



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Relación de la concentración de betaína y colina en el  
binomio madre-recién nacido con y sin diabetes  
gestacional**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**SUSANA DURÁN CASTILLO**

**Asesor: M. C. Rosa Elba Galván Duarte**

**Director: Dr. Adán Valladares Salgado**



Ciudad de México

2019



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.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo recibido para realizar este trabajo de tesis titulado: Relación de la concentración de betaína y colina en el binomio madre-recién nacido con y sin diabetes gestacional, con el número de protocolo FIS/IMSS/PROT/G17/1671, así también a la Unidad de investigación Médica en Bioquímica.

## **Agradecimientos**

### **A mis padres.**

Que con su amor, dedicación, paciencia me han forjado como la persona que soy, todos mis logros se los debo a ustedes incluyendo este. Gracias por confiar y creer en mí, en mis expectativas y sueños, gracias a ustedes y a su apoyo incondicional que siempre me han brindado he concluido esta gran meta. No tengo palabras para agradecer todo lo que me han dado.

### **A mi Familia**

A mi familia a mi hermano y sobrinos Gael y Diego por todo su amor y apoyo. A Miguel por ser mi mejor amigo, mi novio, compañero de vida, gracias por todo el apoyo incondicional que me has brindado, por creer en mí, apoyarme y estar a mi lado en las buenas y malas.

### **A mi asesor.**

Dr. Adán Valladares Salgado gracias por todo el apoyo recibido desde que empecé a colaborar en este proyecto, por enseñarme todo el trabajo que conlleva la investigación. Gracias por siempre darme un tiempo para escucharme y aconsejarme, por brindarme su confianza y amistad.

### **A mis asesoras.**

A mi asesora interna Rosa Elba por escucharme y aconsejarme, a la Maestra Adriana, Doctora Mirna y Maestra Isabel por tomarse el tiempo de leer mi tesis y asesorarme para que este trabajo saliera adelante.

## **A mis amigos**

Gracias por todo el apoyo recibido, por escucharme, por estar conmigo cuando más los necesito, por todos los consejos que me dan. Así también a mis compañeros y amigos de la Unidad de investigación Médica en Bioquímica.

# Índice

<b><i>I. Resumen</i></b> .....	<b>1</b>
<b><i>II. Introducción</i></b> .....	<b>3</b>
<b>III.1 Clasificación de diabetes</b> .....	<b>4</b>
<b>III.1.2 Definición de diabetes gestacional (DG)</b> .....	<b>5</b>
<b>III.1.3 Complicaciones maternas y fetales</b> .....	<b>6</b>
<b>III.2 Diagnóstico en la diabetes gestacional.</b> .....	<b>7</b>
<b>III.3 Tratamiento</b> .....	<b>8</b>
<b>III.4 Placenta</b> .....	<b>10</b>
<b>III.4.1 Fisiología de la placenta</b> .....	<b>10</b>
<b>III.4.2 Hormonas Placentarias</b> .....	<b>13</b>
<b>III.5 Organogénesis</b> .....	<b>16</b>
<b>III.6 Metabolitos asociados con DG</b> .....	<b>19</b>
<b>III.6.1 Betaína</b> .....	<b>19</b>
<b>III.6.2 Colina</b> .....	<b>21</b>
<b>III.6.3 Epigenética</b> .....	<b>25</b>
<b>III.7 Cromatografía líquida ultra alta resolución (UPLC)</b> .....	<b>28</b>
<b>III.7.1 Fuentes de iones- Ionización Electro spray (ESI)</b> .....	<b>29</b>
<b>III.7.2 Funcionamiento Ionización proceso ESI</b> .....	<b>30</b>
<b>III.7.3 Analizadores de masas</b> .....	<b>32</b>
<b>III.7.4 Cuadropolo</b> .....	<b>32</b>
<b><i>IV. Planteamiento del problema.</i></b> .....	<b>34</b>
<b><i>V. Hipótesis</i></b> .....	<b>35</b>
<b><i>VI. Objetivo</i></b> .....	<b>36</b>
<b><i>VII. Método</i></b> .....	<b>37</b>
<b><i>VII.1 Diseño del estudio</i></b> .....	<b>37</b>
<b><i>VII.1.2 Universo de estudio</i></b> .....	<b>37</b>
<b>VII.2 Criterios de inclusión</b> .....	<b>37</b>
<b>VII.2.1 Criterios de exclusión</b> .....	<b>37</b>
<b><i>VII.3 Variables del estudio</i></b> .....	<b>38</b>
<b><i>VII.4 Procedimiento</i></b> .....	<b>41</b>
<b>VII.4.1 Preparación de soluciones.</b> .....	<b>42</b>

VII.4.2 Preparación de muestras.....	45
VII.4.3 Equipo y condiciones .....	45
<b>VII.5 Cuantificación de hemoglobina glucosilada .....</b>	<b>47</b>
<b>VII.5.1 Preparación de reactivos y muestras.....</b>	<b>48</b>
<b>VII.5.2 Calibradores.....</b>	<b>48</b>
<b>VII.5.3 Controles Lyphochek® .....</b>	<b>48</b>
<b>VII.5.4 Calibración .....</b>	<b>48</b>
<b>VII.6 Cuantificación de glucosa.....</b>	<b>50</b>
<b>VIII. Resultados.....</b>	<b>51</b>
<b>IX. Discusión .....</b>	<b>54</b>
<b>X. Conclusión.....</b>	<b>58</b>
<b>XI. Propuesta.....</b>	<b>59</b>
<b>XII. Referencias.....</b>	<b>60</b>

## **Índice de cuadros.**

Cuadro I. Valores de referencia de curva de tolerancia a la glucosa (CTGO).

Cuadro II. Tratamiento farmacológico.

Cuadro III. Operacionalización de variables.

Cuadro IV. Operacionalización de variables

Cuadro V . Preparación de curva de calibración colina.

Cuadro VI. Preparación de curva de calibración betaína.

Cuadro VII. Condiciones cromatográficas.

Cuadro VIII. Controles y calibradores Lyphochek.

Cuadro IX. Valores antropométricos del recién nacido relación entre los metabolitos colina y betaína.

Cuadro X. Características antropométricas y bioquímicas de las madres.

## **Índice de figuras.**

Figura I. El feto humano y placenta.

Figura II. Localización de CTL1 y CTL2 en vellosidades coriónicas.

Figura III. Progresión evolutiva y susceptibilidad a teratógenos y pérdida fetal.

Figura IV. Metabolismo de la betaína.

Figura V. Metabolismo de la colina y vínculos con la metionina y el metabolismo del folato.

Figura VI. La fosfatidilcolina y sus funciones durante el embarazo.

Figura VII. Ciclo de metilación.

Figura VIII. Fuente de ionización de electrospray.

Figura IX. Funcionamiento ionización electrospray (ESI).

Figura X. Aguja electropulverización.

Figura XI. Tamaño de partículas en la cromatografía líquida.

Figura XII. Relación de valores de colina y peso en recién nacido con y sin DG.

Figura XIII. Relación de valores de colina y Hb1Ac de madres con y sin DG.

## **Abreviaturas.**

ACN. Acetonitrilo.

AGL. Ácidos grasos libres.

BHMT. Betaína homocisteína metiltransferasa.

CC. Corriente continua.

CHDH. Colina deshidrogenasa.

CTGO. Curva de tolerancia oral a la glucosa.

CTL-1. Proteína 1 parecida al transportador de colina.

DG. Diabetes gestacional.

DMG. Dimetilglicina.

DNA. Ácido desoxirribonucleico

DT2. Diabetes tipo 2.

E2. Estradiol.

ESI. Ionización electrospray.

GH. Hormona del crecimiento placentario.

GLUT- 4. Transportador de glucosa 4.

GLUT-1. Transportador de glucosa 1.

HAPO. Hiperglucemia y resultados en el embarazo.

HPL. Lactógeno placentario humano.

IGF-1. Factor de crecimiento 1.

IMC. Índice de masa corporal.

IRS-1. Receptor de insulina 1.

IRS-2. Receptor de insulina 2.

M-DG. Madres con diabetes gestacional.

M-SDG. Madres sin diabetes gestacional.

MEOH. Metanol.

MTHFD. Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa.

MTHFR. Metilentetrahidrofolato reductasa.

PC. Fosfatidilcolina.

PEMT. Fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa.

PRL. Prolactina.

RF. Radiofrecuencia.

RN-DG. Recién nacidos con diabetes gestacional.

RN-SDG. Recién nacidos sin diabetes gestacional.

RN. Recién nacidos.

SAM. S-adenosilmetionina.

SD. Sin diabetes gestacional.

TG. Triglicéridos.

UPLC. Cromatografía líquida de ultra alta resolución.

## I. Resumen

**Antecedentes:** La diabetes gestacional (DG) es un padecimiento caracterizado por la intolerancia a los carbohidratos que se diagnostica por primera vez durante el segundo o tercer trimestre del embarazo.

Durante el embarazo hay alteraciones en diversos metabolitos que participan en el ciclo de un carbono, como la colina y la betaína, ambos metabolitos participan en la metilación de histonas y en la transcripción de genes relacionada con la diabetes como el gen de la insulina, *TCF7L2*, y *PPAR $\gamma$*  durante el desarrollo embrionario.

Estos metabolitos tienen diversas funciones entre ellas son importantes para mantener los niveles de metilación en cromatina y en genes importantes en el desarrollo del individuo.

La proteína 1 parecida al transportador de colina (CTL-1, del inglés choline transporter-like protein) es el principal transportador de colina, responsable de la absorción placentaria y del suministro placentario de colina. Este transportador está presente en los trofoblastos y la modificación de esta proteína podría afectar el transporte de colina al feto.

**Objetivo:** Comparar las concentraciones de betaína y colina por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) en el binomio madre-recién nacido con y sin diabetes gestacional.

**Material y método:** Se analizaron un total de 128 muestras de suero en madres y 134 muestras de recién nacidos (RN) obtenidas de cordón umbilical. De estas muestras 70 fueron de madres sin diabetes gestacional (M-SDG) y 58 madres con diabetes gestacional (M-DG). En total fueron 76 recién nacidos sin diabetes gestacional (RN-SDG) y 58 con diabetes gestacional (RN-DG). Se aplicó un cuestionario para obtener los datos antropométricos. Se cuantificó betaína y colina por medio de UPLC MS/MS, glucosa y HbA1c.

Resultados: En este estudio se cuantificaron los niveles de betaína y colina para identificar si hay diferencias entre el binomio madre-recién nacido con y sin diabetes gestacional. En los RN la concentración de colina fue significativa de 7.41  $\mu\text{g/mL}$  para el grupo de RN-SDG y de 6.46  $\mu\text{g/mL}$  para RN-DG ( $p=0.006$ ). La concentración de betaína en RN-SDG fue de 3.03  $\mu\text{g/mL}$  y RN-DG de 2.98  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.770$ ).

Entre las madres, la concentración de betaína fue significativa de 1.47  $\mu\text{g/mL}$  en M-SDG y 1.84  $\mu\text{g/mL}$  en M-DG ( $p=0.002$ ). La concentración de la colina no fue estadísticamente diferente, 2.54 $\mu\text{g/mL}$  en M-DG y de 2.36 $\mu\text{g/mL}$  en M-SDG ( $p=0.059$ ).

La concentración de colina en los RN fue aproximadamente 2.5 veces mayor que en las madres en el momento del parto ( $P<0.05$ ). La concentración de betaína fue de aproximadamente el doble en los RN en comparación con sus madres ( $P<0.05$ ).

Conclusiones: La concentración de betaína fue mayor en M-DG comparado con las M-SDG. En los RN la concentración de colina fue mayor en el grupo de RN-SDG. En general, los dos metabolitos presentaron concentraciones mayores en los RN comparados con las madres.

## II. Introducción

De acuerdo con cifras de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, la prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, esto con base a un diagnóstico previo de la enfermedad. Las mujeres reportan mayores valores de diabetes (10.3%) que los hombres (8.4%). Esta tendencia se observa tanto en localidades urbanas (10.5% en mujeres y 8.2% en hombres) como en rurales (9.5% en mujeres, 8.9% en hombres). En México se ha reportado una prevalencia que va del 14 al 19% de diabetes gestacional.

La encuesta indica que el grupo de la población que tuvo el mayor crecimiento de obesidad fue el de las mujeres de entre 20 y 29 años en edad reproductiva; por lo tanto, se estima que un número creciente de embarazos tendrá complicaciones relacionadas a la obesidad como la diabetes gestacional (DG).

La betaína y la colina son metabolitos, de amonio cuaternario que se encuentra en el cuerpo humano de forma endógena y exógena. La betaína la podemos obtener mediante la oxidación de la colina en la mitocondria y la segunda, por medio de alimentos como espinacas, betabel y productos de trigo. La colina se puede obtener también en diversos alimentos como es el huevo, garbanzos e hígado de carnero y de forma endógena se encuentra en forma de colina libre como fosfocolina, glicerofosfocolina, CDP-colina y acetilcolina. Estos metabolitos están implicados dentro del ciclo metabólico de los compuestos de un carbono, donde se genera un grupo metilo que está disponible para metilar el ADN. Cuando la citosina es metilada ocurren cambios heredables que no involucran la alteración en la secuencia de los nucleótidos del ADN.

Altas concentraciones de betaína y colina se han encontrado asociadas con una disminución de homocisteína, un aumento de S-adenosilmetionina y así una hipermetilación del DNA en sitios CpG, reprimiendo la expresión de algunos genes. Los niveles de betaína son incrementados después de dos años de intervención en

el estilo de vida, por lo que podría ser útil en la monitorización de enfermedades relacionadas con el metabolismo como lo es la DG.<sup>1-3</sup>

### **III. Marco teórico**

#### **III.1 Clasificación de diabetes.**

La diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías generales:

1. Diabetes tipo 1. Debido a la destrucción de las células autoinmunes, que generalmente conduce a una deficiencia de insulina.<sup>1</sup>
2. Diabetes tipo 2 (DT2). Debido a la pérdida progresiva de la secreción de insulina de células  $\beta$  del páncreas con frecuencia en el fondo de la resistencia a la insulina.<sup>1</sup>
3. Diabetes gestacional (DG). Diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no fue claramente evidente diabetes antes de la gestación.<sup>1</sup>
4. Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica, como la diabetes neonatal y la diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis), y diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH / SIDA, o después del trasplante de órganos).<sup>1</sup>

### **III.1.2 Definición de diabetes gestacional (DG)**

Durante años, la DG se definió como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se reconoce por primera vez durante el embarazo,<sup>1</sup> independientemente de si la condición puede haber precedido al embarazo o persistido después del mismo. Esta definición facilitó una estrategia para la detección y clasificación de DG, pero estuvo limitada por la imprecisión. La epidemia en curso de obesidad y diabetes ha llevado a más diabetes tipo 2 en mujeres en edad fértil, con un aumento en el número de mujeres embarazadas con diabetes tipo 2 no diagnosticada.<sup>2</sup> Debido a la cantidad de mujeres embarazadas con diabetes tipo 2 sin diagnosticar, es razonable evaluar a las mujeres con factores de riesgo para la diabetes tipo 2 en su período prenatal inicial utilizando criterios diagnósticos estándar.<sup>2</sup>

Las mujeres diagnosticadas con diabetes según los criterios de diagnóstico estándar en el primer trimestre deben clasificarse con diabetes pregestacional preexistente (diabetes tipo 2 o, muy rara vez, diabetes tipo 1 o diabetes monogénica). Se puede recomendar a las mujeres que tienen prediabetes en el primer trimestre a hacer cambios en el estilo de vida para reducir su riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, y quizás DG, aunque se necesita más estudio.<sup>2</sup>

La DG es la diabetes que se diagnostica por primera vez en el segundo o tercer trimestre del embarazo y no es claramente una diabetes tipo 1 o tipo 2 preexistente.<sup>2</sup>

Debido a que la DMG confiere un mayor riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 después del parto<sup>3-5</sup> y porque existen intervenciones de prevención efectivas, las mujeres diagnosticadas con DMG deben someterse a exámenes de detección de prediabetes y DT2 de por vida<sup>6-8</sup>.

### III.1.3 Complicaciones maternas y fetales.

Las mujeres embarazadas con DG tienen un riesgo elevado de morbilidad durante el embarazo, el parto y después del nacimiento. En el estudio Hyperglycemia and Pregnancy Outcome HAPO<sup>9</sup> se encontró un riesgo elevado de hipertensión gestacional (5.9%) y de preeclampsia (4.8%). Ese estudio demostró, además, una relación directa con la primera prueba de glucemia alterada y el riesgo de preeclampsia. Otra de las complicaciones que pueden experimentar las embarazadas con diabetes es la macrosomía fetal, donde la hiperglucemia tiene una relación directa con la adiposidad neonatal, que se torna en incremento del tamaño fetal y, por ende, del aumento de distocia al momento del nacimiento, sobre todo de hombro, cuando el peso fetal excede los 4 kg<sup>9</sup>. Esta macrosomía implica mayor tasa de nacimiento por cesárea, con una frecuencia aproximada de 23.7%.<sup>10</sup> Otro riesgo importante a considerar es la muerte prenatal y posnatal. En el estudio HAPO<sup>9</sup> no se encontró riesgo aumentado de muerte prenatal en pacientes con hiperglucemia.

Las complicaciones de la DG trascienden al parto, con repercusiones para el feto y la vida posterior de ambos. La mujer con DG tiene un riesgo elevado de padecer diabetes mellitus tipo 2 a largo plazo, por lo que se considera un factor predictivo de la misma.<sup>1</sup>

Otras complicaciones a largo plazo que experimentan las pacientes son las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico. La prevalencia de este último es tres veces más frecuente en pacientes con DG comparada con las de concentraciones normales de glucosa. También se ha demostrado que a los tres meses posparto la prevalencia de síndrome metabólico se incrementa 10% y 70% el de riesgo de enfermedad cardiovascular,<sup>11</sup> este último atribuido a varios factores que interactúan, como la diabetes mellitus tipo 2 (DT2), síndrome metabólico y la disfunción vascular.<sup>12</sup> Así como la DG genera cambios a largo plazo en la madre, en el recién nacido se generaran alteraciones como la obesidad, DT2 y síndrome metabólico.<sup>13</sup> Estas alteraciones, a largo plazo, dependen de la susceptibilidad

genética y de la asociación con ciertas condiciones ambientales posnatales.<sup>14</sup> Se hace referencia al fenómeno de transmisión epigenética, en donde el recién nacido adquiere características de la madre, que se reflejan en la programación fetal.

La hiperglucemia materna genera hiperglucemia intrauterina lo que, a su vez, da lugar a la hiperinsulinemia fetal con modificación en el patrón de crecimiento y alteración posterior del metabolismo fetal. Este aumento en el peso fetal incrementa el riesgo de DT2 (seis veces más) comparado con el recién nacido con peso normal.<sup>15, 16</sup>

El incremento de la diabetes mellitus en el recién nacido genera un riesgo elevado, a largo plazo, de obesidad (dos veces mayor) y de síndrome metabólico (cuatro veces mayor) con respecto a los RN de madre sin DG.<sup>17</sup>

### **III.2 Diagnóstico en la diabetes gestacional.**

Método de un paso.

Realizar una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTGO) de 75 g, con medición de glucosa en plasma después de un ayuno nocturno de al menos 8 horas, cuando se alcanza o supera cualquiera de los siguientes valores de glucosa en plasma.<sup>1</sup>

Método en dos pasos.

Paso 1: Realizar una carga de glucosa de 50 g (sin ayuno), con una medición de glucosa en plasma a la hora, durante la semana 24 a la 28 de gestación en mujeres que no se diagnosticaron previamente diabetes. Si el nivel de glucosa en plasma medido a la 1 h después de la carga es de  $\geq 130$  mg / dL, 135 mg / dL o 140 mg / dL, proceder a una prueba de (CTGO) de 100 g (Cuadro I).<sup>1</sup>

Paso 2: El (CTGO) de 100 g se debe realizar cuando el paciente está en ayunas. El diagnóstico de DMG se realiza si se cumplen al menos dos de los siguientes cuatro niveles de glucosa en plasma (medido en ayunas y 1,2 y 3 horas durante la (CTGO) o excedido (Cuadro I).<sup>1</sup>

	<b>Carpenter-Coustan</b>	<b>NDDG</b>
<b>Ayuno</b>	95 mg /dL (5.3 mmol/ L)	105 mg/dL (5.8 mmol/L)
<b>1 h.</b>	180 mg/dL (10.0 mmol/ L)	190 mg/dL (10.6 mmol/L)
<b>2h.</b>	155 mg/ dL (8.6 mmol/ L)	165 mg/dL (9.2 mmol/ dL)
<b>3h.</b>	140 mg/dL (7.8 mmol/L)	145mg/dL (8.0 mmol/dL)

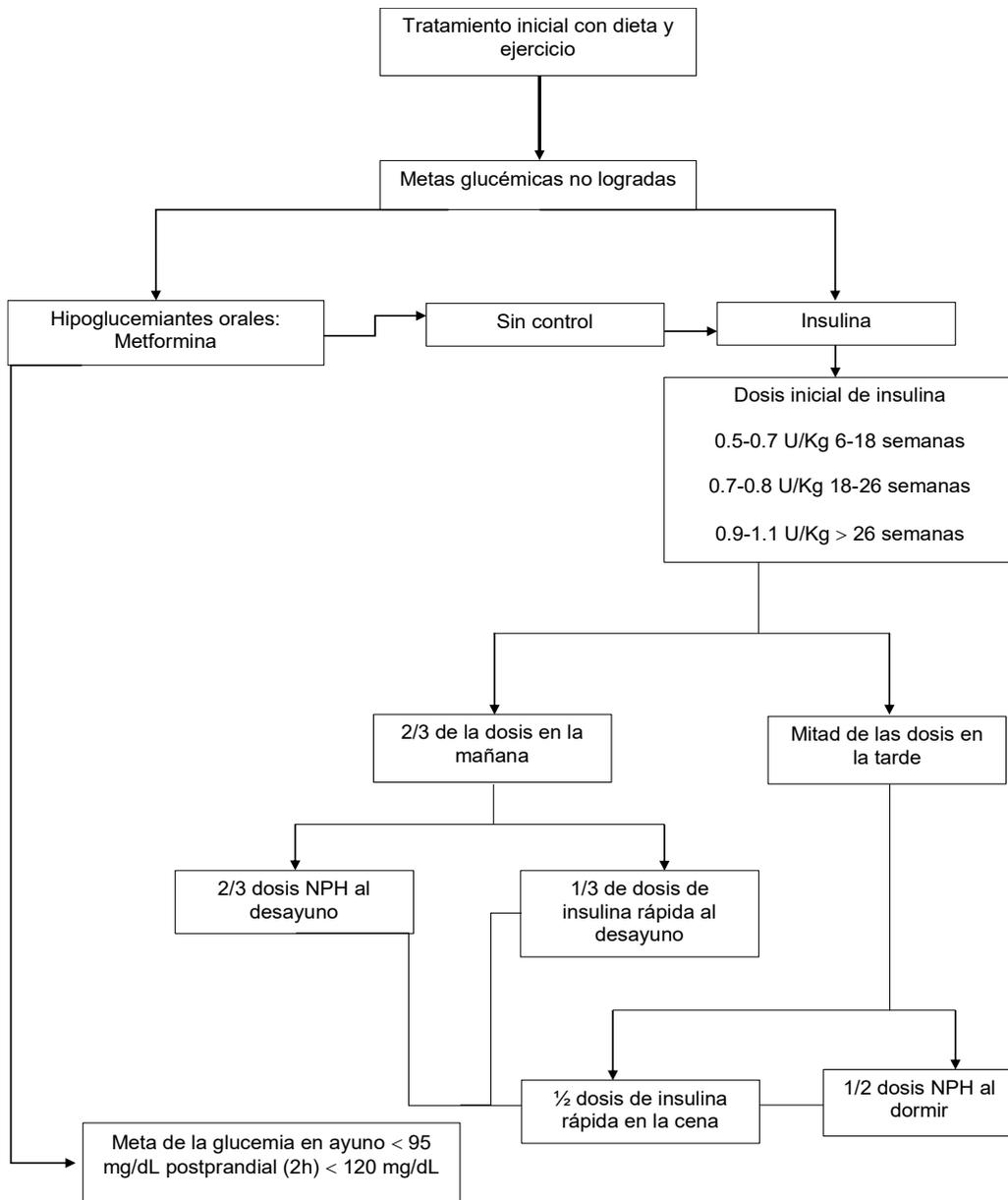
**NDDG, National Diabetes Data Group**

Cuadro I. Valores de referencia de CTGO. Tomado de American Diabetes Association. <sup>1</sup>

### III.3 Tratamiento

La meta de la terapia nutricional es: alcanzar valores normales de glucemia, prevenir la cetosis, que la ganancia de peso sea la adecuada y mantener el bienestar fetal. Por tal razón, se recomienda una ingesta de carbohidratos limitada a 33-40%, con 20% de proteínas y 40% de grasas. Además, el ejercicio físico ha demostrado, en pacientes diabéticos, mejorar la sensibilidad a la insulina en los tejidos, lo que se traduce en mejores índices de glucemia. La segunda estrategia es la adecuada monitorización glucémica en ayuno y 1-2 hora después de cada comida.<sup>17-20</sup> El objetivo es alcanzar concentraciones de glucosa en ayuno inferiores a 95 mg/dL y postprandiales de 140 mg/dL a la hora y 120 mg/dL a las 2 horas; esto reduce el riesgo de macrosomía fetal y de complicaciones asociadas.<sup>21,23</sup> Si el control glucémico no se consigue con dieta y ejercicios la opción restante es el tratamiento farmacológico (Cuadro II).

## Cuadro II. Tratamiento Farmacológico.



Tomado de Vigil-De Gracia P. et al.<sup>24</sup>

### III.4 Placenta

La placenta a término del embarazo mide 18-20 cm de diámetro y su espesor es uniforme, tiene una consistencia blanda y un aspecto esponjoso.

En la placenta hay que considerar dos caras, una materna, otra fetal y un borde formado por la unión de ambas caras. La cara materna mira hacia el útero, se halla dividida en 10 o 12 lóbulos por surco de profundidad variable. La cara fetal mira hacia el interior de la cavidad amniótica, por tanto, al feto, se halla recubierta por el epitelio amniótico en ella se inserta el cordón umbilical, generalmente en el centro (Figura I).<sup>25</sup>

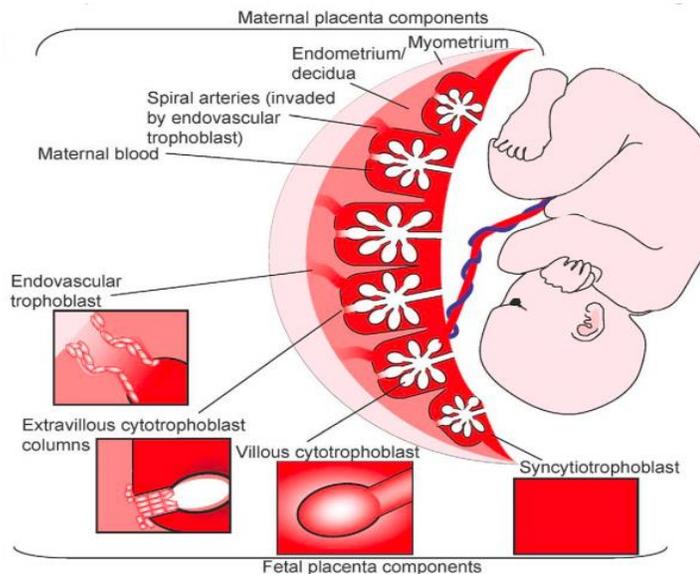


Figura I. El feto humano y placenta. trofoblastos vellosos de la placenta humana crecen como una estructura ramificada, maximizando intercambio con la sangre materna. trofoblasto extraviloso invaden el endometrio materno, y algunas células colonizan las arterias espirales maternas, ampliándolos para maximizar el flujo de sangre. Tomado de 10.1371 / journal.pgen.1001015.g001.

#### III.4.1 Fisiología de la placenta

La placenta tiene dos grandes funciones: la producción endocrina y el intercambio feto materno de sustancias. El intercambio feto materno de sustancias ocurre en la placenta a través de una membrana formada por el trofoblasto y su

membrana basal, tejido conjuntivo, endotelio de los vasos de las vellosidades coriónicas y su membrana basal .<sup>25</sup>

Mediante el intercambio la sangre materna cede a la sangre fetal los metabolitos necesarios por el desarrollo del feto y capta los catabolitos del mismo.

El intercambio feto materno de sustancias se puede realizar por los principales mecanismos de intercambio el cual son los siguientes: difusión simple, difusión facilitada, transporte activo, pinocitosis y fagocitosis.<sup>25</sup>

Los principales nutrientes en la placenta son gases, agua, aminoácidos, colesterol, ácidos grasos y glucosa el cual esta última se da por difusión facilitada con gran rapidez, debido a las grandes cantidades que necesita el feto para el metabolismo y desarrollo.<sup>25</sup>

Como ya se ha mencionado los nutrientes placentarios depende del estado nutricional materno, así como del tamaño de la placenta, la morfología, la vasculatura (flujo de sangre fetal-placentaria) densidad y actividad de los transportadores de nutrientes. El CTL1 es una proteína transportadora presente en los trofoblastos sincitiales, es probablemente el principal transportador de colina responsable de la absorción placentaria y del suministro de sangre materna.<sup>26</sup>

Los niveles de expresión de CTL2 corresponden a la vasculatura creciente de la placenta y la localización estricta de CTL2 en el endotelio sugiere que CTL2 puede desempeñar un papel específico en el transporte de colina endotelial (Figura II).

Existen pocos informes del patrón de expresión de CTL2 en la placenta el cual han demostrado que CTL2 tiene 2 isoformas expulsadas de diferentes promotores. Se ha observado que la isoforma P2 de CTL2 (CTL2-P2) tiene actividad de transporte de colina en otros tejidos.<sup>36</sup> Dado que el patrón de expresión de CTL2 no sigue el mismo patrón que CTL1, CTL2 puede cumplir una función independiente de CTL1 y no es simplemente una molécula redundante. CTL1 y CTL2 se expresan fuertemente en las células endoteliales, lo que sugiere una necesidad significativa

de colina en estas células. Se ha demostrado que los transportadores CTL aumentan con los glucocorticoides.<sup>26</sup>

La DG se asocia con un aumento de la ramificación capilar y el aumento de la superficie de las áreas de intercambio, lo que contribuye a un mayor flujo de nutrientes maternos que pueden ser absorbidos por los trofoblastos y luego transportados a la circulación fetal.<sup>27-30</sup>

El mejor mecanismo patogénico para la DMG es la sensibilidad reducida a la insulina que ocurre en el embarazo normal debido a la acción hormonal placentaria y materna.

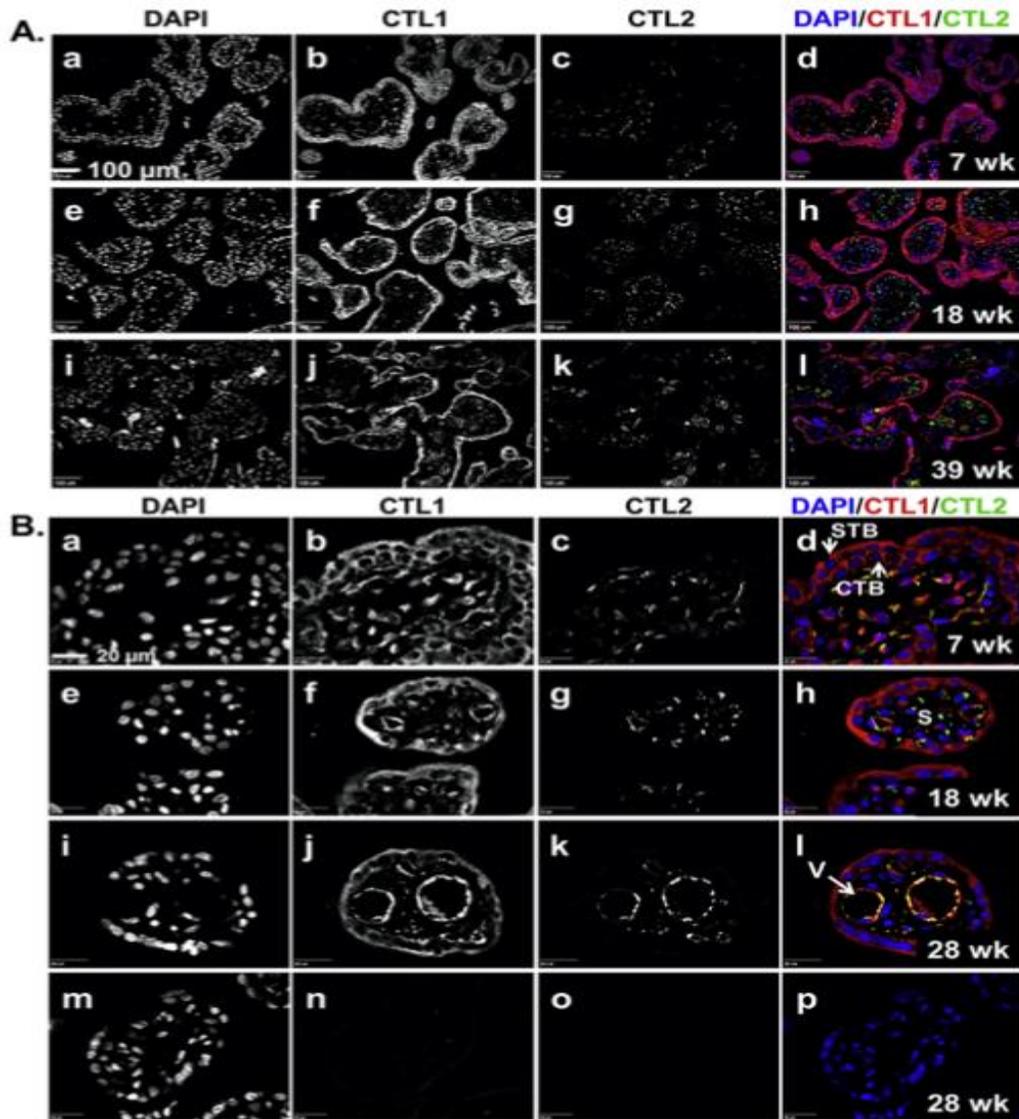


Figura II. Localización de CTL1 y CTL2 en vellosidades coriónicas. La inmunofluorescencia se realizó en secciones de tejido embebido en parafina de la región de las vellosidades coriónicas de placenta humana recolectada en 6-8, 10-12, 18-24, 28-32, 37-40 (puntos de tiempo de gestación de la semana). Se muestran imágenes representativas para ventanas gestacionales. La fluorescencia de los anticuerpos dirigidos a CTL1 (rojo) y CTL2 (verde) se fotografió con un microscopio confocal. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Tomado de Heidi K, et al.<sup>26</sup>

### III.4.2 Hormonas Placentarias.

Las hormonas placentarias, como el lactógeno placentario humano (HPL) y la hormona del crecimiento placentario (GH), están sujetas a la acción de la insulina.<sup>31-</sup>  
<sup>33</sup> Durante el embarazo la HPL es secretada por el sincitiotrofoblasto placentarios en la capa sincitial es detectable en la circulación materna poco después de la

implantación, y se eleva progresivamente durante el embarazo hasta aproximadamente la semana 35 de gestación, cuando alcanza una meseta. Se correlaciona con el peso y el bienestar fetal, así como con la función placentaria. HPL es el principal mediador de resistencia a la insulina durante el embarazo actúa como un agente "anti-insulina" para asegurar un suministro adecuado de glucosa al embrión también tiene efectos tróficos en el feto, incluida la producción de somatomedina, la absorción de aminoácidos y la glucogénesis, así como en la madre a través de la producción de somatomedina, la inducción de la lactogénesis y la resistencia periférica a la insulina.<sup>34</sup> El HPL produce concentraciones elevadas de glucosa en sangre materna al aumentar la resistencia a la insulina y concentraciones elevadas de ácidos grasos aumentando la lipólisis. Una caída repentina de las concentraciones de HPL podría indicar sufrimiento fetal.<sup>35</sup> La hormona del crecimiento (GH) es una hormona anabólica, implicada en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, y cuando está en exceso, tiene propiedades diabetógenas, oponiéndose a la acción de la insulina. La hormona placentaria humana GH es la principal molécula producida durante el embarazo, que tiene un efecto sobre la sensibilidad a la insulina materna. Se produce principalmente por las células sincitiotrofoblásticas placentarias, y se incrementa gradualmente a la mitad del embarazo hasta el término.<sup>36</sup>

La acción de la insulina se ve afectada a nivel hepático, muscular y de tejido adiposo.<sup>37</sup> La señalización de insulina post-receptor deteriorada es principalmente responsable de la resistencia a la insulina inducida por el embarazo.

Los estudios experimentales mostraron una expresión alterada de RNAm o proteína de la señal de insulina en componentes en cascada, como el sustrato receptor de insulina (IRS) -1 y (IRS) -2, así como el transportador de glucosa (GLUT)-1 y (GLUT)-4 en el tejido adiposo y músculo de mujeres cuyos embarazos fueron complicados por DMG.<sup>36</sup> La disminución de la fosforilación de tirosina del IRS-1, la disminución de la translocación inducida por insulina GLUT-4 a la superficie celular y la disminución del transporte de glucosa a la célula también se encontró en el tejido muscular y adiposo de las mujeres con DMG. Se han encontrado defectos similares de insulina post-receptor en la placenta de embarazos afectados por DMG.

La inflamación crónica de bajo grado que caracteriza la obesidad, que a menudo acompaña a los embarazos de DMG, contribuye al deterioro de la señalización de insulina, así como al estrés oxidativo.<sup>36</sup>

La GH sérica materna y otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento 1 (IGF-1), sus proteínas de unión, la prolactina (PRL), la progesterona y el cortisol se alteran en las mujeres cuyos embarazos se complican en comparación con las mujeres embarazadas no afectadas.<sup>29-31</sup>

La prolactina (PRL) es producida principalmente por las células lactotróficas de la célula pituitaria y secundariamente por las células inmunes del sistema nervioso central. Los efectos de PRL son la proliferación epitelial mamaria, la función del cuerpo lúteo y la respuesta inmune.<sup>33,34</sup> La evidencia sobre el efecto de PRL sobre la sensibilidad a la insulina es contradictoria.<sup>35,36</sup> Por el contrario, los estudios en mujeres sanas no embarazadas (con concentraciones normales de prolactina) mostraron que las concentraciones más bajas de prolactina se correlacionaron con una menor sensibilidad a la insulina y un mayor riesgo de diabetes.<sup>36,37</sup> Durante el embarazo, la PRL también es producida por las células deciduales, hipófisis fetal y es un aumento en el defecto de prolactina. En humanos, las concentraciones más altas de PRL es durante el tercer trimestre del embarazo se han asociado con una tolerancia a la glucosa, lo que implica una relación causal entre la hiperprolactinemia y la DMG.<sup>38</sup> Por el contrario, en otro estudio, no se encontraron diferencias en las concentraciones de PRL entre DMG y los controles.<sup>39</sup> Los esteroides suprarrenales maternos, placentarios y fetales, la progesterona, el cortisol, el estrógeno y los andrógenos, también contribuyen a la resistencia a la insulina inducida por el embarazo.<sup>40</sup> La progesterona, producida, inhibe la acción de la insulina in vivo e in vitro, principalmente al inhibir la vía PI3-quinasa del cascada de señalización de insulina en los adipocitos.<sup>41</sup> El cortisol también puede inducir resistencia a la insulina a través del defecto de insulina posterior al receptor.<sup>17</sup> Los receptores de andrógenos se sobre expresan en placentas de embarazos afectados por DMG en comparación con los controles.<sup>42</sup>

Si bien se sabe que los estrógenos regulan el metabolismo de los carbohidratos, el mecanismo subyacente no se comprende completamente. En el estado no

embarazado, el estradiol (E2) afecta parcialmente la señalización de la insulina a través de la modificación de la función mitocondrial.<sup>43</sup> En los embarazos afectados por DMG, las concentraciones de estrógenos son más bajas en comparación con las mujeres embarazadas no afectadas.

### **III.5 Organogénesis**

El embarazo dura 9 meses ó 40 semanas pueden distinguirse dos etapas fundamentales: el periodo embrionario, que comprende las primeras 8 semanas y el periodo fetal, que abarca desde la semana 8 hasta el término (figura III) . Las dos primeras semanas del periodo embrionario son críticas, hasta el punto que en condiciones adversas, puede sobrevenir la muerte del embrión. Entre las semanas 2 y 8, éste es extremadamente vulnerable a los agentes teratógenos, ya que este periodo coincide con el inicio de la organogénesis, es cuando pueden presentarse las malformaciones más graves debidas a agentes externos.<sup>44</sup>En el periodo fetal se pueden dar malformaciones de menor entidad, pero lo más importante son las adaptaciones fisiológicas. Esta etapa es susceptible de sufrir ajustes que dan origen a la programación fetal.<sup>45</sup>

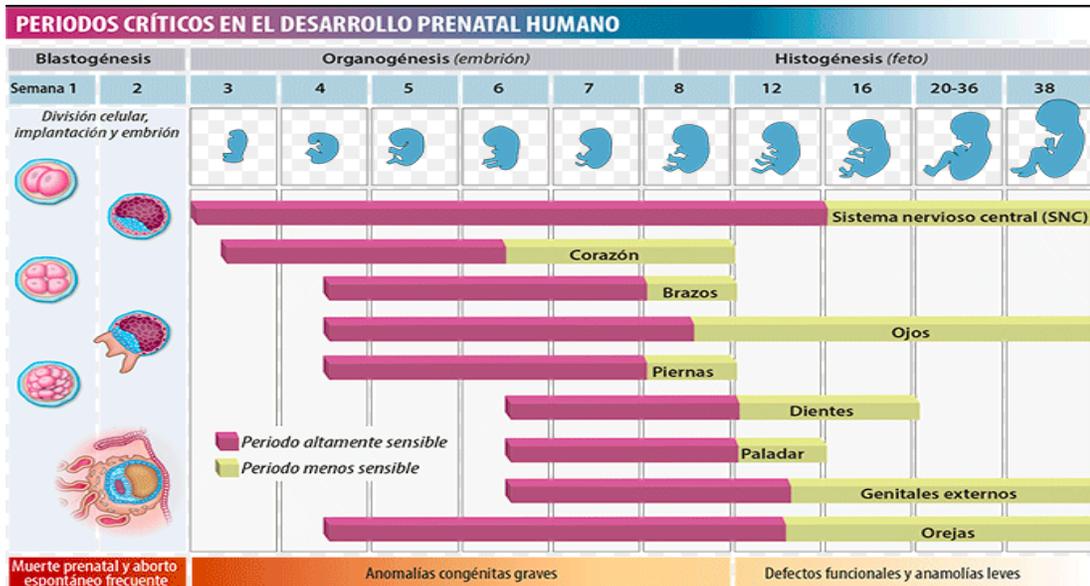


Figura III. Progresión evolutiva y susceptibilidad a teratógenos y pérdida fetal. (Modificado de Keint Moore, *The human in development: embryology with clinical orientation*, 3ª edición, W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA, 1983.)

Durante la gestación se dan dos funciones fundamentales: el primero, de índole anabólica o de creación de reservas, donde el desarrollo feto-placentario es mínimo, y el segundo de carácter catabólico o de movilización de dichas reservas y la adaptación para el parto, en el cual el desarrollo feto-placentario es enorme.<sup>45</sup>

La primera etapa comprende los dos primeros trimestres. En este periodo, el objetivo principal del desarrollo es la organogénesis y la diferenciación.<sup>46</sup> Por ello, el crecimiento está limitado y el feto no presenta un gran aumento de peso en proporción con el que experimenta la madre. Este aumento de peso coincide con un aumento del depósito de grasa en el tejido adiposo de la madre, constituyendo así un 28% de todo el peso que gana durante la gestación. Este aporte extra de energía y nutrientes durante el primer periodo, permitirá el intenso intercambio de metabolitos que es demandado en la segunda etapa, así como los ajustes metabólicos necesarios para un adecuado control posterior del metabolismo de la insulina y glucemia de la madre.<sup>45</sup> Durante esta primera etapa se produce un aumento del tamaño de la placenta, del volumen de líquido amniótico y la cantidad de proteína neta. Se producen variaciones hormonales que conducen a una

readaptación metabólica ante la nueva situación, entre las que destaca el aumento paulatino en los niveles de insulina y en la sensibilidad a esta hormona, que tiene efecto sobre procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis pudiendo así participar activamente en el control metabólico materno.<sup>45</sup>

Durante el segundo periodo, se reduce enormemente el ritmo de ganancia de las reservas maternas, continúa el crecimiento lineal de la placenta y del líquido amniótico, y el crecimiento fetal. El balance metabólico está bien diseñado para proporcionar un continuo suministro de nutrientes, que aseguran el desarrollo fetal y placentario incluso cuando las condiciones nutricionales maternas no sean las óptimas.<sup>45</sup>

A lo largo de este periodo, metabólicamente debemos destacar:

a) Una marcada disminución en los niveles de glucosa circulante debido a una baja biodisponibilidad de sustratos, causada por la intensa demanda metabólica del feto, que no es compensada a pesar de encontrarse activada la vía gluconeogénica por encima de los valores normales.<sup>46,47</sup>

b) Una gran actividad lipolítica, que conduce a un aumento de sustratos para el feto y a su vez, a unos mayores niveles circulantes de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol.<sup>48</sup>

c) Hiperlipemia, por una mayor producción endógena de triglicéridos (TG), y por una disminución en el catabolismo de las lipoproteínas, al que además contribuye el aumento de la ingesta de la madre, lo que sirve de sustrato para iniciar la formación de leche en preparación para la lactancia.<sup>48</sup>

El páncreas se forma a las cuatro semanas en el intestino anterior en la parte correspondiente a la segunda porción duodenal. Allí se originan dos brotes: uno posterior o dorsal que aparece a principios de la cuarta semana y crece rápidamente en el mesenterio dorsal y el otro brote es anterior o ventral. Este último da origen a dos brotes, uno que dará origen a una parte del páncreas y otro que da origen a la vía biliar y al hígado.<sup>48</sup>

El páncreas está formado por dos yemas una ventral y otra dorsal, estas dos yemas se origina del revestimiento endodérmico del duodeno. La yema pancreática ventral se encuentra cerca del conducto biliar. Durante la quinta semana el esbozo ventral y la vía biliar rotan hacia la derecha y se sitúan a la derecha de la vena porta ubicándose por debajo del páncreas dorsal .<sup>45</sup>

En la séptima y octava semana del desarrollo embrionario los dos brotes ventral y dorsal se fusionan tanto los parénquimas como los conductos principales de ambos esbozos. El conducto pancreático principal o conducto de Wirsung se forma de la unión del conducto ventral y la porción distal del conducto de la yema dorsal. El conducto pancreático accesorio o conducto de Santorini corresponde a la porción proximal del conducto de la yema dorsal.<sup>45</sup>

Durante el tercer mes de vida fetal, a partir del tejido pancreático parenquimatoso se desarrollan los islotes pancreáticos (Islotes de Langerhans), que se aparecen por todo el páncreas. La secreción de insulina se inicia aproximadamente en el quinto mes de vida fetal.<sup>45</sup>

### **III.6 Metabolitos asociados con DG.**

#### **III.6.1 Betaína**

La betaína (N, N, N-trimetilglicina) es un donante esencial de osmolitos y grupos metilo. El salvado de trigo, el germen de trigo, las espinacas y la remolacha son fuentes ricas de betaína en la dieta humana. La ingesta de betaína varía entre las poblaciones (rango: 100-400 mg / día) que también afecta la partición de lípidos.<sup>49,50</sup> Su metabolismo (Figura IV) vincula varios metabolitos que desempeñan un papel importante en la salud de los humanos y otros mamíferos, incluida la colina (una fuente importante de betaína) la Homocisteína y Metionina, que participan en su catabolismo.

La betaína es un donante de metilo que puede modificar genéticamente los genes lipogénicos y suprimir su expresión, también mejora la respiración mitocondrial para aumentar el gasto de energía.<sup>51</sup> Estudios anteriores han demostrado que los ratones DG inducidos por la alimentación con alto contenido de grasa tenían un peso fetal más alto en la mitad de la gestación y una mayor adiposidad corporal total en la última gestación, mientras que la suplementación con colina materna y betaína en ratones con DG disminuyó el sobrecrecimiento fetal y el exceso de adiposidad.<sup>52,53</sup> Además, se ha proporcionado evidencia para respaldar el mecanismo potencial en el que la colina y la betaína modifican el crecimiento fetal en ratones DG a través de alteraciones en el funcionamiento de la placenta, como la regulación descendente del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (Igf2) promotor del crecimiento placentario<sup>54</sup>. Diversos estudios también sugieren que la suplementación con colina materna altera la metilación del DNA y la angiogénesis en placentas y / o trofoblastos de roedores y humanos.<sup>55</sup>

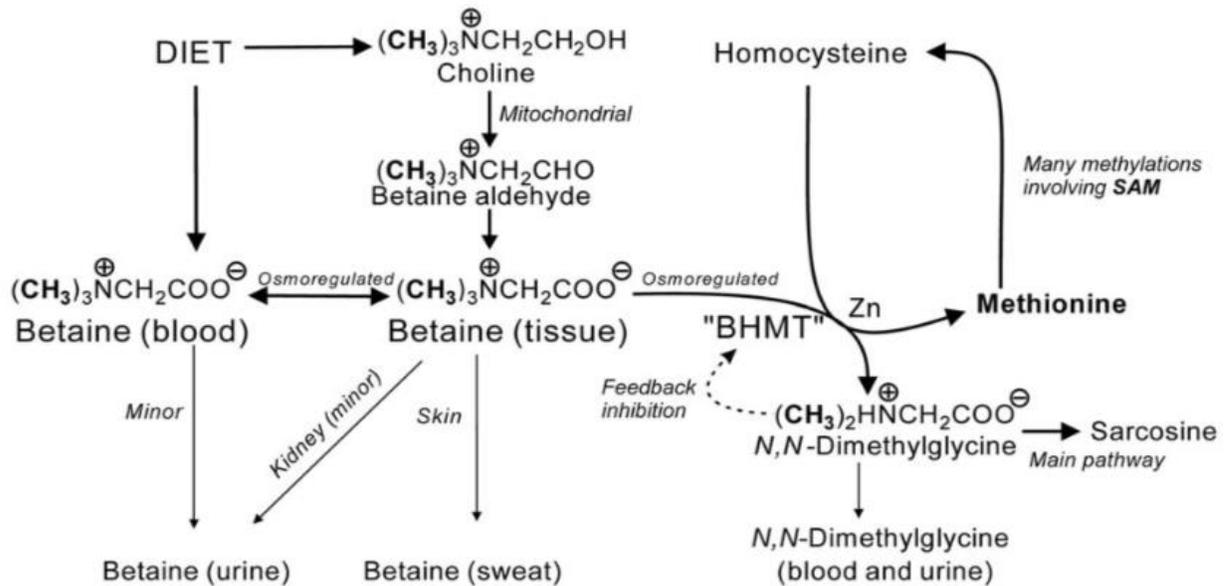


Figura IV. Metabolismo de la betaína. Vías metabólicas que implican la betaína. BHMT: betaína homocisteína metiltransferasa, una metaloenzima de zinc abundante en el hígado y los tejidos renales humanos. SAM: S-adenosilmetionina, donante del grupo metilo en el metabolismo humano. Tomado de Lever M, et al.<sup>27</sup>

### III.6.2 Colina

La carne roja, pollo, leche, huevo y pescado son fuentes ricas en colina. La ingesta recomendada de colina para adultos es de 550 mg / día para hombres, 425 mg / día para mujeres, 450 mg / día para mujeres embarazadas y 550 mg / día para mujeres lactantes.<sup>49,50</sup>

La colina es un componente dietético esencial para la función normal de todas las células.<sup>56</sup> Este o sus metabolitos aseguran la integridad estructural y las funciones de señalización de las membranas celulares; es la principal fuente de grupos metilo en la dieta (uno de los metabolitos de la colina, la betaína, participa en la metilación de la Homocisteína para formar la metionina); y afecta directamente a la neurotransmisión colinérgica y al transporte de lípidos desde el hígado.<sup>57</sup>

En la mayoría de los mamíferos, la ingestión prolongada (de semanas a meses) de una dieta deficiente en colina (y un contenido adecuado aunque limitado de metionina y folato) tiene consecuencias que incluyen trastornos hepáticos, renales, pancreáticos, de memoria y de crecimiento.<sup>58</sup> Se han publicado varias revisiones del metabolismo y las funciones de la colina.<sup>58,59</sup> Sólo una pequeña fracción de la colina dietética está acetilada (Figura V), catalizada por la actividad de la colina acetiltransferasa. Esta enzima está altamente concentrada en los terminales de las neuronas colinérgicas, pero también está presente en tejidos no nerviosos como la placenta. La disponibilidad de colina y acetil-CoA influye en la actividad de la acetiltransferasa de colina. En el cerebro, es poco probable que la colina acetiltransferasa esté saturada con alguno de sus sustratos, por lo que la disponibilidad de colina (y posiblemente de acetil-CoA) determina la tasa de síntesis de acetilcolina. El aumento de la síntesis de acetilcolina en el cerebro se asocia con una liberación aumentada en la sinapsis de este neurotransmisor.<sup>60</sup>

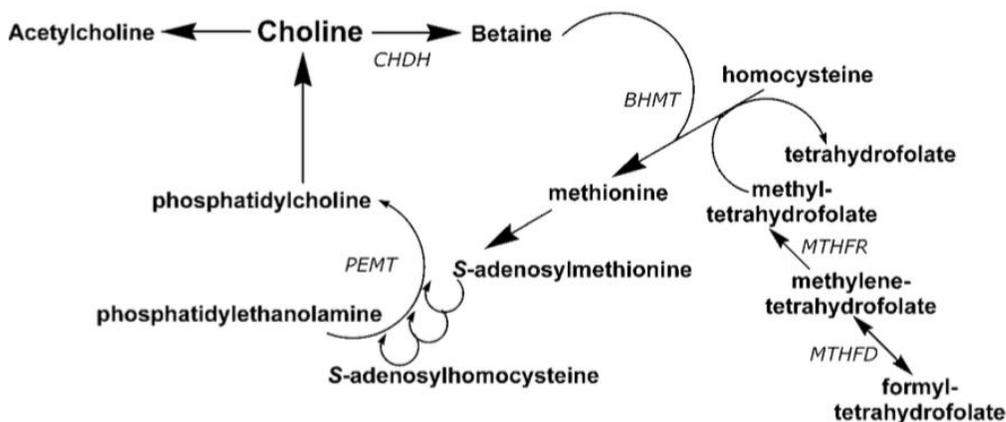


Figura V. Metabolismo de la colina y vínculos con la metionina y el metabolismo del folato. Las vías descritas están todas presentes en el hígado, con otros tejidos que tienen una o más de estas vías. BHMT, betaína homocisteína metiltransferasa; CHDH, colina deshidrogenasa; MTHFD, metil-tetrahidrofolato deshidrogenasa; MTHFR, metil-tetrahidrofolato reductasa; PEMT, fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa. Tomado de Lever M, et al.<sup>26</sup>

La colina es un nutriente esencial necesario para el crecimiento de células de mamíferos.<sup>61,62</sup> La deficiencia de colina en la dieta en animales adultos y humanos causa una variedad de anomalías sistémicas que incluyen: hígado graso, infertilidad, hipertensión, disminución de la colina plasmática y más; para una revisión.<sup>63</sup> En ratas que consumen una dieta normal, el embarazo causa un agotamiento dramático de las reservas de colina,<sup>64</sup> lo que sugiere que los requisitos de colina durante el embarazo aumentan.<sup>64</sup> La creciente necesidad de colina continúa en el período de lactancia. La leche humana y la leche de rata contienen aproximadamente 2 y 6 mM de compuestos que contienen colina, respectivamente.<sup>65-67</sup> La mayor parte de esta colina se deriva del plasma materno. Por lo tanto, el transporte de colina de madre a hijo a través de la glándula mamaria constituye un drenaje apreciable en los almacenes maternos de colina y la hace aún más vulnerable a los efectos de la deficiencia de colina. Las reservas de colina hepática son más bajas en ratas lactantes, seguidas de ratas preñadas, con ratas no apareadas que tienen los niveles más altos.<sup>68</sup>

Durante el desarrollo normal del feto al adulto, hay una disminución progresiva en la concentración de colina en la sangre que comienza en el útero. De hecho, las concentraciones séricas de colina son 6 a 7 veces más altas en el feto y en el

neonato que en el adulto.<sup>68</sup> Esta disminución en la concentración de colina sérica, hacia niveles de adultos, ocurre durante las primeras semanas de vida. Los altos niveles de colina que circulan en el feto probablemente aseguran una mayor disponibilidad de colina a los tejidos. Se sabe que el cerebro de rata en desarrollo extrae de forma eficiente la colina de la sangre y que los niveles de sangre y de cerebro varían con la disponibilidad de colina.<sup>69</sup> De hecho, la suplementación de colina a la gestante durante el período perinatal puede aumentar aún más las concentraciones de metabolito en la sangre y en el cerebro de la colina del feto.<sup>70</sup>

Las modificaciones de la disponibilidad de colina también cambian el momento de la migración y el compromiso con la diferenciación de células progenitoras de tipo neuronal en las regiones del hipocampo fetal.<sup>71</sup> Estos datos demuestran que las alteraciones en la colina de la dieta materna pueden afectar directamente la disponibilidad de colina en el cerebro y alterar el desarrollo embrionario.<sup>71</sup>

La colina es un nutriente esencial que tiene varias funciones en la estructura de la membrana celular, la señalización celular, la epigenética y la neurotransmisión (Figura VI). Cuando la colina se oxida a betaína, sus grupos metilo lábiles están disponibles para las reacciones de metilación. La colina y la betaína interactúan con el metabolismo de los macronutrientes y la energía de múltiples maneras, y por lo tanto pueden mitigar el exceso de macronutrientes observado en las dadas maternas y fetales afectadas por DMG. Por ejemplo, la fosfatidilcolina (PC) que contiene colina, sirve como un ligando del receptor activado por el proliferador de peroxisoma alfa (PPAR- $\alpha$ ) que activa la oxidación de ácidos grasos.<sup>72</sup>

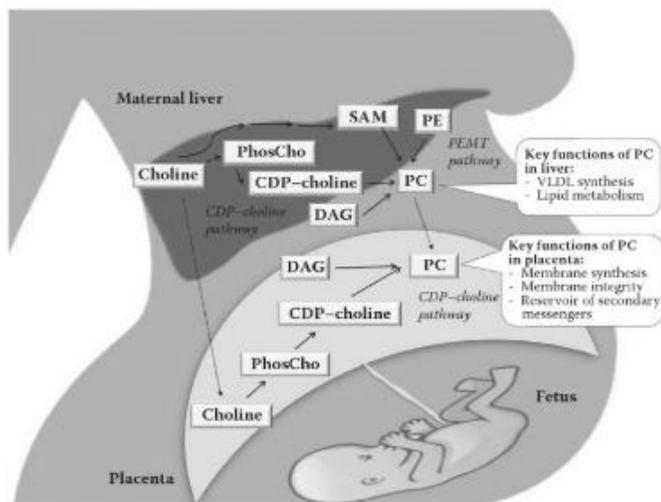


Figura VI. La fosfatidilcolina (PC) y sus funciones durante el embarazo. forma la membrana celular y mantiene su integridad, es un reservorio de importantes moléculas de señalización secundarias y se invoca en el metabolismo lipídico. La PC se produce en dos vías diferentes: citidina difosfato de fosfato (CDP): vía de la colina, que utiliza la colina como sustrato, y la vía de fosfatidiletanolamina endógena N-metiltransferasa (PEMT). DAG, diacilglicerol: SAM. S-adenosilmetionina. Tomado de Asim K, et al.<sup>47</sup>

La colina tiene múltiples vías fisiológicas que se pueden dividir en tres categorías:

- 1) Como un componente de fosfatidilcolina y esfingomielina, que son de importancia crítica en los lípidos de la membrana celular, surfactante pulmonar, lípidos biliares y lipoproteínas plasmáticas; 2) Como parte del neurotransmisor acetilcolina; y 3) Como factor importante en el metabolismo del metilo, como fuente de grupos de 1 carbono para la remetilación de homocisteína a metionina y para la acumulación de folato.<sup>73-75</sup>

Los requisitos nutricionales del sistema nervioso en desarrollo son complejos y no se comprenden adecuadamente. Una dieta baja en proteínas durante el embarazo da como resultado múltiples cambios en el desarrollo cerebral de los descendientes, que se manifiestan como puntuaciones inferiores en una variedad de pruebas cognitivas y de comportamiento tanto en sujetos humanos como en animales de experimentación.<sup>76</sup> Entre las necesidades de nutrientes individuales, el requerimiento de ácidos grasos esenciales en el desarrollo del sistema nervioso y de ácido fólico durante el período periconceptual en la prevención de defectos del

tubo neural es generalmente reconocido.<sup>77</sup> Los últimos resultados de la investigación llevaron a una nueva política pública dirigida a las mujeres en edad fértil para garantizar que sus dietas contengan cantidades adecuadas de folato. Se sabe menos sobre los requisitos de la colina en la nutrición pre y postnatal temprana.

### **III.6.3 Epigenética**

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG (sitios CpG), que son reconocidas por las enzimas ADN-metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN.<sup>78,79</sup> En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de novo, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal.

La betaína es el donante de metilo en la vía betaína homocisteína metil transferasas BHMT y es una metilamina, ya que contiene tres grupos metilo químicamente reactivos unidos a un átomo de nitrógeno. La betaína se puede producir a través de la oxidación irreversible de la colina a través de la colina deshidrogenasa y la betaína aldehído deshidrogenasa. La betaína se convierte en DMG ya que dona un grupo metilo a la homocisteína. Esta vía está mediada por BHMT, una enzima inducida por betaína e inhibida por DMG o SAM.<sup>80</sup> Se elimina una pequeña cantidad de DMG en la orina, y la mayoría de DMG se convierte a través de DMG-deshidrogenasa en sarcosina y glicina. La DMG-deshidrogenasa es una flavoproteína mitocondrial y una proteína de unión al folato transfiere una unidad de carbono a tetrahydrofolato para producir 5,10-metilenetetrahydrofolato. El

aminoácido no esencial glicina ingresa al ciclo del folato para producir 5,10-metilenetetrahidrofolato o se usa para sintetizar sales biliares, glutatión y proteínas como el colágeno. Alternativamente, la glicina se utiliza para la síntesis de creatina a través de guanidinoacetato en una vía dependiente de SAM.<sup>81</sup> El flujo de grupos metilo a través de la vía BHMT no depende del folato o la vitamina B12, pero existen varios mecanismos de diálogo cruzado entre la vía BHMT y folato. Se ha demostrado que la colina soporta indirectamente la metilación de homocisteína (Figura VII).<sup>82</sup> Se han informado diferencias relacionadas con el sexo y la edad en los requisitos de colina y los niveles en sangre. Las mujeres tienen concentraciones plasmáticas más bajas de betaína y colina que los hombres, así como los sujetos más jóvenes, mostraron concentraciones más bajas de betaína que los sujetos mayores.<sup>83</sup>

La fosfatidilcolina se puede formar a partir de colina o de fosfatidiletanolamina a través de la vía de fosfatidiletanolamina metiltransferasa (PEMT). La generación de colina a través de PEMT consume una cantidad significativa de SAM (3 moles de SAM para producir 1 mol de colina) y produce homocisteína las concentraciones de SAM se mantienen estimulando la vía BHMT.<sup>84</sup>

La evidencia disponible sugiere que la deficiencia de folato puede atenuarse en parte cuando la colina está disponible y viceversa. Por ejemplo, la colina y la fosfatidilcolina se agotaron en los hígados de las ratas agouti alimentadas con una dieta deficiente en folato.<sup>85</sup> Una dieta deficiente en colina puede aumentar la utilización de SAM en el hígado, para convertir fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina a través de PEMT.<sup>85</sup>

Los estudios en animales han demostrado que la betaína plasmática es un mal predictor del contenido de betaína en los tejidos. Las concentraciones de DMG en plasma pueden ser un buen indicador de la betaína utilizada como donante de metilo. A pesar de la importancia cuestionable de la betaína plasmática baja y alta, la betaína plasmática es un determinante significativo de la concentración

plasmática de homocisteína. Un estudio reciente en mujeres embarazadas mostró que las mujeres con bajo contenido de folato plasmático a las 24-27 semanas de gestación ( $<11.4$  nmol / L) tenían una menor cantidad de betaína plasmática y un mayor DMG y homocisteína hasta el final del embarazo en comparación con las mujeres con folato plasmático por encima de  $11,4$  nmol/L.<sup>86</sup> La betaína plasmática es un predictor negativo del aumento de la tHcy plasmática después de la carga de metionina en sujetos con bajo contenido de folato. Además, una dieta baja en metionina mejoró ligeramente la vía BHMT en lugar de la vía de transulfuración.<sup>86</sup> Del mismo modo, en casos de deficiencia de folato, la vía BHMT parece ser un método factible para volver a metilar la homocisteína después de una carga de metionina. En contraste, la suplementación con folato causa un aumento dependiente de la dosis de betaína en plasma, lo que sugiere que la betaína se está utilizando en menor medida. En individuos no suplementados, las concentraciones de folato y betaína no mostraron correlación, y el folato en plasma no fue un predictor significativo de betaína en plasma.<sup>86</sup> Otro estudio que examinó a individuos sanos (edad media, 36 años) que no recibían suplementos reveló una relación directa entre la betaína plasmática, la colina y folato sérico, pero ninguna relación con la tHcy plasmática. Las concentraciones plasmáticas de SAM se correlacionaron positivamente con los niveles plasmáticos de colina y DMG, pero no con los de betaína.<sup>86</sup>

Los cambios en las concentraciones de homocisteína reflejan sólo un lado de la carga metabólica de la deficiencia del grupo metilo o la suplementación de nutrientes. El folato, la betaína y la colina son determinantes significativos de las concentraciones plasmáticas en ayunas de homocisteína.<sup>86</sup>

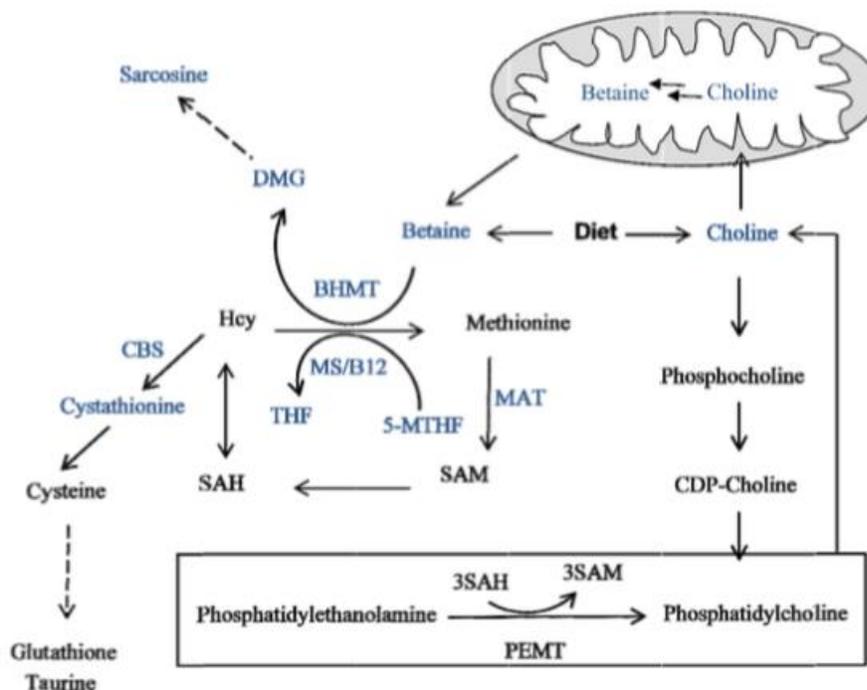


Figura VII. Ciclo de metilación. BHMT: betaína homocisteína metiltransferasa, CBS: cistationina beta sintasa, DMG: dimetilglicina, Hcy: homocisteína, MAT: L-metionina S-adenosiltransferasa, MS: metionina sintasa, PEMT: fosfatidiletanolamina metiltransferasa, 5-MTHte: 5-MTHte: 5-MTHte 5: Mtefa -adenosilhomocisteína, SAM: S-adenosilmetionina, THF: tetrahidrolato. Tomado de Bielawski DM.<sup>84</sup>

### III.7 Cromatografía líquida ultra alta resolución (UPLC)

La espectrometría de masas separa los analitos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y reporta la abundancia de cada ion analito. Los datos se muestran como una gráfica (cromatograma) de la abundancia de iones frente a  $m/z$  para todos los iones detectados. Todos los datos se basan en el análisis de iones analitos en la fase gaseosa. Es importante considerar que el espectrómetro de masas mide las masas isotópicas a diferencia del peso molecular, el cual es un promedio ponderado de todos los isótopos presentes en un compuesto.<sup>88</sup>

Todos los sistemas de espectrómetro de masas tienen cuatro componentes principales, la fuente donde se produce la ionización, el analizador de masas donde los iones analito se separan de acuerdo con sus relaciones  $m/z$ , el detector donde

se determina la abundancia de iones y el sistema de datos donde se analizan los datos.<sup>86</sup>

### III.7.1 Fuentes de iones- Ionización Electro spray (ESI)

La reacción más crítica en espectrometría de masas es la conversión de analitos en iones de fase gaseosa. La fuente de ionización se va a determinar dependiendo de la polaridad de los analitos a cuantificar. La fuente de ionización ESI es una de las dos técnicas de ionización primaria más utilizadas en la actualidad opera bajo los principios básicos de una celda electroquímica y ocurre a la presión atmosférica.<sup>87</sup>

La ESI es una técnica de ionización suave, se rocía (nebuliza) el eluyente del LC en una cámara de nebulización a presión atmosférica en presencia de un campo electrostático fuerte y de gas de secado (Figura VIII). El campo electrostático se produce entre el nebulizador, que en este diseño se encuentra a tierra y el capilar, que está a alta tensión.

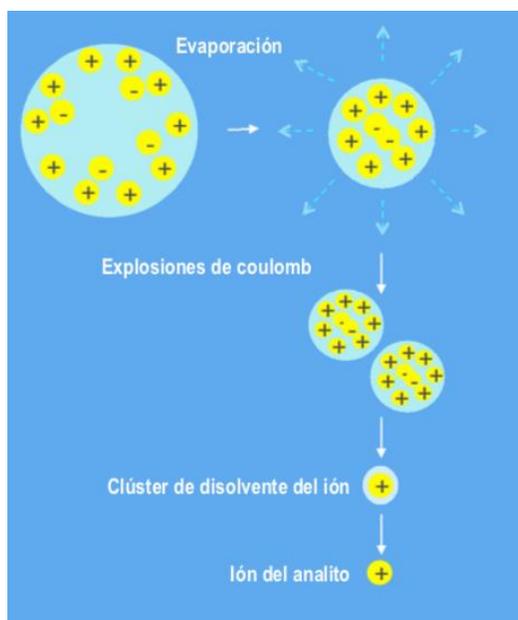


Figura VIII. Fuente de ionización de electro spray. Tomado de Sparkman J.<sup>87</sup>

### III.7.2 Funcionamiento Ionización proceso ESI

El nebulizador produce un tamaño uniforme de la gota, las gotas cargadas son atraídas hacia la capilaridad dieléctrica y la corriente de nitrógeno caliente que rodea el capilar reduce el tamaño de las gotas este proceso se llama desolvatación (Figura IX).

La gotas se siguen reduciendo a hasta que las fuerzas electrostáticas de repulsión (Coulomb) superan a las fuerzas de cohesión de las mismas, lo que provoca la explosión de dichas gotas.

Este proceso se repite hasta que los iones del analito finalmente se absorben en la fase gaseosa, llevados por un campo eléctrico fuerte en la superficie de las micro gota. Este proceso se llama evaporación de iones.

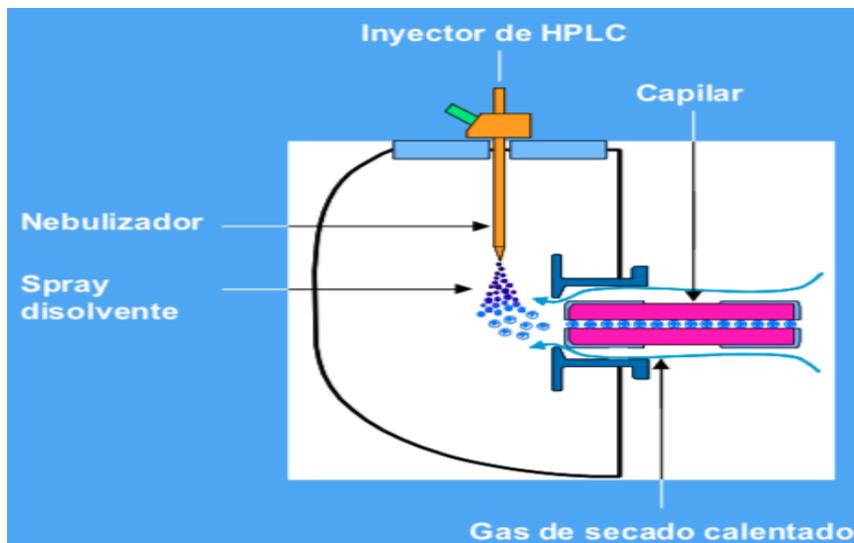


Figura IX. Funcionamiento ionización electro spray. Tomado de Sparkman J<sup>87</sup>

Normalmente, el eluyente de un cromatógrafo de líquidos ingresa a la fuente a través de una aguja de electropulverización y al campo eléctrico creado entre el alto voltaje aplicado a la aguja y el contra electrodo que forma una celda electrolítica

como se muestra en la (Figura X). El método de carga más común utilizado hoy en día implica la adición o eliminación de un ion de hidrógeno para producir una especie cargada.<sup>87</sup> La adición de un ión de hidrógeno se produce a un pH bajo y produce la ionización de molécula cargada positivamente  $[M + H]^+$ . Los iones cargados negativamente se producen por la eliminación de un ion hidrógeno, a un pH alto, y en consecuencia forman la molécula de ion  $[M-H]^-$ . Mientras que una sola carga es típica de moléculas pequeñas, los compuestos cuya masa es  $<1,000$  Da, los iones de analito con carga múltiple son típicos de biomoléculas grandes como proteínas, péptidos, oligonucleótidos y otros biopolímeros. Estas biomoléculas grandes tienen múltiples sitios de ionización. Es típico que estos analitos produzcan más de un ion porque, aunque la masa del analito sigue siendo la misma, la relación  $m/z$  será diferente dependiendo del número de cargas adquiridas durante la ionización. La relación  $m/z$  se puede determinar mediante las siguientes fórmulas.<sup>87</sup>

Para iones cargados positivamente: 
$$m/z = \frac{(M + zm_p)}{z}$$

Para iones cargados negativamente: 
$$m/z = \frac{(M - zm_p)}{z}$$

donde  $M$  es la masa molecular del analito en Daltons (Da),  $z$  es la carga y  $m_p$  es la masa de un protón en Daltons, nominalmente 1 o 1.008.

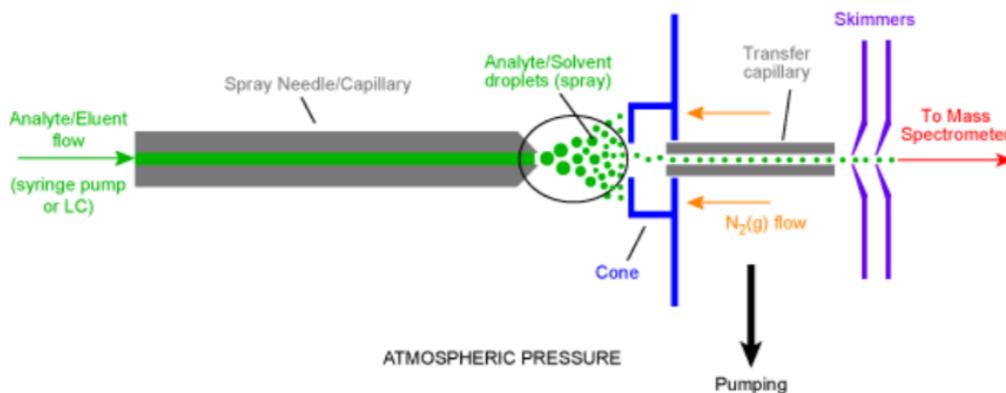


Figura X. Aguja de electropulverización. Tomado de Sparkman J.<sup>87</sup>

### III.7.3 Analizadores de masas

El componente responsable de separar los analitos de acuerdo con su relación  $m/z$  es el analizador de masas. Hay cinco tipos principales de analizadores de masa, tiempo de vuelo (TOF), sector magnético, transformada de Fourier ion-ciclotrón resonancia (FTICR), cuadrupolo y trampa de iones cuadrupolo. Cada uno de estos analizadores de masas separa los iones de una manera diferente, por lo que un analizador de masas específico puede ser más adecuado para un tipo particular de análisis. Las características específicas de cada analizador de masas, incluyen el poder de resolución de masa, la precisión de la masa, el rango de masa, el rango dinámico lineal, la sensibilidad de abundancia, la precisión, la eficiencia, el ciclo de trabajo, la velocidad, la compatibilidad del ionizador, el costo y el tamaño.<sup>87</sup>

### III.7.4 Cuadropolo

El analizador de masas cuadrupolo es el tipo de espectrómetro de masas más utilizado debido a la automatización fácil y de bajo costo. Se compone de cuatro superficies paralelas, generalmente en forma de varilla cilíndrica, compuestas de cerámica chapada en oro o en molibdeno.<sup>87</sup>

Los polos opuestos están unidos electrónicamente entre sí, donde las fuentes de energía de radiofrecuencia (RF) y de corriente continua (CC) crean un campo eléctrico bidimensional que afecta la trayectoria de los iones y, por lo tanto, también la detección de iones.<sup>87</sup> La separación de masas se basa estrictamente en la relación  $m/z$  de los iones analitos. Se mantiene una relación RF/CC constante a medida que la amplitud de RF y los potenciales de CC se cambian (en rampa), permitiendo que los iones con trayectorias estables se desplacen por el eje z hacia el detector.<sup>87</sup> El espectro de masas resultante generado, cuando la relación RF / DC aumenta, se denomina cromatograma de iones total.

ACQUITY UPLC<sup>®</sup> de Waters logran aumentar notablemente la resolución, la velocidad y la sensibilidad en aplicaciones de cromatografía líquida, en comparación con los sistemas convencionales.<sup>87</sup>

La cromatografía líquida ultra alta resolución emplea columnas con rellenos de partículas redondeadas de 1.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y presiones de funcionamiento máximas de (1 034 bar, 15 000 psi). La ecuación de van Deemter, una fórmula empírica que describe la relación entre la velocidad lineal y la eficacia de la columna, considera el tamaño de las partículas como una de las variables. Así, la ecuación se puede utilizar para caracterizar el rendimiento teórico a lo largo de un rango de tamaños de partícula (Figura XI).<sup>87</sup>

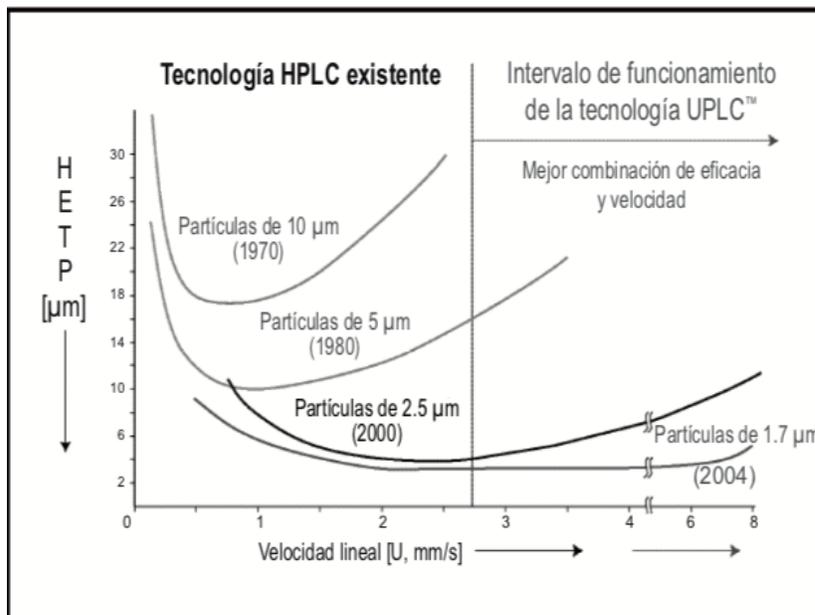


Figura XI. Tamaño de partículas en la cromatografía líquida. Tomado de Sparkman.<sup>87</sup>

Resulta evidente, que la utilización de partículas de 1.7  $\mu\text{m}$  proporciona una mayor eficacia que conduce a incrementos de caudal (un HETP menor indica una mayor eficacia) (Figura XI). Cuando se trabaja en esta área del gráfico, la capacidad del pico y la velocidad de una separación pueden establecer límites por encima de los de la tecnología HPLC convencional. Waters ha definido este nuevo nivel de rendimiento como cromatografía Ultra Performance.<sup>87</sup>

Tanto la insuficiencia como el exceso de nutrientes de un carbono como colina, y betaína durante el embarazo se han asociado a la DG y otras enfermedades. Sin embargo, no se ha establecido claramente esta asociación. Suponemos que la DG puede afectar las concentraciones de betaína y colina en el feto, posiblemente participando en la programación fetal del recién nacido.

Es por eso que se cuantificaron la colina y betaína en muestras de suero tanto en madres como en el recién nacido, para realizar una comparativa de concentraciones de estos metabolitos e identificar si hay una disminución o aumento de estos entre las madres y recién nacidos con o sin DG.

#### **IV. Planteamiento del problema.**

Los hábitos de alimentación en nuestra población han cambiado. El sobrepeso y la obesidad condicionan a modificaciones en la estructura 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 alterado en el espacio y tiempo favoreciendo el desarrollo de obesidad, enfermedad cardiovascular, DG y DT2. Para que se lleve la adición del grupo metilo a las citosinas, se requiere una concentración adecuada betaína y colina entre otros metabolitos que participan en el ciclo de un carbono sin embargo, no se ha establecido claramente esta asociación.

Derivado de lo anterior se plantean las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuál es la relación de la concentración de betaína y colina en el binomio madre-recién nacido con y sin diabetes gestacional?

## **V. Hipótesis**

Las concentraciones de betaína y colina en recién nacidos con y sin DG serán mayores que en madres con y sin DG.

## **VI. Objetivo**

Conocer la concentración por UPLC de betaína y colina del binomio madre-recién nacido con y sin diabetes gestacional.

## **VII. Método**

### **VII.I Diseño del estudio**

Observacional, prolectivo, transversal y comparativo. Previa aceptación y firma del consentimiento informado, 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.

#### **VII.I.2 Universo de estudio**

Las muestras de sangre de cordón umbilical de los recién nacidos, fueron obtenidas de la clínica de Gineco Obstetricia No.4 del IMSS. Se tomaron 134 muestras de suero de recién nacidos y 128 muestras de madres de acorde a los siguientes criterios.

### **VII.2 Criterios de inclusión**

- Participaron madres con DG y madres sin DG y sus hijos recién nacidos, tanto del género masculino como femenino.
- Embarazo de término.
- Madres con embarazos únicos o múltiples.
- Madres mayores de 18 años y menores de 40 años de edad.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

#### **VII.2.1 Criterios de exclusión**

- Derechohabientes con vigencia transitoria o estacional.

- Pacientes que tengan otras enfermedades que puedan reducir la sobrevida o puedan confundir la ocurrencia de eventos (VIH, cirrosis hepática, cualquier neoplasia maligna, etc.)
- Sujetos que no cuentan con domicilio permanente o que no puedan localizarse por vía telefónica sea en su propia casa o con un familiar.

### **VII.3 Variables del estudio**

#### **⇒ Variable independiente**

- Diabetes gestacional, glucosa, hemoglobina glucosilada, IMC, peso y talla.

#### **⇒ Variable dependiente**

- Concentración de betaína y colina.

Cuadro III. Operacionalización de variables

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de Variable</b>
Diabetes gestacional	Cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el embarazo y generalmente se resuelve al término del mismo.	Si / No	Cualitativa nominal
Peso neonatal	Valoración en gramos de la masa corporal del neonato, considerada dentro de la primera hora de vida.	Expresado en gramos	Cuantitativa de razón
Talla neonatal	Estatura de una persona, medida desde la planta del pie hasta el vértice de la cabeza.	Expresado en centímetros	Cuantitativa de razón
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	Expresado en centímetros	Cuantitativa de razón

Cuadro IV. Operacionalización de variables

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de Variable</b>
HbA1C	Grupo de sustancias que se forma a partir de reacciones bioquímicas entre la hemoglobina A(HbA) y algunos azúcares presentes en la circulación sanguínea.	Expresado en %	Cuantitativa de razón
Colina	Nutriente esencial, constituyente de la lecitina, presente en varios órganos de plantas y animales.	Expresada en $\mu\text{mol/L}$	Cuantitativa de razón
Betaína (Trimetilglicina)	Aminoácido derivado de la oxidación de colina el cual es un cofactor importante en las reacciones de metilación	Expresada en $\mu\text{mol/L}$	Cuantitativa de razón

## VII.4 Procedimiento

### Reactivos

- (trimetil-d9) - Cloruro de colina (SIGMA) presentación 1g
- Betaína calidad estándar (USP) presentación 100 mg
- Colina calidad estándar (SIGMA)
- Formiato de amonio (pH 3.5 disolvente A) (SIGMA)
- Acetonitrilo grado LC/MS (disolvente B) (SIGMA)
- Metanol LC/MS (SIGMA)
- Bicarbonato de amonio

### Muestra biológica

- Muestra de sangre de cordón umbilical (suero)
- Muestra de sangre venosa (suero)

### Equipo

- Sistema ACQUITY UPLC Waters.
- Columna Acquity UPLC BEH HILIC 1.7 $\mu$ m 2.1x100mm.

- Filtro en línea de 0.22  $\mu\text{m}$  mantenido a 10°C
- Fuente de ionización por electrospray calentada

#### **VII.4.1 Preparación de soluciones.**

##### **Fase móvil A (solución formato de amonio 10 mM, pH 3.5).**

Se pesaron 1,26g de formato de amonio y se transfirieron a un matraz aforado de 1 L, el formato de amonio se disolvió y se llevó a un volumen de aforo con agua grado LC/MS. Se Ajustó a un pH a 3,5 con ácido fórmico.

##### **Fase móvil B (acetonitrilo grado LC/MS)**

###### **Solución metanol: agua (50:50 (v/v))**

Se midió por separado y con probeta graduada, 50 mL de agua grado LC/MS y se mezcló con 50 mL de metanol grado LC/MS.

###### **Solución buffer bicarbonato de amonio 50 mM.**

Se pesaron 3,95 g de bicarbonato de amonio y se transfirieron a un matraz aforado de 1 L. Se disolvieron y se llevó a un volumen de aforo con agua LC/MS. Se filtró con membrana de nylon de 0,2 micras.

###### **Solución acetonitrilo:metanol (75:25).**

Se midieron por separado y con probeta graduada, 75 ml de acetonitrilo grado LC/MS y se mezclaron con 25 mL de metanol LC/MS.

### **Preparación de soluciones stock de referencia de colina, colina deuterada, betaína (concentración 1000 µg/mL)**

Se pesaron por separado, 20 mg de materiales de referencia de colina, (trimetil-d9)- cloruro de colina y betaína se transfirieron cada uno a un matraz aforado de 20 mL. Se diluyeron con 10 mL de metanol:agua (50:50 v/v). Las soluciones alcanzaron la temperatura ambiente y se llevaron a volumen de aforo con solución metanol: agua (50:50).

### **Preparación de soluciones estándares intermedias de colina, colina deuterada y betaína (concentración 10 µg/mL).**

Se tomó un 1mL de cada una de las soluciones anteriores y se transfirieron de forma independiente a matraces aforados de 100 mL. Se diluyó y se llevó a un volumen de aforo con solución de bicarbonato de amonio 50 mM.

### **Preparación de solución estándar interno (colina deuterada (0,5 µg/mL)).**

Se tomó un 1 mL de cada una de las soluciones de colina deuterada y se transfirieron a un matraz aforado de 20 mL. Se Diluyó y llevó a volumen de aforo con metanol LC/MS.

### **Preparación de soluciones estándares de trabajo de colina y betaína (10 µg/mL)**

Se midió con micropipeta 500 µL del estándar de colina y betaína (10 µg/mL) y se colocó en tres tubos cónicos de 15 mL. Se adicionó 200 µL de solución estándar interno y se agitó con vórtex. Se centrifugó cada uno de los tubos a 10000 rcf durante 5 minutos. Para finalizar el proceso de centrifugación, se tomaron 200 µL

del sobrenadante de cada una de las soluciones y se diluyó con 1000  $\mu\text{L}$  de solución ACN:MEOH (75:25 (v/v)) y se agitó con vórtex.

Se realizaron las diluciones correspondientes para cada uno de los niveles de la curva de calibración a partir de las soluciones stocks preparados anteriormente de acuerdo a lo descrito.

Cuadro V. Preparación de curva de calibración colina.

Concentración final ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\mu\text{L}$ solución estándar de trabajo colina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\mu\text{L}$ solución ACN:MEOH (75:25 v/v))
<b>0,010</b>	0,10	99,90
<b>0,050</b>	0,50	99,50
<b>0,100</b>	1,00	99,00
<b>0,500</b>	5,00	95,00
<b>1,000</b>	10,00	90,00
<b>5,000</b>	50,00	50,00

Cuadro VI. Preparación de curva de calibración betaína.

Concentración final ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\mu\text{L}$ solución estándar de trabajo betaína (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\mu\text{L}$ solución ACN:MEOH (75:25 v/v))
<b>0,050</b>	0,50	99,50
<b>0,100</b>	1,00	99,00
<b>0,500</b>	5,00	95,00
<b>1,000</b>	10,00	90,00
<b>1,500</b>	15,00	85,00
<b>2,000</b>	20,00	80,00

#### **VII.4.2 Preparación de muestras.**

Se midió con una micropipeta 50  $\mu$ L de la muestra para ser analizada (suero) y colocar en un tubo Eppendorf. Se adicionaron 200  $\mu$ L de solución estándar interno y agitó con vórtex a 10000 g durante 5 minutos. Al finalizar el proceso de centrifugación, se tomaron 20  $\mu$ L del sobrenadante y se diluyeron con 100  $\mu$ L de solución acetonitrilo: metanol (75:25 v/v) se agitaron con vórtex.

#### **VII.4.3 Equipo y condiciones**

Las muestras se analizaron en ACQUITY UPLC Waters bajo las condiciones cromatograficas siguientes. (CuadroVII)

## Cuadro VII. Condiciones cromatográficas

<b>Condiciones cromatográficas</b>	
Fase móvil A: Formiato de amonio 10mM	Columna: Acquity UPLC BEH HILIC 1.7 $\mu$ m. 2.1 x 100 mm.
Fase móvil B: Acetonitrilo LC/MS Acetonitrilo LC/MS	Sistema cromatográfico: Acquity Class I acoplado a Xevo
Solución de lavado débil: Acetonitrilo 50%	Temperatura de Automuestreados: 5°C.
Solución de lavado fuerte: H <sub>2</sub> O: ACN: MEOH: 2- PROPANOL: ÁC.FORMICO: 25:25:25:25:1%	Temperatura de columna: Ambiente ( 17 °C) Flujo: 0.4 ml/min
Tiempo de corrida 5 minutos	Volumen de inyección: 10.5 y 2.5 $\mu$ l.
<b>Condiciones de ionización en espectrómetro de masas</b>	
Voltaje de capital: 3.5 kV	Energía de colisión: 10 V
Voltaje de cono: 15 V	Modo de infusión: Electrospray
Temperatura de desolvatación: 350 °C	Polaridad: Positiva
Flujo de gas de desolvatación: 350 L/h	Flujo de gas de cono: 50 L/h

## **VII.5 Cuantificación de hemoglobina glucosilada**

La cuantificación de hemoglobina glucosilada se realizó mediante el sistema VARIANT II turbo HbA1c el cual utiliza los principios de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación y la determinación de hemoglobinas normales y variantes anormales. El sistema VARIANT II es un método integrado para la preparación de muestras, la separación y determinación de hemoglobinas concretas en sangre, es un analizador de hemoglobina de alto rendimiento totalmente automatizado el cual se compone de dos módulos: la estación de muestreo VARIANT II Sampling Station (VSS) y la estación de cromatografía VARIANT II Chromatographic Station (VCS).

La muestra es transportada por el tampón hasta el cartucho de análisis, donde se separan sus componentes. Después, los componentes separados atraviesan el detector de longitud de onda doble, donde se mide su absorbancia a 415 nm. El ruido de fondo se reduce mediante el uso de una longitud de onda secundaria a 690 nm. Los datos de absorbancia se transmiten del detector al PC y el software CDM los muestra como un cromatograma en tiempo real (gráfico de absorbancia frente a tiempo).

Los datos procesados se incorporan a un informe impreso, que contiene la siguiente información:

1. Un resumen completo de los componentes detectados en la muestra (identificación de picos, tiempo de retención, área).
2. El cromatograma de la muestra.
3. La fecha y la hora del análisis.
4. El número del vial y la identificación de la muestra.

### **VII.5.1 Preparación de reactivos y muestras**

Cebador de sangre:

- Para la preparación del cebador se reconstituyo cada vial con 1 ml de agua desionizada y se mezcló suavemente. Posteriormente se dejó reposar el vial a temperatura ambiente por 10 minutos.
- La mezcla es estable durante 1 día a una temperatura entre 2 y 8°C.

### **VII.5.2 Calibradores**

- Se utilizaron 2 calibradores (nivel 1 y nivel 2). El cual se reconstituyeron cada vial con 7 ml de diluyente de calibrador frío y se mezcló.
- Se dejó reposar por 2 minutos. Esta mezcla es estable durante 24 horas a una temperatura entre 2 y 8°C.

### **VII.5.3 Controles Lyphochek®**

- Para los controles se reconstituyo cada vial con 0,5 ml de agua desionizada se mezclaron suavemente y se dejaron reposar entre 5 y 10 minutos.
- Se diluyeron los controles 1:300 antes del análisis (5 µl de control en 1,5 ml de solución de lavado/diluyente).
- Los controles son estables durante 7 días a una temperatura entre 2 y 8°C.

### **Muestras de sanguíneas.**

- Las muestras sanguíneas se recolectaron en tubos con EDTA.

### **VII.5.4 Calibración**

- Se realizó la calibración del equipo antes de la cuantificación de las muestras.

La calibración se realizó de la siguiente manera:

1. Previamente se instaló un software de gestión de datos clínicos Clínica Data Managament (CDM) el cual nos permite el manejo del equipo, la importación de información de cada muestra y exportación de resultados.
2. Para comenzar con la calibración del equipo se procedió a abrir el programa ir a la ventana de Setup/Sample Types/Calibrator (Configuración/Tipos de muestra/Calibrador) seleccionamos la opción Enable Delta Factor (Permitir factor delta) posteriormente seleccionamos Stop Worklist (Detener lista de trabajo) en la lista desplegable “Action if outside limits” (Acción si está fuera de los límites).
3. Posteriormente se colocó lo siguiente en una gradilla de muestras (CuadroVIII).

Cuadro VIII. Controles y calibradores Lyphochek.

Posición de tubo	Etiqueta de adaptador	Tipo de muestra	Reactivo
1	BLANK	BL	Muestra o control prediluidos (1 ml)
2	Calibrador nivel 1	C1	Calibrador, Nivel 1 (1 ml)
3	Calibrador nivel 2	C2	Calibrador, Nivel 2 (1 ml)
4	Control nivel 1	LC	Control de la calidad bajo
5	Control nivel 2	HC	Control de la calidad alto
6 a N	----	P	Muestras de pacientes
N + 1	Control nivel1	LC	Control de la calidad bajo (opcional)
N + 2	Control nivel 2	HC	Control de la calidad alto (opcional)
N + 3	STOP	----	----

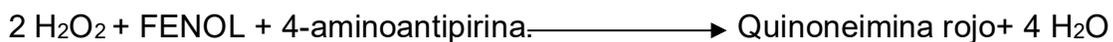
4. Se inició la calibración.
5. Al terminar la calibración se procedió a la cuantificación de muestras.
6. Para la cuantificación de muestras se colocó el tubo de EDTA en una gradilla se introdujo al equipo y se procedió a la cuantificación.

## VII.6 Cuantificación de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó mediante la glucosa oxidasa con el equipo Ilab 350 (MA,USA).

Las mediciones de glucosa se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de trastornos del metabolismo de los carbohidratos, tales como la diabetes mellitus, la hipoglucemia y la hiperglucemia.

Principio de la prueba.



El aumento de absorbancia generado por el colorante rojo es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

### VII.5.1 Obtención de la muestra.

Se tomó la muestra al paciente en un tubo de colección rojo para obtener el suero.

Se separó después de la colección de la muestra sanguínea para evitar la pérdida debido a la glucolisis.

### Calibración

La calibración del ILab 350 se realizó cada 14 días, o cuando se utilizó un nuevo lote de reactivo. El blanco reactivo se realizó diariamente o antes de los ensayos de los pacientes.

Intervalo de referencia.

Suero 74-106mg/dl (4.1 a 5.9 mmol/L)

## VIII. Resultados

### Características de la población

Se obtuvieron un total de 128 muestras de madres de las cuales 58 fueron diagnosticadas con DG y 70 sin DG, dentro del mismo grupo se dieron 8 casos de embarazo gemelar, 6 de ellos en las madres sin DG dando un total de 76 RN-SDG y 2 casos de las madres con DG dando un total de 58 RN con DG. Para cada uno de los individuos se registraron sus medidas somatométricas y se cuantificó la glucosa, HbA1c, colina y betaína.

**Cuadro IX.** Valores antropométricos del recién nacido relación entre los metabolitos colina y betaína.

	Recién Nacidos ( n =134)		
	SDG = 76	DG=58	Valor de <i>P</i>
Peso (kg)	3.0 ± 0.5	3.3 ± 0.4	*0.001
Talla (cm)	48.5 ± 2.1	49.7 ± 1.7	*0.002
PC (cm)	35.5 ± 1.4	35.1 ± 1.2	*0.018
Glucosa (mg/dL)	58.9 ± 12.6	58.4 ± 12.0	0.836
Colina (µg/mL)	7.41 ± 1.8	6.46 ± 2.1	*0.006
Betaína (µg/mL)	3.03 ± 0.76	2.98 ± 0.9	0.770

PC: Perímetro craneal. En el cuadro se presentan medias y desviaciones estándar. \* Indica valores significativos.

**Cuadro X.** Características antropométricas y bioquímicas de las madres.

Madres ( n =128)			
	SDG = 70	DG=58	Valor de <i>P</i>
Edad (años)	29.4±5.13	32.4±5.81	* 0.004
IMC Pregestacional (Kg)	26.5 ± 3.0	26.3 ± 2.7	0.677
Glucosa ( mg/dL)	77.4 ± 15.8	73.7± 16.9	0.318
HbA1c (%)	5.2 ± 0.3	5.6 ± 0.4	*0.001
Colina (µg/mL)	2.36 ± 0.67	2.54± 0.59	0.059
Betaína (µg/mL)	1.47 ± 0.52	1.84 ± 0.77	*0.002

IMC: Índice de masa corporal; HbA1c: Hemoglobina glucosilada. \* Indica valores significativos. Glucosa y Hemoglobina

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

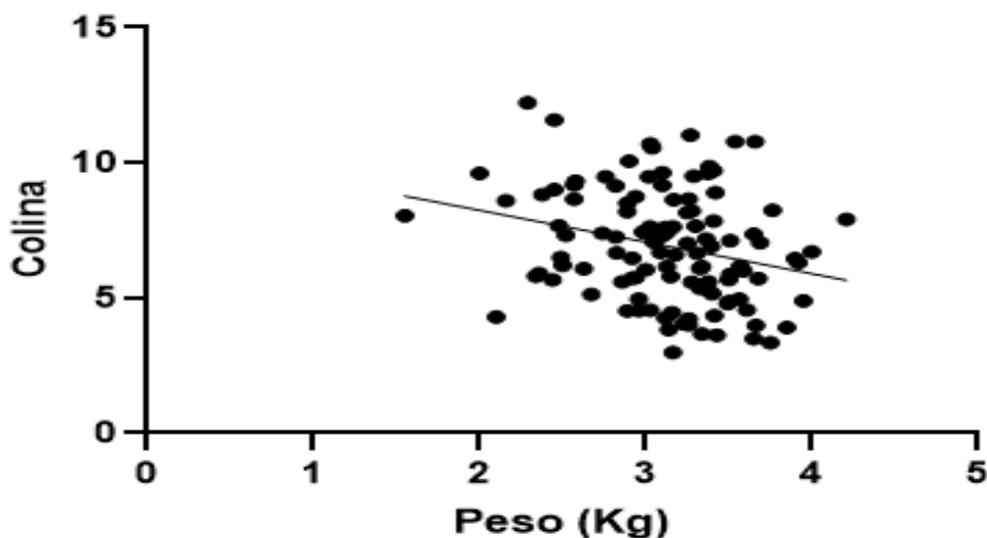


Figura XII. Relación de valores de colina y peso en recién nacido con y sin DG. El resultado fue significativo ( *P* = 0.0048).

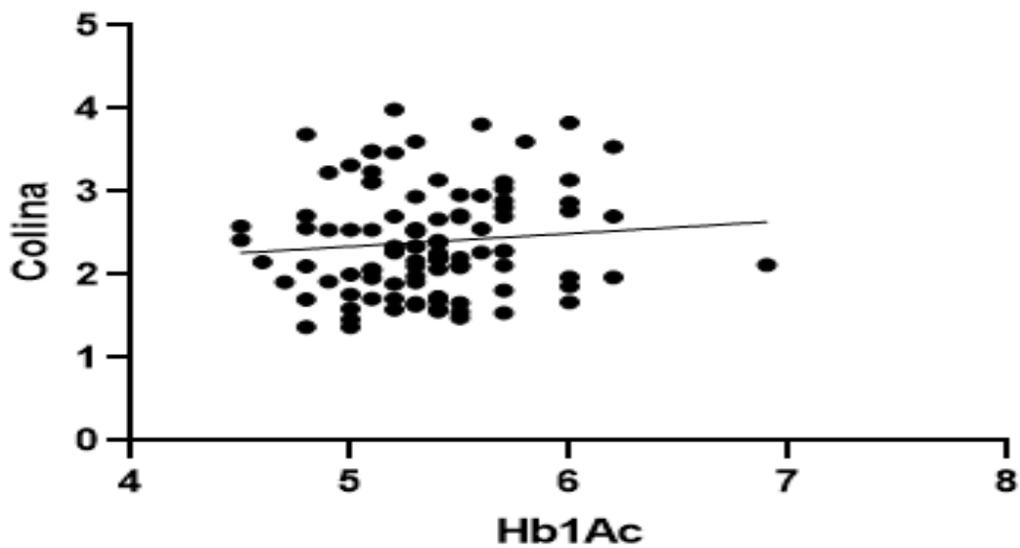


Figura XIII. Relación de valores de colina y Hb1Ac de madres con y sin DG. El resultado fue no significativo ( $P = 0.3313$ )

## IX. Discusión

La DG se diagnostica por primera vez en el segundo y tercer trimestre de embarazo, existe una serie de complicaciones maternas y fetales a causa de la hiperglucemia materna como son el riesgo elevado de morbilidad en el embarazo, preeclampsia e hipertensión arterial así como alteraciones a largo plazo como obesidad, DT2 y síndrome metabólico. Referente a las complicaciones de los RN pueden presentar macrosomía al momento del nacimiento, así como complicaciones a largo plazo como obesidad, DT2 y síndrome metabólico.

Los factores que influyen en desarrollo de la DG son de diversa índole como la etnia, edad, obesidad y una serie de hormonas placentarias anti-insulina. En este estudio se observó que la edad fue diferente entre los dos grupos y se sabe que éste es un factor de riesgo para el desarrollo de DG.

La colina es un nutriente esencial que tiene varias funciones en la estructura de la membrana celular, la neurotransmisión, la señalización celular y la epigenética. Cuando la colina se oxida a betaína, sus grupos metilo lábiles están disponibles para las reacciones de metilación, esta oxidación se lleva a cabo en la mitocondria en la cual sus principales enzimas son colina deshidrogenasa y betaína homocisteína metiltransferasa.

Las concentraciones de colina en plasma fetal son 3 veces más altas que en el plasma materno al término de la gestación. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de colina varían más de 5 veces en los RN al nacer, lo que sugiere que las vías para la transferencia de colina materna a fetal no están saturadas y pueden estar influenciadas por la nutrición materna de colina para la remetilación de homocisteína a metionina y para la acumulación de folato.<sup>56</sup>

De acuerdo con los valores antropométricos se observaron valores significativos en talla, IMC y PC en recién nacido, siempre mayor en los RN-DG (Cuadro IX). Diversos estudios han reportado que la hiperglucemia materna genera hiperglucemia intrauterina lo que a su vez, da lugar a la hiperinsulinemia fetal con modificación en el patrón de crecimiento y alteración posterior del metabolismo fetal.<sup>15,16</sup>

De acuerdo con los resultados de glucosa tanto en madres y RN no se obtuvieron valores significativos, en los RN se observó una media en el grupo SDG de 58.9 mg/mL y en DG de 58.4 mg/mL con un valor no significativo de  $p=0.836$ . En las madres sin DG se obtuvo una media de 77.4 mg/mL y en madres con DG de 73.7 mg/mL con un valor no significativo de  $p=0.318$ . Este comportamiento se debe a que al ser diagnosticadas con DG se les da tratamiento con dieta, actividad física moderada, metformina o insulina; cabe resaltar que todas las madres con DG ya tenían un tratamiento al momento de tomar las muestras sanguíneas.

En hemoglobina glucosilada se observaron valores significativos en M-DG obteniendo una media de 5.6 mg/mL en M-SDG una media de 5.2 con una  $p=0.001$  (Cuadro X).

En el grupo de los RN se observaron valores significativos en colina y valores no significativos en betaína obteniendo como resultados de colina en RN-SDG una media 7.41 $\mu$ g/mL y RN-DG una media de 6.46 $\mu$ g/mL con valor significativo de  $p=0.006$ . Referente a betaína en RN-SDG de 3.03  $\mu$ g/mL y RN-DG de 2.98 $\mu$ g/mL con un valor no significativo de  $p=0.770$ .

En la Figura XII se observó una disminución de la concentración de colina sérica proporcional al aumento del peso del RN posiblemente esté relacionado con el CTL-1, sin embargo, no existe ningún antecedente en la literatura entre esta relación colina y peso.

En nuestro estudio la correlación de colina entre madres con y sin DG no fue significativo con una media de 2.36 $\mu$ g/mL en M-SDG y 2.54 $\mu$ g/mL en M-DG con una  $p=0.059$

Referente a la betaína se observó una media de 1.47 $\mu$ g/mL en M-SDG y 1.84  $\mu$ g/mL en M-DG con un valor significativo de  $p=0.002$ .

En este estudio se observó que el grupo M-DG obtuvieron una concentración mayor de colina, comparado con el grupo M-SDG con un valor no significativo, pero se observa una tendencia, que se puede atribuir a diversos factores como es la alimentación o la ingesta da algún suplemento relacionado al metabolito. Referente a betaína se observa una concentración mayor en M-DG, este resultado era de esperarse ya que, al tener una concentración mayor de colina, hay una mayor oxidación de esta y por lo tanto una mayor concentración de betaína.

Al comparar a los RN con DG y sin DG observamos una disminución de concentración de colina y betaína en RN con DG (Cuadro IX). La concentración de colina y betaína en M-DG fue mayor que en M-SDG, esperaríamos que las concentraciones de colina y betaína en RN-DG fuera mayor que en RN-SDG pero no se observó así. De acuerdo con el estudio de Heidi K. y cols. Las proteínas CTL 1 y CTL2 son las principales transportadores de colina responsable de la absorción placentaria del suministro de sangre materna y probablemente la hiperglucemia fetal altere los transportadores CTL-1 y CTL-2 en la placenta y éste altere el transporte de colina y por lo tanto llevaría a una disminución de betaína. Hay pocos informes referentes a los transportadores de colina en placenta y no se ha estudiado como afecta la hiperglucemia materna a este transportador.<sup>26</sup>

Como se puede observar la colina en muestras en cordón umbilical fue 2.5 veces mayor que en la madre en el momento del parto; la betaína, aproximadamente el doble. Durante el desarrollo normal del feto al adulto, hay una disminución progresiva en la concentración de colina en la sangre que comienza en el útero. De hecho, las concentraciones séricas de colina son 6 a 7 veces más altas en el feto y

en el neonato que en el adulto.<sup>69</sup> Esta disminución en la concentración de colina sérica, hacia niveles de adultos, ocurre durante las primeras semanas de vida.

## **X. Conclusión.**

En este estudio se observaron diferencias en las concentraciones de metabolitos entre las madres y entre los recién nacidos. La concentración de betaína fue mayor en M-DG comparado con las M-SDG. En los RN la concentración de colina fue mayor en el grupo de RN-SDG. En general, los dos metabolitos presentaron concentraciones mayores en los RN comparados con las madres.

## **XI. Propuesta**

Se propone realizar un cuestionario validado de dieta para observar la ingesta de alimentos que podría alterar los niveles de metabolitos del ciclo de un carbono, aumentar el número de sujetos de estudio, cuantificar los parámetros bioquímicos como glucosa, HbA1c e insulina y de los metabolitos relacionados como ácido fólico, Vitamina B12, betaína, colina, S-adenosil metionina y S-adenosil homocisteína al momento de ser diagnosticada y antes del parto. Así también estudiar los transportadores CTL1 y CTL2 en placenta de mujeres control y con hiperglucemia para observar cómo afecta el transporte de colina.

## XII. Referencias

1. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2019. *Diabetes Care*. 2019;42 (Suppl.1): S13–S28.
2. Corsino L, Dhatariya K, Umpierrez G. Management of diabetes and hyperglycemia in hospitalized patients. In *Endotext* [Internet]. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279093/>. Accessed 24 September 2018.
3. Kwon S, Hermayer KL, Hermayer K. Glucocorticoid induced hyperglycemia. *Am J Med Sci* 2013;345: 274–277.
4. Brady V, Thosani S, Zhou S, et al. Safe and effective dosing of basal bolus insulin in patients receiving high dose steroids for hyper cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and dexamethasone chemotherapy. *Diabetes Technol* 2014;16:874–879.
5. Buchleitner AM, Martínez Alonso M, Hernández M. Perioperative glycemic control for diabetic patients undergoing surgery. *Cochrane Database Rev* 2012; 9:CD007315.
6. Demma LJ, Carlson KT, Duggan EW, et al. Effect of basal insulin dosage on blood glucose concentration in ambulatory surgery patients with type 2 diabetes. *J Clin Anesth* 2017;36:184–188.
7. Umpierrez GE, Smiley D, Hermayer K, et al. Randomized study comparing a basal bolus with a basal plus correction insulin regimen for the hospital management of medical and surgical patients with type 2 diabetes: Basal Plus Trial. *Diabetes Care* 2013;36:2169–2174.
8. Cermak JM, Holler T, Jackson DA, et al. Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *Faseb Journal* 1998;12:349–57.
9. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Miles JM, et al. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:1335–1343.

10. Umpierrez GE, Reyes D, Smiley D, et al. Hospital discharge algorithm based on admission HbA<sub>1c</sub> for the management of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37:2934–2939.
11. Wu EQ, Zhou S, Yu A, et al. Outcomes associated with post-discharge insulin continuity in US patients with type 2 diabetes mellitus initiating insulin in the hospital. *Hosp Pract* 2012; 40:40–48.
12. Gillaizeau F, Chan E, Trinquart L, et al. Computerized advice on drug dosage to improve prescribing practice. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 11:CD002894.
13. Umpierrez GE, Reyes D, Smiley D, et al. Hospital discharge algorithm based on admission HbA<sub>1c</sub> for the management of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37:2934–2939.
14. Gillaizeau F, Chan E, Trinquart L, et al. Computerized advice on drug dosage to improve prescribing practice. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 11:CD002894.
15. Wang YJ, Seggelke S, Hawkins RM, et al. Impact of glucose management team on outcomes of hospitalization in patients with type 2 diabetes admitted to the medical service. *Endocr Pract* 2016;22:1401–1405.
16. Draznin B, Gilden J, Golden SH, et al. Pride investigators pathways to quality inpatient management of hyperglycemia and diabetes: a call to action. *Diabetes Care* 2013;36:1807–1814.
17. Bansal V, Mottalib A, Pawar TK, et al. Inpatient diabetes management by specialized diabetes team versus primary service team in noncritical care units: impact on 30-day readmission rate and hospital cost. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2018; 6: e000460.
18. Ostling S, Wyckoff J, Ciarkowski SL, et al. The relationship between diabetes mellitus and 30 day readmission rates. *Clin Diabetes Endocrinol* 2017;3:3.
19. Rushakoff RJ, Sullivan MM, MacMaster HW, et al. Association between a virtual glucose management service and glycemic control in hospitalized adult patients: an observational study. *Ann Intern Med* 2017; 166: 621–627.

20. Arnold P, Scheurer D, Dake AW, et al. Hospital guidelines for diabetes management and the Joint Commission American Diabetes Association Inpatient Diabetes Certification. *Am J Med Sci* 2016;351:333–341.
21. Society of Hospital Medicine. Glycemic Control for Hospitalists [Internet]. Available from [http://www.hospitalmedicine.org/Web/Quality\\_Innovation/Implementation\\_Toolkits/Glycemic\\_Control/Web/Quality\\_Innovation/Implementation\\_Toolkit/Glycemic/Clinical\\_Tools/Clinical\\_Tools.aspx](http://www.hospitalmedicine.org/Web/Quality_Innovation/Implementation_Toolkits/Glycemic_Control/Web/Quality_Innovation/Implementation_Toolkit/Glycemic/Clinical_Tools/Clinical_Tools.aspx). Accessed 24 September 2018.
22. Nicesugar Study Investigators, Finfer S, Chittock DR, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *New Engl J Med* 2009; 360:1283–129.
23. Sathya B, Davis R, Taveira T, et al. Intensity of perioperative glycemic control and postoperative outcomes in patients with diabetes: a metaanalysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;102:8–15.
24. Vigil-De Gracia P, Olmedo J. Diabetes gestacional: conceptos actuales. *Ginecol Obstet Mex* 2017;85:380-390.
25. Lorenzo Abad Martínez. *Obstetricia y Ginecología*. 2<sup>a</sup>. Barcelona: Ariel, S.A;2004.
26. Heidi K, Kinsey M, Carly E, et al. Characterization of choline transporters in the human placenta over gestation. *Placenta* 2005;1362-1369.
27. Catalano PM, Huston L, Amini SB, et al. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:903-16.
28. Qu HM, Ye YH, Peng W, et al. Relationship between tyrosine phosphorylation and protein expression of insulin receptor substrate-1 ad insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Zhonghua Fu Chan Ke Zhi* 2007;15:86.
29. Tumurbaatar B, Poole AT, Olson G, et al. Adipose tissue insulin resistance in gestational diabetes. *Metab Syndr Relat Disord* 2017; 15:86-92.
30. Colomire M, Permezel M, Lappas M. Diabetes and obesity during pregnancy alter insulin signaling and glucose transporter expression in maternal skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *J Mol Endocrinol* 2010; 44:213-23.

31. Garvey WT, Maianu L, Hancock JA, et al. Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. *Diabetes* 1992;41:465-75.
32. De Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance *FEBS Lett* 2008;582:97-105.
33. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:341-7.
34. Handwerger S, Freemark M. Role of placental lactogen and prolactin in human pregnancy. Boston, MA: Springer US 1987;399-420.
35. Higgins LE, Rey de Castro N, Addo N, et al. Placental features of late onset adverse pregnancy outcome. *PLoS One* 2015; 10:e0129117.
36. MacIntyre HD, Zeck W, Russell A. Placental growth hormone, fetal growth and the IGF axis in normal and diabetic pregnancy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5:185-9.
37. Garrity M, Zeck W, Russell A. Placental growth hormone, fetal growth and IGF axis in normal and diabetic pregnancy. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5:185-9.
38. Jabbour HN, Critchley HO. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 2001;121:197-205.
39. Skouby SO, Kuhl C, Hornnes PJ, et al. Prolactin and glucose tolerance in normal and gestational diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1986;67:17-20.
40. Vejrazkova D, Vcelak J, Vankova M, et al. Steroids and insulin resistance in pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;139:122-9.
41. Vejrazkova D, Vcelak J, Vankova M, et al. Steroids and insulin resistance in pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;139:122-9.
42. Uzelac PS, Lin J, Neese LD, et al. Dysregulation of leptin and testosterone production and their receptor expression in the human placenta with gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2010; 31:581-8.
43. Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ, Estrogen an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *J Diabetes Res* 2015;2015:916585.
44. Keith L, Persaud, Mark G. *Embriología clínica*. 9ª. Barcelona España: Elsevier, 2013.

45. Samuel Webster, Rhiannon de Wreede. Embriología: Lo esencial de un vistazo. 1<sup>a</sup>. Buenos Aires: Panamericana 2013.
46. Diaz SO, Pinto J, Graca G, et al. Metabolic biomarkers of prenatal disorders: an exploratory NMR metabonomics study of second trimester maternal urine and blood plasma. *Journal of proteome research* 2011;10:3732-42.
47. Krishnaveni GV, Hill JC, Veena SR, et al. Low plasma vitamin B12 in pregnancy is associated with gestational 'diabesity' and later diabetes. *Diabetologia* 2009;52:2350-8.
48. Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, et al. Long term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes care* 1998;21 Suppl 2:B142.
49. Cho E, Zeisel, Jacques P, et al. Willett, W.C. Dietary choline and betaine assessed by food frequency questionnaire in relation to plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring Study. *Am. J. Clin. Nutr* 2006;83,905–911.
50. Chiuve S.E, Giovannucci E.L, Hankinson S.E, et al. The association between betaine and choline intakes and the plasma concentrations of homocysteine in women. *Am. J. Clin. Nutr* 2007;86:1073–1081.
51. Xing J, Kang L, Jiang Y. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenesis gene expression and CpG methylation of lipoprotein lipase gene in broilers. *Mol. Biol. Rep* 2011;38:1975–1981.
52. Chakravarthy M, Lodhi, I, Malapaka, R. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 2009;138:476–488.
53. Du J Shen, Zhang P, et al. Betaine Supplementation Enhances Lipid Metabolism and Improves Insulin Resistance in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* 2018;10:131.
54. Friesen RW, Novak EM, Hasman D, Innis SM. Relationship of dimethylglycine, choline, and betaine with oxoproline in plasma of pregnant women and their newborn infants. *J Nutr* 2007;137:2641-6.
55. Brett K.E, Ferraro Z.M. Maternal fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int. J. Mol. Sci* 2014; 15:16153–16185.

56. Zeisel SH, Blusztajn JK. Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr* 1994;14:269–96.
55. Brett, K.E, Ferraro. Maternal fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int. J. Mol. Sci* 2014;15:16153–16185.
57. Desoye G, Gauster, M Wadsack. Placental transport in pregnancy pathologies. *Am. J. Clin. Nutr* 2011;94:S1896–S1902.
58. Rosario F.J. Powell, T.L Jansson. Activation of placental insulin and mTOR signaling in a mouse model of maternal obesity associated with fetal overgrowth. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2016;310: R87–R93.
59. Zeisel SH, Blusztajn JK. Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr* 1994;14:269–96.
60. Burt ME, Hanin I, Brennan MF. Choline deficiency associated with total parenteral nutrition. *Lancet* 1995;2:638–39.
61. Song J, Fischer L, Kohlmeier M, et al. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J* 2005;19:1266–71.
62. Shronts EP. Essential nature of choline with implications for total parenteral nutrition. *J. Am. Diet. Assoc* 2007; 97:639–46.
63. Steenge GR, Verhoef P, Katan MB. Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J.Nutr* 2008;133:1291–95.
64. Cheng W, Holmes McNary, Mar M.H, et al. Bioavailability of choline and choline esters from milk in rat pups. *J. Nutr. Biochem* 2007;7:457-64.
65. Cheng W.L, Holmes McNary, Mar M.H, et al. Bioavail ability of choline and choline esters from milk in rat pups. *J. Nutr. Biochem* 2007;7:457-64.
66. Holmes McNary M, Cheng WL, Mar M.H, et al. Choline and choline esters in human and rat milk and infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr* 2007;64:572–76.
67. Spiers P, Myers D, Wurtman R. Citicoline improves verbal memory in aging. *Arch. Neurol* 1997;53:441–48.

68. Buchman A, Moukarzel A, Jenden D, et al. Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be re-versed with intravenous choline supple-mentation. *Hepatology* 2018;22:1399–403.
69. Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, et al. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am. J. Cardiol* 2018;75:132– 36.
70. Adeyemo O, Jeyakumar H. Plasma progesterone, estradiol-17 beta and testosterone in maternal and cord blood, and maternal human chorionic gonadotropin at parturition. *Afr. J. Med. Med. Sci* 2005;22:55–60.
71. Jones H.N, Woollett L.A, Barbour N, et al. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J* 2009;23:271–278.
72. Jack Roberts, C Joselit, Y Nanobashvili, et al. Choline Supplementation Normalizes Fetal Adiposity and Reduces Lipogenic Gene Expression in a Mouse Model of Maternal Obesity. *Nutrients* 2017;9: 899.
73. Joselit, Y, Nanobashvili K, Jack Roberts C, et al. Maternal betaine supplementation affects fetal growth and lipid metabolism of high-fat fed mice in a temporal-specific manner. *Nutr. Diabetes* 2018;8: 41.
74. Friesen RW, Novak EM, Hasman D. Innis SM. Relationship of dimethylglycine, choline, and betaine with oxoproline in plasma of pregnant women and their newborn infants. *J Nutr* 2007;137:2641-6.
75. Barker DJ. The intrauterine environment and adult cardiovascular disease. *Ciba Found Symp* 2018;156:3–10.
76. Barker DJ, Osmond C, Law CM. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J epidemiol Community Health* 2017;43:237–240.
77. Jou MY, Philipps AF, Lonnerdal B. Maternal zinc defi- ciency in rats affects growth and glucose metabolism in the offspring by inducing insulin resistance postnatally. *J Nutr* 2010;140:1621–1627.

78. Jou MY, Lonnerdal B, Philipps AF. Maternal zinc restriction affects postnatal growth and glucose homeostasis in rat offspring differently depending upon adequacy of their nutrient intake. *Pediatrics Res* 2017;71:228–234.
79. Inoue T, Kido Y, Asahara S, et al. Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass. *Biomed Res* 2017;30:325–33.
80. Prentice AM. Se early programming of adult diseases in resource poor countries. *Arch Dis Child* 2015;90:429–432.
81. Liang C, Oest Me, Prater MR. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult onset chronic dis eases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2009;86:377–384.
82. Jablonka e, Lamb MJ. The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci* 2008;981:82–96.
83. Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 2009;62:78–89.
84. Bielawski DM, Zaher FM, Svinarich DM. Paternal alcohol exposure affects sperm cytosine methyl ransferase messenger RNA levels. *Alcohol Clin exp Res* 2010;26:347–351.
85. Carone BR, Fauquier L, Habib N, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010;143:1084–1096.
86. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, et al. RNA mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2010;441:469–474.
87. Jürgen H Gross. *Mass Spectrometry*. Springer, Cham 2017;486:490.

