. 2001;86(11):5427-32.
65. Holtzman IR, Lemons JA, Meschia G, Battaglia FC. Uterine Uptake of Amino Acids and Placental Glutamine-glutamate Balance in the pregnant ewe. *J Dev. Physiol*. 1979;1:137-149
66. Morriss FH, Adcock III EW, Paxson CL, Greeley WJ. Uterine Uptake of Amino Acids throughout gestation in the unstressed ewe. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:601-607.
67. Hsu JW, Thame MM, Gibson R, Baker TM, Tang GJ, Chacko SK, et al. Unlike pregnant adult women, pregnant adolescent girls cannot maintain glycine flux during late pregnancy because of decreased synthesis from serine. *Br J Nutr*. 2016;115(5):759-63.