



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**IMPACTO DE FACTORES MATERNOS GENÉTICOS Y  
METABÓLICOS SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS  
VINCULADOS A LA PROGRAMACIÓN FETAL DE DISFUNCIÓN  
ENDOTELIAL Y ATROSCLEROSIS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A :**

**JULIA CARRASCO ZANINI SÁNCHEZ**

**DIRECTORA DE TESIS :**

**DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018**

**Facultad de Medicina**





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 Académicos**

A la Dra. María Teresa Tusié Luna por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por todo su apoyo, confianza y asesoría durante la realización del proyecto, que han sido fundamentales para mi formación académica.

A los miembros de mi jurado por sus comentarios y lectura de esta tesis: al Dr. Juan Miranda Ríos, al Dr. Julián Valdés Rodríguez, al Dr. Armando Tovar Palacio y al Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza.

A la M. en C. Paola Vázquez Cárdenas por haberme incluido en el proyecto, por la supervisión y asesoría a lo largo de estos dos años y en la realización de esta tesis. Se reconocen sus comentarios y lectura de este trabajo.

A la M. en C. Yayoi Xóchitl Segura Kato por sus invaluable enseñanzas, constante apoyo y orientación en la parte experimental de este trabajo y lo largo de estos dos años.

A la Dra. Hortensia Moreno Macías por su asesoría en el análisis estadístico y lectura de esta tesis.

A la Dra. Alicia Huerta Chagoya por su asesoría en el análisis estadístico y en problemas bioinformáticos.

A la M. en C. Leslie Guzmán Sandoval por su importante contribución al proyecto en la captación y caracterización clínica de las pacientes y obtención de biopsias.

A la Biól. María Luisa Ordoñez Sánchez y a la M. en C. Rosario Rodríguez por la realización de los genotipos para este trabajo.

A la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del INCMNSZ dónde se realizó este trabajo.

Al departamento de Endocrinología de INCMNSZ, al Dr. Carlos Salinas Aguilar, a la QFB. Luz Elizabeth Guillén y Mtra. María Guadalupe López por las determinaciones de metabolitos séricos de las pacientes.

Al Dr. Zentella por su apoyo y orientación a lo largo de este trabajo y de la carrera.

A Unidad de Bioquímica del INCMNSZ por haberme facilitado recursos utilizados en este proyecto.

A los miembros de la Unidad de Tococirugía del Hospital General Dr. Manuel Gea González, en particular al Dr. Jorge Audifred, a la Dra. Isela Barrita y al Dr. César Nieto.

A la Centro de Innovación Médica Aplicada del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Al Biól. Saúl Cano, al M. en C. Alberto Cabrera y a la T.S. Maribel Rodríguez por su apoyo técnico.

Este proyecto se realizó con recursos otorgados por CONACyT. Financiamiento FOSSIS. Proyecto SALUD-2015-01-262077 y SALUD-2010-01-13826.

## **Agradecimientos Personales**

Al Dr. León Islas y a la Dra. Gisela Rangel por haberme enseñado y motivado desde el inicio de mi carrera.

A la *Kid section* de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del INCMNSZ: Dani, Andy, Ale, Anilú y David. Gracias por su compañía, amistad y apoyo durante este proceso.

A la familia Pedraza Torres recibirme y hacerme sentir como en casa en un período que fue crucial para poder terminar esta tesis. Gracias Martha y Ale.

A mis papás y a mi hermano, Martha, Jaime y Pedro, que han estado siempre a mi lado, gracias por su apoyo incondicional y dedicación a mi formación personal y académica.

A mi familia de SUUMA voluntarios por enseñarme que siempre podemos con más de lo que creemos y por enseñarme a regirme bajo nuestros valores: honor, lealtad, disciplina, servicio y excelencia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
NO	Óxido Nítrico
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
SAC	Síndrome Agudo Coronario
IAM	Infarto Agudo al Miocardio
EVC	Enfermedad Vascul ar Cerebral
OxLDL	<i>Oxidized Low Density Lipoprotein</i>
DNMT	DNA metiltransferasa
HDAC	Histona Desacetilasa
IUGR	<i>Intrauterine Growth Restriction</i>
DG	Diabetes Gestacional
CT	Colesterol Total
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
DTN	Defectos de Tubo Neural
Bp	Pares de bases
RNAm	RNA mensajero
SAM	S-adenosilmetionina
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Único
GWAS	Estudio de Asociación de Genoma Completo
GRS	Puntaje de Riesgo Genético
IMC	Índice de Masa Corporal
CTOG	Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa
AIM	Marcador Informativo de Ancestría
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
TG	Triacilgliceroles
AUC	Área bajo la curva
SBF	Suero Bovino Fetal
5-MeTHF	5-metiltetrahidrofolato
qPCR	<i>Real time Polymerase Chain Reaction</i>
SDG	Semanas de gestación
TSS	Sitio de inicio de la Transcripción
PCA	Análisis de Componentes Principales
MAF	Frecuencia del alelo menor
CHIP-seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>

## Índice de Tablas

Tabla 1. SNPs asociados con riesgo a DG, evaluados para las asociaciones con homocisteína o folato séricos.....	25
Tabla 2. SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores utilizados para la construcción del GRS.....	26
Tabla 3. Regiones de genes asociados a condiciones intrauterinas adversas relevantes en la patofisiología de disfunción endotelial y aterosclerosis para el estudio de metilación de DNA.....	28
Tabla 4. Estadística descriptiva de la cohorte madres-hijos.....	32, 33
Tabla 5. Asociación de SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores del metabolismo de unidades de carbono con homocisteína o folato séricos en la cohorte de 614 mujeres.....	33
Tabla 6. Resultados de los modelos de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación con ácido fólico para asociaciones con fenotipos metabólicos adversos durante el tercer trimestre del embarazo.....	34
Tabla 7. Asociación de la interacción entre el GRS y la dosis de suplementación de ácido fólico con niveles de metilación global y en regiones reguladoras de genes asociados con disfunción endotelial y aterosclerosis.....	37
Tabla 8. Estadística descriptiva de la submuestra utilizada para el análisis de mediación moderada.....	38, 39
Tabla 9. Resultados del análisis de mediación.....	39
Tabla 10. Características de las pacientes seleccionadas con GRS de riesgo.....	46
Tabla 11. Características de las pacientes seleccionadas con GRS protector.....	48

## Índice de Figuras

Figura 1. Patofisiología de disfunción endotelial y aterosclerosis.....	10
Figura 2. Modelo de modificaciones epigenéticas y estado de la cromatina.....	13, 14
Figura 3. Metabolismo de Unidades de Carbono.....	16
Figura 4. Diseño experimental de estudio de la segunda cohorte.....	24
Figura 5. Modelo de asociación entre homocisteína sérica en la SDG 24 - 28 con el GRS en interacción con dosis de suplementación con ácido fólico.....	35
Figura 6. Modelo de asociación entre (A) glucosa 120' y (B) AUC de la CTOG con el GRS en interacción con dosis de suplementación con ácido fólico.....	35
Figura 7. Modelo de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación de ácido fólico con los niveles de metilación en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ .....	37
Figura 8. Modelo de mediación por glucosa 120' del efecto del GRS sobre la metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$ .....	40
Figura 9. Análisis bioinformático de la región reguladora de TNF $\alpha$ mediante datos de ENCODE.....	42, 43
Figura 10. Matriz de correlación entre la expresión relativa de TNF $\alpha$ , la metilación de DNA en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ y el nivel sérico materno de homocisteína.....	44
Figura 11. Promedio del porcentaje de metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$ a través de los países en cultivo.....	45
Figura 12. Efecto de la suplementación con 5-MeTHF sobre los niveles de metilación de DNA en la región -2007 a -1731 bp río arriba del sitio de TSS de TNF $\alpha$ en cultivos de HUVECs de neonatos de pacientes con puntajes de riesgo del GRS y dosis bajas de suplementación con ácido fólico durante embarazo. ....	46
Figura 13. Veces de cambio en la expresión relativa de (A) ICAM1 y (B) VCAM1 con respecto a la expresión basal, en HUVECs de neonatos expuestos al ambiente intrauterino establecido por el GRS de riesgo, protector y expuesto al GRS de riesgo, pero suplementadas con 5-MeTHF en cultivo.....	48
Figura 14. Modelo de los factores maternos genéticos y metabólicos vinculados con programación fetal de disfunción endotelial y aterosclerosis.....	56

## Resumen

La hipótesis de la programación metabólica fetal postula que condiciones intrauterinas adversas resultan en adaptaciones permanentes en el metabolismo del feto que lo hacen propenso a desarrollar enfermedades cardiovasculares durante su vida adulta. Se ha propuesto que dichas adaptaciones están mediadas por cambios epigenéticos, como metilación de DNA. A su vez, ésta es modulada por el metabolismo de unidades de carbono a través de la biodisponibilidad de grupos metilo. Por lo tanto, puede ser afectada por variantes en genes que codifican para enzimas y transportadores de esta vía. En este trabajo evaluamos si existen cambios en los niveles de metilación de DNA y abundancia de RNAm de genes vinculados con disfunción endotelial y aterosclerosis mediados por alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono durante el embarazo.

Se capturaron pacientes al inicio del embarazo y durante la semana de gestación 24 -28 se les realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa. Se midieron niveles séricos de glucosa, homocisteína y folato entre otros metabolitos, y se genotiparon polimorfismos de nucleótido único en genes involucrados en el metabolismo de unidades de carbono. De los cordones umbilicales de sus neonatos, se aislaron las células endoteliales de la vena umbilical (HUVECs) para analizar los niveles de metilación de DNA mediante pirosecuenciación de DNA convertido por bisulfito y la abundancia RNA mensajeros de genes asociados a disfunción endotelial y aterosclerosis.

Se generó un puntaje de riesgo genético (GRS) ponderado a partir de variantes en MTHFR, CUBN y FIGN, que, en interacción con la dosis de suplementación con ácido fólico, resultó significativamente asociado con los niveles de homocisteína, glucosa al minuto 120 y valores del área bajo la curva de tolerancia oral a la glucosa. A su vez, puntajes de riesgo del GRS y dosis bajas de suplementación, así como niveles elevados de glucosa al minuto 120 post carga y homocisteína, se asociaron significativamente con hipometilación de DNA en una región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción de TNF $\alpha$ . Dicha hipometilación, se asoció con sobreexpresión de TNF $\alpha$  a nivel de RNA mensajero. Adicionalmente, se identificó al nivel de glucemia al minuto 120 post carga como el mediador del efecto de la exposición al GRS sobre la metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$ . Finalmente, en HUVECs de neonatos expuestos a las condiciones intrauterinas adversas impuestas por alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono, hubo una sobreexpresión de las moléculas de adhesión ICAM1 y VCAM1 ante activación endotelial. Dichas adaptaciones imponen un fenotipo proinflamatorio que se asocia con susceptibilidad para disfunción endotelial y aterosclerosis, y que no se pudo revertir mediante suplementación con folato en cultivo.

En conclusión, puntajes de riesgo y dosis bajas de suplementación con ácido fólico se asocian con un ambiente intrauterino adverso caracterizado por una deficiencia en la secreción de insulina e hiperhomocisteinemia en las madres, que a su vez se asoció con adaptaciones epigenéticas y funcionales en HUVECs, previamente vinculadas con programación fetal de disfunción endotelial y aterosclerosis.

## Abstract

The premise of the Developmental Origins of Health and Disease hypothesis is that adverse intrauterine conditions result in permanent changes in the foetal metabolism. These adaptations allow the foetus to survive such adverse conditions, however these can also predispose to cardiometabolic diseases in adulthood. Epigenetic modifications, such as DNA methylation, have been suggested as the molecular mechanism underlying this phenomenon. Furthermore, DNA methylation is mediated by one-carbon metabolism intermediates and can therefore be altered by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in one-carbon metabolism genes. In this study we evaluated whether altered one-carbon metabolism during pregnancy could result in DNA methylation and gene expression changes in genomic regions associated with endothelial dysfunction and atherosclerosis.

Pregnant women were included in this study during their first trimester, and were screened with an oral glucose tolerance test at 24 to 28 weeks of gestation. Serum glucose, homocysteine and folate were measured among other metabolites, and one-carbon metabolism single nucleotide polymorphisms were genotyped. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from umbilical cords obtained during delivery, to analyse DNA methylation by bisulfite pyrosequencing and mRNA abundance of genes associated to endothelial dysfunction and atherosclerosis.

A weighted genetic risk score (GRS) was constructed using SNPs in MTHFR, CUBN and FIGN. The interaction between the GRS and folic acid supplementation dose was significantly associated to serum homocysteine, 2-hour glucose and area under the curve during the oral glucose tolerance test. Furthermore, risk values of the GRS coupled with low supplementation doses, as well as elevated 2-hour glucose and homocysteine were significantly associated with DNA hypomethylation levels at a regulatory region -2007 to -1731 bp upstream of TNF $\alpha$  transcription start site. This hypomethylation was associated with increased TNF $\alpha$  mRNA abundance. 2-hour glucose was identified as the mediator in the relationship between the GRS and DNA methylation at the TNF $\alpha$  regulatory region. Finally, in HUVECs from neonates exposed to adverse intrauterine conditions imposed by altered one carbon metabolism, ICAM1 and VCAM1 adhesion molecules were overexpressed upon endothelial activation. All these adaptations establish a proinflammatory phenotype associated with predisposition to endothelial dysfunction and atherosclerosis, which could not be reversed by folate supplementation in HUVEC cultures.

In conclusion, risk values of the GRS coupled with low folic acid supplementation doses are associated with the development of an adverse intrauterine environment characterized by maternal insulin secretion deficiency and hyperhomocysteinemia. These conditions result in epigenetic and functional changes in HUVECs, previously associated to foetal programming of endothelial dysfunction and atherosclerosis.

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>8</b>
1.1. Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad .....	8
1.2. Programación fetal de disfunción endotelial y aterosclerosis.....	9
1.3. La metilación de DNA como mecanismo epigenético vinculado con la programación metabólica fetal.....	10
1.4. El metabolismo de unidades carbono como modulador de la metilación de DNA en respuesta a estímulos ambientales.....	15
1.5. Impacto del metabolismo de unidades de carbono sobre rasgos glucémicos en el embarazo.....	17
1.6. Integración de factores genéticos y metabólicos maternos en la caracterización de ambientes intrauterinos vinculados con programación fetal.....	19
<b>2. Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Pregunta de Investigación.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>5. Objetivo General.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Objetivos Particulares.....</b>	<b>22</b>
<b>7. Metodología.....</b>	<b>23</b>
7.1. Cálculo del tamaño de muestra.....	23
7.2. Captación, obtención de muestras y seguimiento.....	23
7.3. Criterios de selección de SNPs y genotipificación.....	24
7.4. Generación del puntaje de riesgo genético.....	25
7.5. Mediciones y Parámetros Bioquímicos / Antropométricos.....	26
7.6. Obtención y cultivo de HUVECs.....	27
7.7. Criterio de selección de regiones para el estudio de metilación de DNA.....	27
7.8. Conversión por bisulfito y Pirosecuenciación.....	28
7.9. Suplementación con folato en cultivo.....	29
7.10. Ensayos de activación endotelial.....	29
7.11. Síntesis de cDNA y ensayos de qRT-PCR.....	29
7.12. Análisis Estadístico.....	30
<b>8. Resultados.....</b>	<b>32</b>
8.1. Estadística descriptiva de la cohorte madres-hijos.....	32
8.2. Puntaje de riesgo genético para hiperhomocisteinemia en interacción con la dosis de suplementación de ácido fólico y su asociación con indicadores glucémicos.....	33
8.3. Análisis de asociación entre el puntaje de riesgo genético y metabolitos maternos con niveles de metilación global y en regiones reguladoras de genes asociados a disfunción endotelial y aterosclerosis.....	36
8.4. Implicaciones funcionales de la metilación de DNA en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ .....	40
8.5. Efecto de la suplementación con folato en cultivo sobre los niveles de metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$ .....	44

8.6. Expresión de moléculas de adhesión y su asociación con el puntaje de riesgo genético.....	46
<b>9. Discusión.....</b>	<b>49</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>11. Perspectivas.....</b>	<b>58</b>
<b>12. Referencia.....</b>	<b>59</b>
<b>13. Material Suplementario.....</b>	<b>68</b>

## 1. Introducción

### 1.1. Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad

Durante el desarrollo embrionario se da la formación de un organismo completo a partir de una célula, el cigoto, mediante una combinación de procesos complejos como la formación de patrones, morfogénesis, diferenciación celular y crecimiento. En última instancia, todos estos procesos están bajo el control de programas genéticos que dirigen el desarrollo del organismo. Sin embargo, el embrión se encuentra en un ambiente intrauterino particular que será dictado en gran medida por factores maternos. Por lo tanto, la interacción del embrión con el ambiente materno podría tener el potencial de modular dichos programas genéticos.

Unos de los primeros estudios donde se elucidó el impacto del ambiente intrauterino sobre el desarrollo embrionario y sus posibles consecuencias a largo plazo, fueron aquellos hechos por el grupo de Barker D.J (1, 2). En dichos estudios de carácter epidemiológico se observó que la incidencia de enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DT2) estaba fuertemente asociada con bajo peso al nacer; que a su vez está predominantemente determinado por el ambiente intrauterino más que por la carga genética. Durante el desarrollo embrionario, la división celular es un proceso fundamental para el crecimiento del feto. Por lo tanto, una reducción en la tasa de división celular, que puede ser causada por malnutrición materna o por un desbalance en las concentraciones de hormonas y factores de crecimiento, afectará directamente el crecimiento del feto (3, 4). No obstante, períodos de malnutrición materna en distintos momentos durante el embarazo afectarán diferencialmente a cada tejido, dado que el desarrollo de los órganos y sus períodos críticos de rápido crecimiento suceden en diferentes momentos durante la organogénesis (5). A partir de sus observaciones, Barker propuso la hipótesis de la programación metabólica fetal o de los Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD, *Developmental Origins of Health and Disease*), en la que postuló que condiciones intrauterinas adversas resultan en adaptaciones permanentes en el metabolismo del feto que le permiten sobrevivir durante la gestación, pero que lo hacen propenso a desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares durante su vida adulta (6).

Uno de los estudios en humanos que aportó una de las evidencias más contundentes de los efectos de la malnutrición materna durante el embarazo, proviene de la época de la hambruna holandesa. Este fue un periodo de tiempo durante la segunda guerra mundial, entre finales de 1944 y 1945, en el que hubo una escasez de alimentos secundario a un bloqueo generalizado en el transporte de comida a Holanda. Previo al bloqueo, la ingesta diaria promedio en adultos se estimaba en 1800 Kcal, la cual disminuyó abruptamente durante la época de la hambruna a un rango de entre 400 y 800 Kcal (7). Por lo tanto, este modelo tiene como peculiaridad que era una población bien alimentada en la que se estableció abruptamente una condición de malnutrición, por un período de tiempo determinado, y de la que existen registros detallados de los nacimientos que ocurrieron en esa época. A partir de este modelo se pudieron estudiar los efectos de la malnutrición, en distintos momentos durante el embarazo, sobre la salud de los recién nacidos a largo plazo. A grandes rasgos, los productos de mujeres expuestas a la hambruna en períodos tardíos e intermedios de su

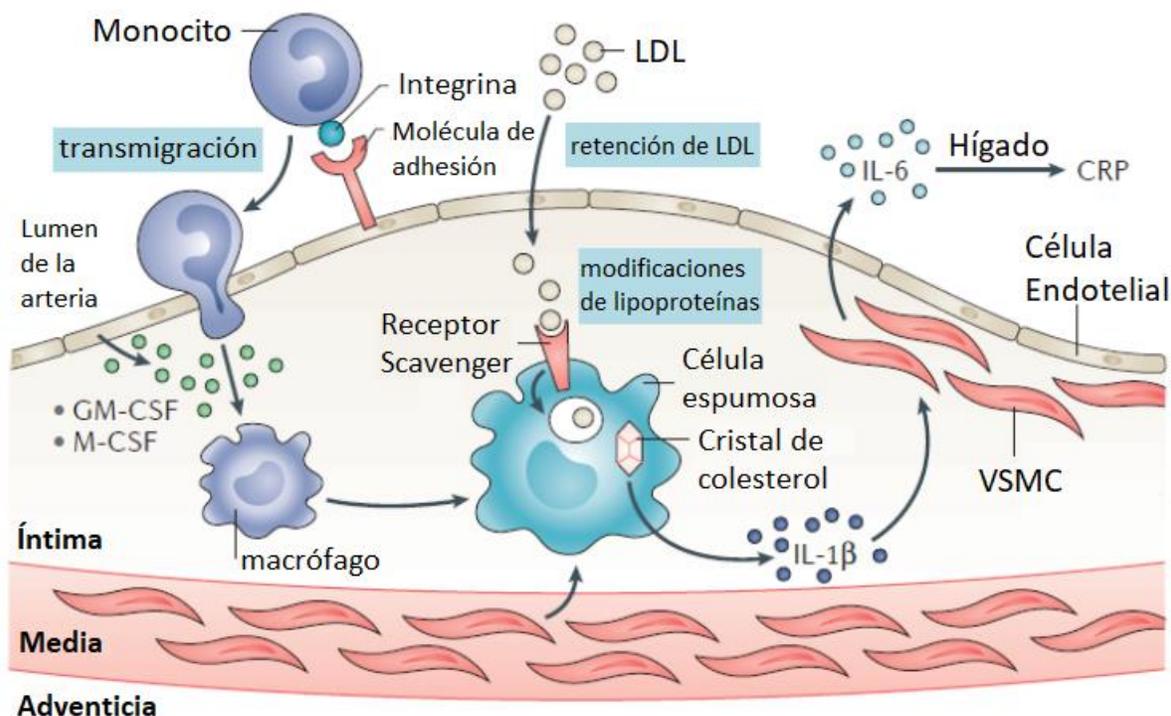
embarazo tenían una mayor prevalencia de intolerancia a los carbohidratos, mientras que aquellos expuestos en períodos tempranos del embarazo tenían una mayor prevalencia de enfermedades cardiovasculares y obesidad además de intolerancia a los carbohidratos (8).

## **1.2. Programación fetal de disfunción endotelial y aterosclerosis**

La aterosclerosis es un síndrome vascular caracterizado por la formación y subsecuente ruptura de placa de ateroma. La patología subyacente involucra un proceso inflamatorio crónico que inicia con el desarrollo de disfunción endotelial, una condición patológica en la cual hay un desbalance en la biodisponibilidad de factores vasodilatadores y vasoconstrictores, que causa una deficiencia en la capacidad de vasodilatación dependiente de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) (9). Dicho estado favorece una activación del endotelio vascular que resulta en un incremento en la oxidación y acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) y en la sobreexpresión de moléculas de adhesión como VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), ICAM1 (*Intracellular Adhesion Molecule 1*) y de citocinas proinflamatorias como MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) y TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis  $\alpha$* ). A su vez, éstas promueven un incremento en la adhesión de leucocitos al endotelio, un incremento en la permeabilidad vascular y en la acumulación de células espumosas (macrófagos con un exceso de contenido lipídico que se encuentran en las lesiones ateroscleróticas) (10). Por otra parte, el desbalance en los perfiles de expresión y secreción de factores paracrinos altera la interacción de las células endoteliales con otros tipos celulares, como células del músculo liso vascular (VSMCs, *Vascular Smooth Muscle Cells*), y por lo tanto su funcionamiento. En etapas subsecuentes del proceso aterogénico la hiperproliferación de las VSMCs causa un engrosamiento de la capa íntima de las arterias en los sitios de las lesiones ateromatosas (11) (Fig.1). Eventualmente, la capa sufre una ruptura que libera un trombo cuyas manifestaciones clínicas más frecuentes serán el Síndrome Agudo Coronario (SAC), Infartos Agudos al Miocardio (IAM) o Enfermedad Vascular Cerebral (EVC).

La susceptibilidad a desarrollar enfermedades cardiovasculares ha sido ampliamente descrita como una de las consecuencias a largo plazo para los fetos que estuvieron expuestos a condiciones intrauterinas adversas como Diabetes Gestacional (DG), inflamación crónica, restricciones de crecimiento intrauterino (IUGR, *Intrauterine Growth Restriction*), hipercolesterolemia, deficiencias de micronutrientes y preeclampsia entre otras (12-19). Tanto en estudios epidemiológicos de cohorte como en modelos animales se ha demostrado que estos individuos presentan fenotipos cardiovasculares patológicos intermedios en etapas muy tempranas, como engrosamiento de la íntima media y disfunción endotelial, que progresan a aterosclerosis y otras enfermedades en la vida adulta (20, 21). Algunas de las adaptaciones que ocurren en el sistema cardiovascular en respuesta a disruptores ambientales incluyen una reducción en el número de cardiomiocitos (22), de vasos capilares (rarefacción microvascular) (23), un aumento en la rigidez arterial (24, 25), alteraciones en las vías de estrés oxidativo, inflamación (26) y en el desarrollo de las VSMCs (27, 28). Adicionalmente, se han observado adaptaciones en sistemas de órganos íntimamente relacionados con la regulación de la tensión arterial como el riñón; a través de alteraciones en el sistema renina-angiotensina (29) y en el número de nefronas (30). Sin embargo, se ha propuesto que en

última instancia los mecanismos moleculares que median dichas adaptaciones podrían involucrar modificaciones epigenéticas, regulación de la cromatina y de la expresión génica.



**Figura 1. Patofisiología de disfunción endotelial y aterosclerosis.** El desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis es el resultado de procesos inflamatorios crónicos, a través de la sobreproducción y acumulación de oxLDL, de un incremento en el reclutamiento y trans migración de células del sistema inmune, en la producción de citocinas proinflamatorias y en la proliferación de VSMCs. Modificado de Gistera A. *et al.* (31).

### 1.3. La metilación de DNA como mecanismo epigenético vinculado con la programación metabólica fetal

Las modificaciones epigenéticas son aquellas que son heredables a través de las divisiones celulares y que tienen la capacidad de modificar la expresión génica, sin que haya cambios en la secuencia de DNA. Éstas incluyen modificaciones de histonas, de las cuales la metilación y la acetilación son de las más estudiadas (32), y metilación de DNA entre otras. Las marcas epigenéticas tienen la capacidad de modificar la estructura de la cromatina a través del reclutamiento de remodeladores de la cromatina, factores de transcripción y de coactivadores o correpresores, resultando en estados transcripcionalmente más o menos permisivos (Caja 1).

La regulación epigenética juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario. Los patrones de metilación de DNA se establecen en etapas tempranas del

desarrollo. Cuando se forma el cigoto, el genoma paterno sufre un proceso de desmetilación global de DNA, mientras que el genoma materno se va desmetilando en divisiones mitóticas subsecuentes. Posteriormente, previo a la implantación del blastocisto, cuando las células se empiezan a comprometer a linajes específicos, se da una metilación *de novo* mediada por DNMT3. Una vez establecidos, estos patrones de metilación se mantienen mediante la actividad de la DNMT1 en divisiones subsecuentes (33).

Por otra parte, en el proceso de diferenciación celular, se establecen perfiles de expresión linaje-específicos, que también son tiempo-espacio-específicos. Por lo tanto, debe existir un mecanismo de regulación fino para llevar a cabo dichos programas genéticos. La regulación epigenética juega un papel importante en el establecimiento de patrones de genes activos o silenciados, que determinarán los distintos linajes celulares. Las células pluripotentes de embriones tempranos, se caracterizan por tener una cromatina laxa en estado abierto y con dominios de cromatina bivalente (34). Estos últimos contienen tanto marcas activadoras como represoras, lo que mantiene a las células en un estado no diferenciadas, sin embargo, listas para ser activadas mediante estos dominios. Ante un estímulo de diferenciación hacia un linaje específico, los genes necesarios para dicho linaje serán activados mientras que otros genes no requeridos, serán silenciados a través de los dominios bivalentes. De tal forma se va restringiendo el potencial de diferenciación a lo largo de la especificación de distintos linajes (35). Al final, todas las células del organismo tienen el mismo genoma, pero cada tejido tiene un epigenoma distinto que dictará un programa de expresión génica específico.

A diferencia del genoma, que es sumamente estable, el epigenoma es susceptible a sufrir modificaciones en respuesta a señales tanto endógenas como ambientales. Por lo tanto, se han propuesto a las modificaciones epigenéticas como un mecanismo molecular de memoria a exposiciones ambientales durante el periodo perinatal (36-39). Es decir, estas modificaciones podrían mediar las adaptaciones funcionales que se observan en fetos que fueron expuestos a condiciones intrauterinas adversas. Se han propuesto dos hipótesis para explicar fenómenos de transmisión de información epigenética entre generaciones, en respuesta a estímulos ambientales. Éstas son: programación intergeneracional, cuyos efectos están limitados a las generaciones directamente expuestas al estresor ambiental; y herencia epigenética transgeneracional, cuyos efectos se hipotetiza, podrían ser observados en generaciones subsecuentes que no estuvieron expuestas al estímulo original (40).

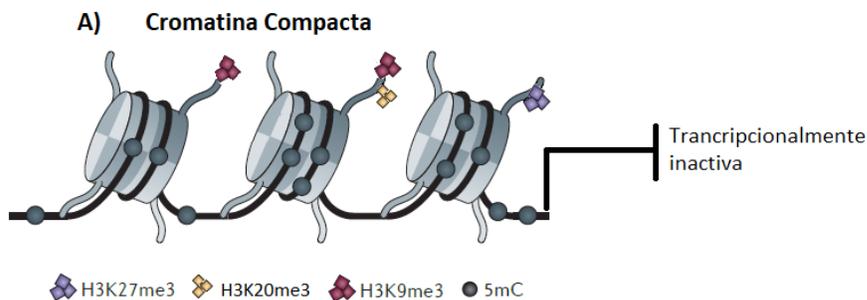
La metilación de DNA ha sido de particular interés por su importancia durante el desarrollo en la etapa de preimplantación y en procesos de diferenciación celular. Adicionalmente, es mucho más estable en comparación con modificaciones de histonas, por lo que se cree que alteraciones en los patrones de metilación de DNA durante el desarrollo podrían ser la base de la susceptibilidad a desarrollar distintas enfermedades durante la vida adulta. La metilación del DNA es catalizada por DNA metiltransferasas (DNMTs). El genoma humano codifica cinco DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L (41). Las DNMT3 establecen los patrones de metilación, mientras que la DNMT1 es de mantenimiento a través de las divisiones celulares. Estas tres son las formas canónicas, mientras que la DNMT3L y la DNMT2 son formas catalíticamente inactivas. La DNMT3L

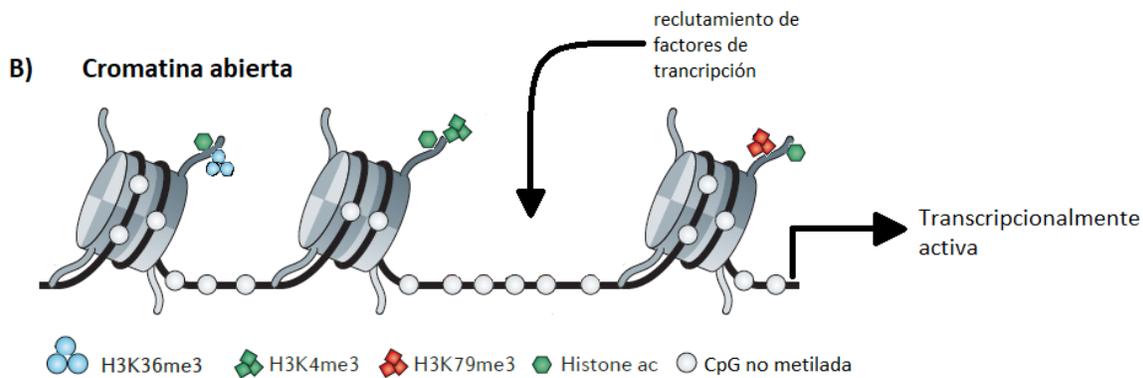
funciona como cofactor de las DNMT3, mientras que la DNMT2 se ha propuesto como una metiltransferasa de tRNAs. La metilación de DNA catalizada por las DNMTs canónicas se da en la posición 5' del anillo pirimidina de las citosinas, comúnmente en el contexto de dinucleótidos CpG (75% de estos dinucleótidos se encuentran metilados en el genoma de mamíferos). La 5-metilcitosina (5mC) es propensa a sufrir una deaminación hidrolítica espontánea hacia timina, por lo que la frecuencia observada de CpGs a lo largo del genoma es un quinto de la esperada (42). No obstante, existen regiones del genoma enriquecidas en dinucleótidos CpG que se encuentran en islas CpG. Éstas se definen como regiones de más de 200 pares de bases (bp) que tienen un contenido de CpGs mayor al 50% y que el cociente de CpGs observadas/esperadas es mayor a 0.6 (33). Estas regiones, muestran un contenido elevado de CpGs dado que hay poca depleción de las mismas, como resultado de una ausencia de metilación de citosinas en dichas regiones (43). Por otra parte, también existen desmetilasas de DNA, conocidas como TETs (*Ten Eleven Translocation*), que oxidan la 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). Estas formas oxidadas de 5mC resultarán en citosinas no metiladas a través de rondas subsecuentes de replicación (44). Este proceso se conoce como desmetilación de DNA activa. Usualmente, la metilación de dinucleótidos CpG en sitios proximales a elementos *cis* de promotores y en el exón 1 se asocia a un estado de la cromatina cerrado y por lo tanto transcripcionalmente inactivo (45).

Los mecanismos de represión transcripcional mediados por metilación de DNA, se dan mediante el reclutamiento de proteínas que actúan como represores transcripcionales, como MeCP2 (*Methyl CpG Binding Protein 2*) y MDBs (*Methyl CpG Binding Domain Protein*). Éstas son reclutadas en regiones metiladas y a su vez reclutan complejos corepresores que incluyen Desacetilasas de Histonas (HDACs) (46). Adicionalmente, se ha observado que ciertos factores de transcripción tienen la capacidad de unirse a DNA metilado a pesar de no poseer un dominio de unión a CpGs (MDB), como son CTCF (*CCCTC-binding factor*), Kaiso y CEBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$* ) entre otras (47). No obstante, es importante considerar que, aunque la hipermetilación se asocie con represión transcripcional, las modificaciones epigenéticas actúan en conjunto para generar conformaciones de la cromatina, por lo tanto, se deben tomar en cuenta otras marcas epigenéticas y mecanismos de regulación topológica para poder hacer inferencias sobre el estado transcripcional de una región dada del genoma (Caja1). Adicionalmente se ha visto que la metilación de DNA juega un papel en la impronta de ciertos genes como Igf2 (*Insulin-like growth factor 2*) / H19, en el cual el alelo materno y el paterno se encuentran silenciados respectivamente. La región de impronta de este gen, que se encuentra cercana al promotor de H19, contiene una secuencia de unión a CTCF. Cuando dicha región se encuentra hipometilada se favorece la unión de la proteína CTCF, que bloquea la interacción del *enhancer* con el promotor (48).

### Caja 1. Modificaciones epigenéticas y estado de la cromatina.

El DNA de eucariontes se encuentra asociado a proteínas histonas y no histonas en un complejo que se conoce como cromatina. La unidad básica de la organización cromosomal son los nucleosomas, que están conformados por 8 histonas (2 moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4) y el DNA de doble cadena asociado a éstas (fragmentos de 147 nucleótidos que le dan dos vueltas a las histonas). Adicionalmente, entre cada nucleosoma existe un fragmento de aproximadamente 80 nucleótidos asociado con una histona *linker* H1 (49). El espacio entre nucleosomas y qué tan estrecha sea la asociación entre el DNA y las histonas, determinará la accesibilidad de las secuencias de DNA a factores de transcripción. Por lo tanto, las modificaciones epigenéticas y los complejos remodeladores de la cromatina pueden regular la compactación y accesibilidad de la misma. Las modificaciones postraduccionales de histonas ocurren principalmente en los extremos N-terminal de las histonas y las combinaciones de éstas constituyen el código de histonas, el cuál puede ser “interpretado” por complejos remodeladores y modificadores de la cromatina. A grandes rasgos, la trimetilación de la lisina 4, 36 y 79 de la histona H3 así como la acetilación de lisinas, se asocian a estados abiertos de la cromatina; mientras que la trimetilación de la lisina 9, 20 y 27 de la histona H3 se asocian con estados cerrados de la cromatina (Fig.2.) (32). En particular, la acetilación de histonas se ha visto como una modificación importante para determinar el estado de la cromatina, dado que neutraliza las cargas positivas de las lisinas y por lo tanto desestabilizan la interacción de éstas con la el DNA (carga negativa). Otras modificaciones de histonas incluyen fosforilación,  $\beta$ -N-acetilglucosaminación, ADP ribosilación, ubiquitinación y sumoilación entre otras (50). Por otra parte, existen varios complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF, ISWI, helicasas con cromodominio de unión a DNA y INO80) que también pueden regular la compactación de la cromatina mediante una variedad de mecanismos que incluyen desplazamiento o desalojo de nucleosomas, entre otros (35). Por lo tanto, la regulación del estado de la cromatina es complejo y depende de varios mecanismos epigenéticos que actúan en conjunto para generar distintas conformaciones.





**Figura 2. Modelo de modificaciones epigenéticas y estado de la cromatina.** (A) Modificaciones asociadas con una cromatina compacta y por lo tanto transcripcionalmente inactiva. (B) Modificaciones asociadas con una cromatina abierta y por lo tanto transcripcionalmente activa. Modificado de Jones P.A. *et al.* (51).

Se han asociado condiciones intrauterinas tales como restricciones del crecimiento intrauterino (IUGR), hiperglucemia materna, DG y deficiencias de micronutrientes, con alteraciones en los patrones de metilación de distintos genes involucrados en enfermedades cardiovasculares y metabólicas. En un estudio hecho por el grupo de Huang H. (52), se identificaron regiones de metilación variable, con una diferencia mínima de 5% en los niveles de metilación en DNA de sangre de cordón umbilical, entre neonatos macrosómicos y de peso normal. De estas regiones, el 62.3% se encontraban hipometiladas. Adicionalmente, mediante análisis de enriquecimiento funcional, estas regiones se encontraron en genes relacionados con el término “Desarrollo embrionario de órganos”. Posteriormente, se hicieron mediciones antropométricas, de tensión arterial y de parámetros metabólicos en estos individuos cuando tenían entre 3 y 6 años de edad. De manera interesante, el peso al nacer se asociaba fuertemente con parámetros cardiometabólicos como niveles elevados de colesterol total (CT), LDL, insulina y un mayor cociente CT/ LDL en comparación con aquellos individuos que tuvieron un peso adecuado al nacer (52). En otro estudio, en el que utilizaron un modelo de células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) aisladas de neonatos expuestos a IUGR, se identificó una reducción en los niveles de metilación del promotor del gen eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*), en paralelo con un incremento en los niveles de metilación del promotor ARG2 (*Arginase 2*); comparados con los controles (53). Congruentemente, los niveles de RNAm (RNA mensajero) de eNOS se encontraron incrementados, mientras que los de ARG2 se encontraron disminuidos. Esta disminución en la proporción de la actividad de eNOS/ARG2 se ha implicado en el desarrollo de patologías vasculares (54). Por lo tanto, los autores describen la programación fetal de disfunción endotelial a través de un mecanismo dependiente de metilación de DNA en genes involucrados en la vía de producción de óxido nítrico, un metabolito fundamental en la patofisiología de la disfunción endotelial.

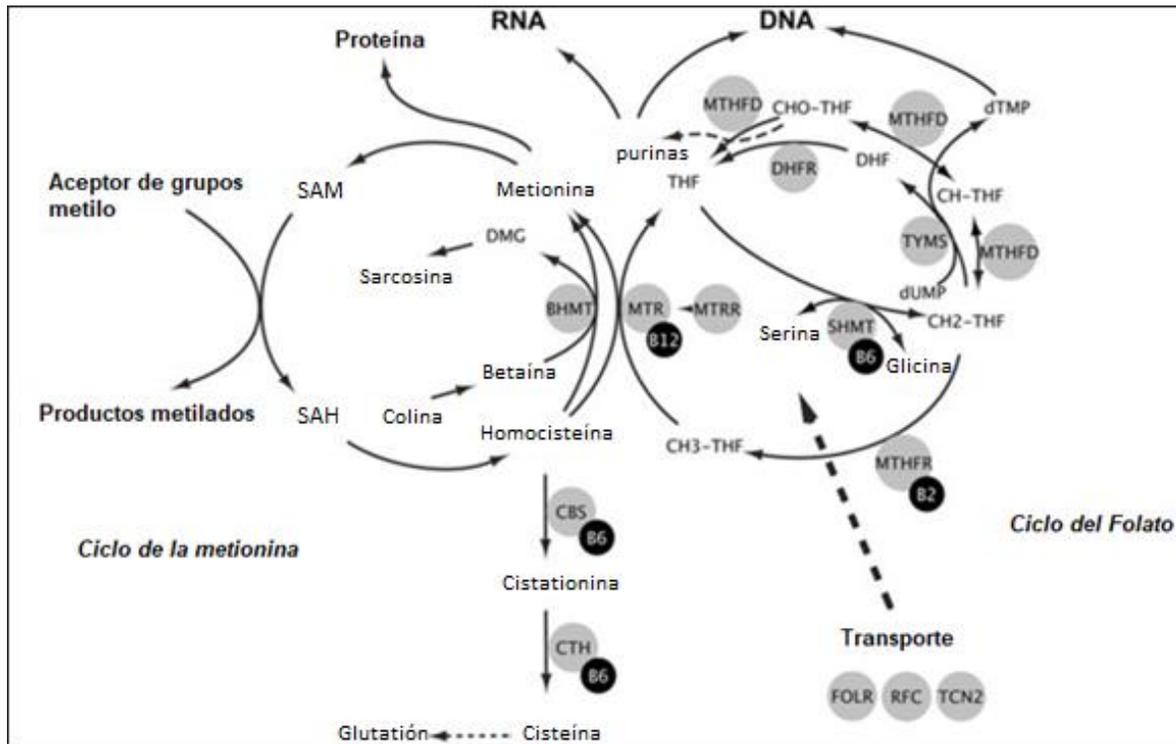
#### **1.4. El metabolismo de unidades de carbono como modulador de la metilación de DNA en respuesta a estímulos ambientales**

Las reacciones biológicas de metilación, incluyendo la de DNA, dependen de la biodisponibilidad de grupos metilo, la cual es regulada por el metabolismo de unidades de carbono (Fig.3). Este conjunto de vías metabólicas involucra la transferencia de grupos metilo a través de una serie de reacciones enzimáticas que se agrupan principalmente en los ciclos de folato, homocisteína y metionina. Los folatos dietarios son la fuente principal de sustratos para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Ésta cataliza la formación de 5-metiltetrahidrofolato (5-MeTHF), que dona su grupo metilo para la remetilación de la homocisteína, dando como producto metionina. Esta reacción es dependiente de vitamina B12 y es catalizada por la metionina sintasa (MTR). Alternativamente, los grupos metilo para la formación de 5-MeTHF pueden venir del catabolismo de aminoácidos en la mitocondria, en particular, a partir de la interconversión entre serina y glicina (55). La metionina es el precursor directo de S-adenosilmetionina (SAM), el donador universal para las reacciones de metilación de DNA, proteínas, RNA y fosfolípidos (56). El proceso de metilación del DNA es controlado por DNMTs que catalizan la transferencia del grupo metilo de la SAM al carbono 5' de citosinas (57). Adicionalmente, en el contexto del embarazo, esta vía refleja el estado nutricional y metabólico materno, estableciendo así una regulación de la metilación de DNA en tejidos fetales mediada por el ambiente materno.

Los folatos, son de particular importancia en el embarazo, durante el cual son necesarios para el desarrollo embrionario, por lo que aumenta su demanda. La deficiencia de folatos durante el embarazo confiere riesgo tanto a la madre como al feto. En la madre confiere riesgo para desarrollar anemia (58) y alteraciones metabólicas, mediadas por fallas en los mecanismos de regulación epigenética involucrados en el establecimiento de las adaptaciones metabólicas transitorias que se dan durante el embarazo (59). Por otra parte, en el feto se asocia principalmente con bajo peso al nacer (60) y defectos del tubo neural (DTN) (61). Adicionalmente, existe evidencia que la deficiencia de folatos durante el desarrollo embrionario participa en la programación fetal, a través de alteraciones en la metilación de DNA, que comprometen la proliferación y el mantenimiento celular (62), y que causan adaptaciones permanentes en el metabolismo del feto que incluso podrían ser heredadas más allá de la generación originalmente expuesta a dicha deficiencia.

El ratón *agouti* ha sido un modelo experimental que ha permitido estudiar el efecto del estado nutricional materno sobre el establecimiento de marcas epigenéticas en etapas tempranas del desarrollo. Este modelo involucra el epiallelo metaestable  $A^{vy}$  (alelos idénticos pero que su expresión es variable dependiendo de modificaciones epigenéticas que se establecen en etapas tempranas del desarrollo embrionario). El gen *Agouti* codifica para una proteína de señalización que promueve la producción de eumelanina negra o feomelanina marrón. En el promotor de este gen, la hipometilación resulta en su expresión ectópica en todos los tipos celulares (no sólo en células foliculares como se da normalmente), resultando en ratones con pelaje amarillo que desarrollan obesidad, diabetes y procesos tumorigénicos en su vida adulta (63). Utilizando este modelo, varios autores han reportado que la

suplementación materna durante el periodo de gestación, con micronutrientes que son donadores de metilos como ácido fólico, vitamina B12, betaína, metionina y colina, aumenta los niveles de metilación de DNA en el epialelo A<sup>vy</sup> resultando en crías con pelaje marrón que son delgadas y no presentan alteraciones metabólicas (64, 65).



**Figura 3. Metabolismo de Unidades de Carbono.** MTHFR cataliza la síntesis de 5-MeTHF, que actúa como donador de un grupo metilo para la síntesis de metionina a partir de homocisteína. La metionina es el precursor de SAM, el donador universal de grupos metilo para todas las reacciones biológicas de metilación, incluyendo metilación de DNA. Modificado de Myte R. *et al.* (66).

Otro modelo animal que ha provisto evidencia del papel que juega el metabolismo de folato en la programación metabólica fetal, involucra un ratón con una mutación hipomórfica en el gen que codifica para la Metionina sintasa reductasa (MTRR) (67). Esta enzima cataliza la metilación de cob(II)alamina, el cofactor de MTR, a cob(I)-alamina (vitamina B12) que es requerida para su reactivación. Dicha mutación, en el intrón 9 del gen, resulta en una disminución en su expresión del 20.7% al 64.3% en los ratones *Mtrr<sup>gt/gt</sup>*, y del 51% al 33.2% en los ratones *Mtrr<sup>+/gt</sup>*. Adicionalmente, estos ratones presentan deficiencia de folatos reflejada en altos niveles de homocisteína plasmática. Una proporción significativa de los embriones de las ratonas mutantes presentan un retraso en el desarrollo en el día embrionario E10.5 y malformaciones congénitas como defectos del tubo neural, anomalías placentarias y una variedad de defectos cardiacos, independientemente de su genotipo. Adicionalmente, un alelo mutante *mtrr<sup>gt</sup>* en alguno de los abuelos maternos resultó suficiente

para que la progenie de la generación F3, que no tenía la mutación, presentara dichos fenotipos adversos. Por otra parte, en las placentas de las crías que presentaban fenotipos adversos, se detectó una hipometilación de DNA global y por lo tanto una inestabilidad epigenética en el linaje trofoblástico. De tal forma los autores proveen un modelo de estudio de herencia epigenética transgeneracional mediada por el metabolismo de folatos.

En humanos, se ha visto que la biodisponibilidad de los metabolitos del metabolismo de unidades de carbono puede ser modulada por la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en los genes que codifican para enzimas y transportadores de la misma. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han demostrado una asociación de ciertos SNPs en genes involucrados en esta vía con niveles séricos de algunos metabolitos, particularmente homocisteína, folato y vitamina B12 (68-70). En algunos casos, como en el gen MTHFR, se sabe que la variante C677T disminuye la actividad enzimática, en 30% para los heterocigotos (CT) y en 65% para los homocigotos (TT) (71), lo que resulta en la disminución de los niveles de folato. Adicionalmente, algunos de estos SNPs se han asociado a niveles de metilación de DNA y a algunos rasgos adversos como defectos del tubo neural (DTN) y parto pretérmino (70, 72, 73).

Por otra parte, distintos estudios han reportado que la biodisponibilidad de ciertos metabolitos puede tener un papel en la programación fetal de riesgo para enfermedades cardiovasculares (18). Gardner et al. reportaron que deficiencias de folatos en la madre se asociaban con riesgo en la progenie a desarrollar hipertensión arterial (74). Asimismo, se ha observado una relación inversa entre los niveles séricos de folatos y homocisteína (75), y que la hiperhomocisteinemia correlaciona con resistencia a la insulina, disfunción endotelial, hipertensión y aterosclerosis (76). En estudios realizados con VSMCs (las células de músculo liso que se encuentran en las paredes de los vasos sanguíneos) del cordón umbilical en humanos, se identificó que la hiperhomocisteinemia se asociaba con hiperproliferación de estas células e hipometilación en la región de impronta de IGF2 (77, 78). Además, se ha demostrado que los niveles de homocisteína y folato, particularmente, se asocian con cambios en la metilación de genes específicos. El grupo de Wang, et al. utilizó un modelo de ratones ApoE<sup>-/-</sup>, los cuales desarrollan lesiones ateroscleróticas. Al inducir hiperhomocisteinemia mediante dieta, se observó un incremento en la presencia de lesiones ateroscleróticas e hipometilación del gen MCP-1. De manera interesante, la suplementación con ácido fólico y vitamina B12 en los ratones con hiperhomocisteinemia, restableció los niveles de metilación (79). Adicionalmente, varios estudios han demostrado que la deficiencia de folatos se asocia con hipometilación global (65, 80, 81).

### **1.5. Impacto del metabolismo de unidades de carbono sobre rasgos glucémicos en el embarazo**

Durante el embarazo, incrementa la demanda de folatos para proveer los grupos metilo necesarios para sustentar la proliferación celular y el crecimiento del feto; pero también para los procesos de adaptaciones metabólicas transitorias maternas que se dan durante el embarazo. Se ha propuesto que la metilación de DNA, así como otros mecanismos

epigenéticos, podrían tener un papel en el establecimiento de dichas adaptaciones (59). Un ejemplo son las adaptaciones que ocurren en el metabolismo de glucosa.

La segunda mitad del embarazo se caracteriza por un estado fisiológico de resistencia a la insulina, para aumentar la disponibilidad de glucosa necesaria para el crecimiento del feto y la placenta. Para compensar este estado, usualmente se da una expansión en las células  $\beta$  pancreáticas y un aumento en la secreción de insulina (82). Fallas en estos mecanismos, que resultan en una producción insuficiente de insulina para compensar el estado diabetogénico impuesto por el embarazo, se asocian al desarrollo de Diabetes Gestacional (DG) (83). Esta enfermedad se caracteriza como intolerancia a la glucosa que se presenta por primera vez durante el embarazo y que usualmente se diagnostica en el tercer trimestre. Recientemente en un estudio de cohorte, en el cual se analizó la metilación de DNA a nivel de genoma completo en sangre periférica de mujeres embarazadas, se reportó que existía un patrón de metilación distinto entre aquellas mujeres que desarrollaron DG comparado con las mujeres control (84). Este estudio fue el primero en analizar patrones de metilación en tejidos maternos y que provee evidencia sobre el papel que podría jugar la metilación de DNA en el desarrollo de DG y su utilidad como biomarcador clínico.

A su vez, la DG se ha asociado con fenotipos adversos en el recién nacido, como óbitos, malformaciones congénitas, síndrome de dificultad respiratoria neonatal y macrosomía (85). Adicionalmente, esta condición intrauterina se ha relacionado con programación fetal de obesidad, DT2 y enfermedades cardiovasculares (86). Se sabe que individuos expuestos a hiperglucemia durante la gestación presentan alteraciones en los patrones de metilación, elucidados en sangre del cordón umbilical y placenta, tanto a nivel de genoma completo (87) como en genes específicos involucrados a la resistencia a la insulina y distintos desórdenes metabólicos como dislipidemias (88-91). De igual forma, se ha reportado que el 11% de los genes en los que se ve afectada la metilación se encuentran en vías asociadas a enfermedades metabólicas (92). Por otra parte, también se han detectado fenotipos funcionales asociados a hiperglucemia materna. El grupo de Consoli (93), buscó estudiar alteraciones vasculares causadas por DG. En su trabajo reportan un incremento en la adhesión de monocitos y alteraciones en la producción de óxido nítrico estimulado por insulina, en células endoteliales *in vitro* derivadas de cordones umbilicales de individuos expuestos a DG. Los autores mencionan que estas adaptaciones pro-aterogénicas se mantienen a través de varios pases en cultivo, por lo cual proponen que podría ser atribuido a modificaciones epigenéticas y metabólicas que ocurren durante el embarazo por el fenómeno de programación fetal (93).

De manera interesante, en estudios realizados en nuestro laboratorio, observamos que existe una asociación con genes involucrados en metabolismo de unidades de carbono y el riesgo a desarrollar alteraciones metabólicas durante el embarazo, como DG. En una cohorte de pacientes embarazadas, se dilucidó una relación entre el fenotipo dual de niveles elevados de homocisteína y niveles disminuidos de folato con el desarrollo de DG (datos no publicados). Adicionalmente, se encontró que los parámetros glucémicos y la sensibilidad a la insulina durante el embarazo podían ser modulados por la dosis y tiempo de inicio de la suplementación con ácido fólico. Pacientes que iniciaron a suplementarse con ácido fólico

después del segundo trimestre del embarazo tenían una mayor resistencia a la insulina. En este sentido, la capacidad de la madre para metabolizar folatos, determinada por la presencia de distintos SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores del metabolismo de unidades de carbono, podrían modular los niveles de ciertos metabolitos como glucosa, folato y homocisteína. De manera interesante, algunos de estos SNPs modulan también el riesgo para DG. En particular, se identificó la variante C677T en el gen MTHFR (rs1), que cataliza la síntesis de 5-MeTHF, asociada a riesgo para DG y parámetros glucémicos en interacción con la suplementación de ácido fólico. Variantes en CUBN (rs1 y rs2), SARDH (rs1), MTHFR (rs2) y FIGN (rs1) también mostraron asociación con riesgo para DG, mientras que variantes en MTR (rs1) y SLC19A1 (rs1) resultaron protectoras (datos no publicados). De éstos, CUBN y SLC19A1 codifican transportadores de vitamina B12 y folatos (con mayor afinidad por las formas reducidas de folato), respectivamente, mientras que MTR y SARDH codifican enzimas. MTR cataliza la síntesis de metionina a partir de homocisteína y SARDH cataliza la desmetilación oxidativa de la sarcosina, lo que genera una fuente mitocondrial de unidades de carbono. FIGN codifica una chaperona cuya función ha sido menos estudiada, sin embargo, se ha reportado que es capaz de regular a la alta la expresión de SLC19A1 y DHFR (dihidrofolato reductasa) al inhibir su degradación en el proteasoma. Adicionalmente, la presencia de más de uno de estos SNPs podría tener efectos aditivos o sinérgicos (94). Por lo tanto, la combinación de SNPs presentes en la madre tendrá las siguientes implicaciones: 1) determinará la capacidad metabólica materna para metabolizar folatos, 2) modulará el riesgo a desarrollar alteraciones metabólicas durante el embarazo y 3) podría modular los niveles de metilación en tejidos maternos y fetales.

El esquema de suplementación con ácido fólico sintético recomendado actualmente es de 400µg al día al menos tres meses antes del embarazo y durante el primer trimestre. Este esquema de suplementación está basado en la prevención de defectos del tubo neural (DTN) (esta dosis disminuye el riesgo de DTN en un 36%) (95). Sin embargo, no existen estudios sobre la dosis adecuada de ingesta de folatos para prevenir otros tipos de desenlaces adversos tanto en la madre (como el desarrollo de alteraciones metabólicas durante el embarazo) como en el feto (programación metabólica fetal). Adicionalmente, los estudios previos se han realizado en otras poblaciones, sin tomar en cuenta que la frecuencia de las variantes en genes involucrados en la vía de unidades de carbono es diferente en cada la población. Por ejemplo, la variante C677T de la MTHFR es de muy alta frecuencia en la población mexicana (entre 50 y 58.5%) comparada con la frecuencia reportada en otras poblaciones (96-98).

### **1.6. Integración de factores genéticos y metabólicos maternos en la caracterización de ambientes intrauterinos vinculados con programación fetal**

Distintos estudios han utilizado marcadores bioquímicos para caracterizar ambientes intrauterinos adversos que puedan asociarse a programación fetal, los cuáles no permiten establecer causalidad. Sin embargo, el enfoque propuesto por Relton et al. (99) y utilizado por Allard et al. (100) para el estudio de los mecanismos vinculados a programación fetal tiene el potencial de mejorar inferencia causal, aunque sin poder establecerla con certeza. Esta metodología consiste en el estudio de un conjunto de SNPs maternos, marcadores bioquímicos y su asociación con fenómenos epigenéticos implicados en programación fetal.

Si se encuentra una asociación significativa tanto entre los marcadores bioquímicos como en los SNPs maternos, con marcas epigenéticas, esto sustenta que los factores metabólicos son en parte causales del estatus epigenético. Los autores argumentan que esto es por la naturaleza estática de las variantes genéticas, que no pueden ser modificadas por condiciones ambientales en contraste con los marcadores bioquímicos. En este estudio, a partir de SNPs previamente asociados con niveles elevados de glucosa, se estableció un puntaje de riesgo genético (GRS, *genetic risk score*) para hiperglucemia durante el embarazo y se evaluó su asociación con modificaciones en los patrones de metilación en individuos expuestos a esta condición *in útero*.

Los puntajes de riesgo genético buscan explicar la mayor proporción de la varianza del fenómeno de estudio, a partir de una combinación de varios marcadores genéticos asociados con desenlaces clínicos relevantes (101). Es decir, permite integrar la contribución de distintos marcadores; por lo tanto, han sido aplicados como herramientas de predicción de fenotipos o patologías de interés. En este caso, el GRS generado fue utilizado para caracterizar un ambiente intrauterino adverso de hiperglucemia. Por lo tanto, este enfoque se podría seguir con otras vías metabólicas, como el metabolismo de unidades de carbono, para dilucidar el efecto de ambientes intrauterinos adversos sobre cambios en la metilación de DNA vinculados con programación fetal.

## **2. Justificación**

En las últimas décadas se ha dado un gran aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, en México estas enfermedades son la causa número uno de muerte, representan el 15% de las muertes en nuestro país (102) y el 31% de las muertes a nivel mundial (103). Se cree que el fenómeno de programación metabólica fetal ha contribuido significativamente al aumento en la incidencia de distintas patologías, dado que exposiciones ambientales durante el desarrollo embrionario serán determinantes para las condiciones de salud y enfermedad durante la vida adulta. Se ha propuesto que las bases moleculares del fenómeno de programación fetal involucran cambios epigenéticos mediados por el ambiente intrauterino, que a su vez resultarán en las adaptaciones funcionales en el metabolismo del feto. El embarazo presenta una ventana de oportunidad para la implementación de medidas que prevengan adaptaciones adversas en el metabolismo fetal. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de factores de riesgo para el desarrollo de ambientes intrauterinos adversos, así como los mecanismos involucrados en las adaptaciones epigenéticas.

Las alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono durante el embarazo, como son las deficiencias de folato, han sido predominantemente estudiadas en el contexto de malformaciones congénitas. Nuestro grupo ha estudiado en una amplia cohorte de mujeres gestantes los efectos de la variabilidad en el tiempo y dosis de suplementación de folato, en el contexto de la predisposición genética para distintos desenlaces adversos tanto para las madres como para los productos. Sin embargo, hasta el momento no se han explorado cambios epigenéticos y funcionales vinculados a la programación fetal y su relación con el metabolismo de unidades de carbono. Particularmente en este trabajo nos enfocamos a aquellos cambios relacionados a la disfunción endotelial y la aterosclerosis. De tal forma que el estudio de factores genéticos y metabólicos maternos involucrados en el establecimiento de un ambiente intrauterino adverso permitiera identificar adaptaciones fetales que se manifiestan en el periodo postnatal como fenotipos de riesgo cardiovascular.

## **3. Pregunta de Investigación**

¿Los patrones de metilación de DNA y la abundancia de RNAm de genes vinculados con disfunción endotelial y aterosclerosis en HUVECs pueden ser modulados por el metabolismo de unidades de carbono durante el embarazo?

#### **4. Hipótesis**

Alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono durante el embarazo, resultarán en cambios en los niveles de metilación de DNA y abundancia de RNAm de genes vinculados con la disfunción endotelial y la aterosclerosis en HUVECs.

#### **5. Objetivo General**

Evaluar cambios en los niveles de metilación de DNA y abundancia de RNAm de genes vinculados con disfunción endotelial y aterosclerosis en HUVECs, mediados por alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono durante el embarazo.

#### **6. Objetivos Particulares**

- Caracterizar las alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono durante el embarazo mediante un puntaje de riesgo genético y marcadores metabólicos maternos.
- Evaluar el efecto de la dosis de suplementación con ácido fólico sobre la predisposición a desarrollar fenotipos metabólicos adversos durante el embarazo.
- Evaluar el efecto de las alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono sobre los niveles de metilación de DNA global (LINE-1) y en regiones reguladoras de genes vinculados con programación fetal de disfunción endotelial y aterosclerosis (TNF $\alpha$ , MCP-1, IGF2 y LEPR) en HUVECs.
- Evaluar los niveles de RNAm de genes regulados por las regiones cuya metilación de DNA en HUVECs se asocie con las alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono.
- Evaluar el efecto de las alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM1 y VCAM1, en HUVECs.
- Evaluar el efecto de la suplementación con folato en los niveles de metilación de DNA de las regiones previamente asociadas con las alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono, y sobre la expresión de ICAM1 y VCAM1, en HUVECs.

## **7. Metodología**

### **7.1. Cálculo del tamaño de muestra**

El cálculo del tamaño de muestra se hizo mediante una regresión lineal múltiple usando una  $\alpha$  de 0.05 y un poder estadístico de 0.8. Los parámetros utilizados para el cálculo son los descritos en el trabajo de Allard C. *et al* (100). Estos autores reportan una asociación entre un GRS para hiperglucemia materna e hipometilación en el gen de Leptina (LEP) en células de sangre de cordón umbilical. Haciendo este cálculo se requerirá un tamaño de muestra de 88 mujeres. Sin embargo, es posible que, si el GRS generado explicara un mayor porcentaje de la varianza del fenotipo de interés, se requiera un número menor de pacientes para observar diferencias estadísticamente significativas. Se considerarán como covariables de ajuste el índice de masa corporal (IMC) pregestacional, edad materna, dosis de suplementación materna con ácido fólico y ancestría.

### **7.2. Captación, obtención de muestras y seguimiento.**

Las muestras empleadas para este estudio se obtuvieron de una cohorte de mujeres embarazadas reclutadas de 2005 a la fecha, en dos fases, como parte del estudio “Mecanismos de programación fetal vinculados a enfermedades crónicas en el adulto”, con número de registro 11-93-2015, aprobado por el comité de ética e investigación del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. La primera cohorte consiste de 614 mujeres, mientras que la segunda cohorte consiste de 172 mujeres. De esta segunda cohorte, únicamente se obtuvieron datos y muestras de sus neonatos en 53 casos, que fueron las que tuvieron seguimiento hasta el momento del parto.

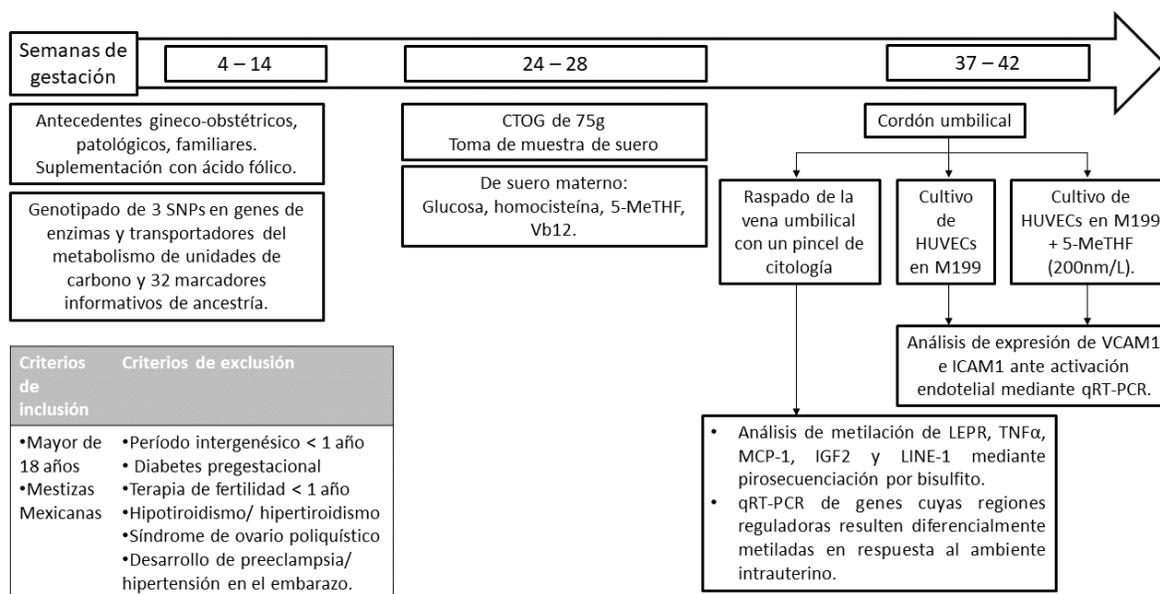
La metodología general del estudio se describe a continuación:

Las pacientes fueron captadas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Médicos del Servicio de Ginecología y Obstetricia invitaron a participar en el estudio a mujeres mestizas mexicanas (con padres y abuelos mexicanos), mayores de 18 años que tuvieran entre 4 y 14 semanas de gestación. Los criterios de exclusión fueron: período intergenésico menor a un año, diabetes pregestacional, terapia de fertilidad, hipo/hipertiroidismo, síndrome de ovario poliquístico y otras enfermedades que alteren el metabolismo de carbohidratos. Se eliminaron del seguimiento a pacientes que desarrollaron hipertensión o preeclampsia durante el embarazo. Las pacientes firmaron una carta de consentimiento informado y posteriormente se les realizó la primera evaluación.

Durante la primera evaluación se interrogó a las pacientes para llenar una hoja de recolección de datos (que incluye antecedentes gineco-obstétricos, antecedentes personales patológicos, antecedentes familiares y suplementación con ácido fólico) y se tomaron medidas antropométricas (peso y talla). Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre en un tubo con EDTA, que fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Posteriormente, entre las semanas 24 y 28 del embarazo se les realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de 2 horas con 75g de glucosa y se tomaron muestras de suero basal y en cada hora de la curva.

Para el estudio de la segunda cohorte, durante el parto se recolectó el cordón umbilical y se almacenó en PBS (sin calcio y magnesio), pH 7.2 a 4°C hasta el momento de su procesamiento (en menos de 12 horas). El diseño experimental se muestra en la Fig.4.



**Figura 4. Diseño experimental del estudio de la segunda cohorte.** N=172 mujeres, de las cuáles para 53 tienen datos del par madre-hijo.

### 7.3. Criterios de selección de SNPs y genotipificación

La selección de SNPs se hizo con base en resultados previos de nuestro grupo, los cuales elucidaron la asociación de distintas variantes genéticas con niveles de homocisteína, folato y vitamina B12. Se genotiparon aquellos SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores del metabolismo de unidades carbono que previamente se habían asociado tanto a homocisteína, folato y a riesgo para DG. Se hizo extracción de DNA a partir de las muestras de sangre periférica de las pacientes mediante el kit QIAamp 96 DNA Blood Kit-12 (Qiagen) y la concentración fue analizada utilizando un NanoDrop ND 1000. El genotipado de los SNPs en genes involucrados en el metabolismo de unidades de carbono y de 32 marcadores de ancestría informativos (AIMs) se hizo con la plataforma QuantStudio (Life Technology).

#### 7.4. Generación del puntaje de riesgo genético

A partir de la cohorte de la primera fase de reclutamiento, previamente realizada en el laboratorio, que consiste de 614 mujeres gestantes mexicanas (Tabla S7), se analizaron 40 SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores del metabolismo de unidades de carbono que habían sido asociados a los niveles séricos de metabolitos como folato, homocisteína y vitamina B12 en GWAS; a defectos del tubo neural y otras malformaciones, o bien a metilación de DNA. De estos, 7 SNPs se asociaron significativamente con riesgo a DG (Tabla 1). Para la generación del GRS, se seleccionaron de estas 7 variantes aquellas que mostraron asociación con los niveles séricos de homocisteína o folato durante la SDG 24 – 28, cuando se realizaron las CTOG (Tabla 2). Para aquellas variantes previamente reportadas en asociación con homocisteína y folato se consideraron significativas con un p-valor menor a 0.05. Para aquellas variantes que no habían sido previamente reportadas se consideraron las asociaciones con un p-valor menor a 0.007 (corregido por Bonferroni para 7 comparaciones). Para construir un GRS ponderado, se calcularon los coeficientes  $\beta$  de dichas regresiones y se multiplicaron por el número de alelos de riesgo (0, 1, 2) de cada variante seleccionada. Adicionalmente, se calculó el coeficiente  $\beta$  de la regresión lineal entre homocisteína y folato para ponderar la sumatoria de los términos de asociación con homocisteína y se sumó con los términos de asociación a folato de forma análoga al método reportado por el grupo de Camp N.J. (104). Dichos cálculos se resumen en la siguiente fórmula.

$$GRS = \left( \sum \beta_{i \text{ homocisteína}} SNP_{i \text{ homocisteína}} \right) \times \beta_{\text{folato homocisteína}} + \sum \beta_{j \text{ folato}} SNP_{j \text{ folato}}$$

**Tabla 1. SNPs asociados con riesgo a DG, evaluados para las asociaciones con homocisteína o folato séricos.**

SNP	Gen	Chr	Región	Alelo menor	Frecuencia del alelo menor (MEX)	Rasgo asociado
rs1	<i>CUBN</i>	10	Exón 8	T	0.16	Vitamina B12, DTN (70, 73)
rs2	<i>CUBN</i>	10	Intrón 14	G	0.1	Vitamina B12, DTN (70, 73)
rs1	<i>FIGN</i>	2	Intrón 2	G	0.12	Folato (70)
rs1	<i>MTHFR</i>	1	Exón 4	A	0.56	Folato, homocisteína, metilación de DNA, DTN (70, 97, 105, 106)
rs1	<i>MTR</i>	1	Exón 25	G	0.2	Homocisteína (107)
rs1	<i>SARDH</i>	9	Exón 2	T	0.21	Homocisteína, metilación de DNA (108)
rs1	<i>SLC19A1</i>	21	Exón 2	A	0.4	Folato, homocisteína, metilación de DNA, DTN (109-111)

**Tabla 2. SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores utilizados para la construcción del GRS.**

SNP	Gen	Chr	Región	Alelo menor	Frecuencia del alelo menor (MEX)	Rasgo asociado
rs1	<i>CUBN</i>	10	Exón 8	T	0.16	Vitamina B12, DTN (70, 73)
rs1	<i>FIGN</i>	2	Intrón 2	G	0.12	Folato (70)
rs1	<i>MTHFR</i>	1	Exón 4	A	0.56	Folato, homocisteína, metilación de DNA, DTN (70, 97, 105, 106)

### 7.5. Mediciones y Parámetros Bioquímicos / Antropométricos

Se determinaron niveles de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triacilglicéridos (TG) por métodos enzimáticos. Los niveles de LDL se calcularon utilizando la fórmula de Friedwald (112). Adicionalmente, se determinaron los niveles de folato y vitamina B12 mediante métodos enzimáticos basados en quimioluminiscencia (Beckman Coulter) y de homocisteína mediante colorimetría (Beckman Coulter). Estas determinaciones se hicieron en las muestras de suero materno, recolectadas durante las semanas 24 – 28 del embarazo.

El área bajo la curva (AUC) de los niveles de glucosa durante la CTOG se calculó mediante el método de trapezoide de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AUC = \left[ \left( \frac{glucosa_{ayuno} + glucosa_{60'}}{2} \right) 60 \right] + \left[ \left( \frac{glucosa_{60'} + glucosa_{120'}}{2} \right) 60 \right]$$

El IMC se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $IMC = \frac{peso (Kg)}{talla^2 (m^2)}$ . Se utilizaron como puntos de corte aquellos propuestos por la OMS que definen bajo peso <18.5, normopeso 18.5 – 24.99, sobrepeso 25 – 29.99, obesidad grado I 30 – 34.99, obesidad grado II 35 – 39.99, obesidad grado III > 40 (113).

Otras clasificaciones maternas y neonatales evaluadas incluyen:

- *Edad materna avanzada* se considera si la madre tenía 35 años de edad o más al inicio del embarazo.
- *Alta paridad* como 3 o más gestas, incluyendo la de estudio.
- *Productos macrosómicos o hipertróficos* se consideran aquellos recién nacidos con un peso mayor a 4000 gr.
- *Parto pretérmino* si el parto sucedió entre la semana gestacional 28 y 36.

## **7.6. Obtención y cultivo de HUVECs**

De los cordones umbilicales recolectados se realizaron raspados de la vena umbilical de fragmentos de 10 – 15 cm con cepillos de citología (hc2 DNA collection Device) para obtener las células endoteliales. Los cepillos se colocan en PBS + 4% albúmina bovina y se agitan a 3000 rpm. Posteriormente, se retira el cepillo del tubo y se centrifuga a 1200 rpm por 10 minutos. Se hace un lavado del botón de células obtenidas con Buffer EL (Qiagen) y se incuban a 4°C por 10 minutos. Se centrifuga nuevamente a 10,000 rpm, a 4°C por 10 minutos y se resuspende el botón de células en 500µL de buffer EL, el cual se almacena a -70°C para realizar posteriormente la extracción de DNA/RNA.

Adicionalmente, se aislaron HUVECs para cultivo utilizando el protocolo descrito por Baudin et al. (114) con algunas modificaciones. Brevemente, fragmentos de 15 – 30 cm de cordón se limpian con gasas estériles y alcohol al 70% (v/v). Se inserta una cánula a la vena umbilical, se pinza y se fija con un cincho de plástico ajustable. Se perfunde el cordón con solución HEPES, pH 7.2 para lavar el exceso de sangre. Posteriormente, se coloca otro cincho en el extremo del cordón que no está canulado y se llena la vena con aproximadamente 10mL de colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) 0.01% en HEPES. Se coloca el cordón en ~200mL de HEPES y se incuban en un baño maría a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se recupera la colagenasa en un tubo de 50mL y se inactiva con suero bovino fetal (SBF). Se hacen dos lavados de la vena umbilical y se recolecta el líquido. Se centrifuga a 1200rpm por 8 minutos y posteriormente se siembran las células en cajas de cultivo de 25mm<sup>2</sup> (previamente tratadas con gelatina de piel de bovino) con medio M199 enriquecido con 10% SBF, heparina 2 UI/mL, mitógeno endotelial 25mg/mL, 1% L-glutamina 200mM y 100UI/mL penicilina/estreptomicina. Las células se incuban a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas se hacen lavados para eliminar células sanguíneas y se dejan con 4mL de medio. Se hacen cambios de medio cada tercer día hasta que las células alcancen un 80% de confluencia (en 6 días aproximadamente), momento en el cual se tratan con tripsina las células para extraer DNA/RNA de las mismas.

## **7.7. Criterio de selección de regiones para el estudio de metilación de DNA**

Se hizo una revisión en la literatura de estudios que hubieran identificado regiones susceptibles a cambios en los niveles de metilación de DNA en respuesta a hiperglucemia, hiperhomocisteinemia, IUGR o que estuvieran asociados a fenotipos adversos en los recién nacidos. De esas regiones, se seleccionaron para esta tesis, aquéllas que fueran relevantes para la patofisiología de disfunción endotelial y aterosclerosis. Las regiones seleccionadas se muestran en la Tabla 3. Adicionalmente, se seleccionaron secuencias LINE-1 como un indicador de los niveles de metilación global.

**Tabla 3. Regiones de genes asociados a condiciones intrauterinas adversas relevantes en la patofisiología de disfunción endotelial y aterosclerosis para el estudio de metilación de DNA.**

<b>Gen</b>	<b>Región</b>	<b>Rasgo asociado</b>	<b>Tejido</b>
<b>LEPR</b>	Exón 1	Restricción de crecimiento intrauterino (IUGR) (115)	Placenta
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-2007 a -1731 respecto al TSS	Hiper glucemia materna (116)	Tejido adiposo perirrenal (ratas)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Promotor -312 a -41	Niveles de homocisteína en pacientes con DT1(117)	Sangre periférica
<b>MCP-1</b>	Promotor -354 a -164	Niveles de MCP-1 en pacientes con DT2 (118) Niveles de homocisteína en ratones ateroscleróticos (79)	Sangre periférica
<b>IGF2</b>	-2085 a -1914 respecto al TSS	Macrosomía Hiper glucemia materna (119) Hiperhomocisteinemia e hiperproliferación de VSMCs (78)	Sangre de cordón umbilical VSMCs de cordón umbilical
<b>H19</b>	-2299 a -1826 respecto al TSS	Macrosomía Hiper glucemia materna (119)	Sangre de cordón umbilical
<b>LINE-1</b>		Macrosomía (120)	Sangre de cordón umbilical

## 7.8. Conversión por bisulfito y Pirosecuenciación

De las HUVECs obtenidas mediante los raspados y de cultivo se hizo extracción de DNA/RNA usando el AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). La concentración del DNA obtenido se analizó utilizando un NanoDrop ND 1000. Posteriormente, se sometieron 800 ng de DNA a conversión por bisulfito utilizando el EpiTect 96 Bisulfite kit (Qiagen) y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los *primers* de amplificación y el *primer* de secuenciación para cada una de las regiones se diseñaron utilizando el programa PyroMark Assay Design 2.0. Las secuencias de los *primers* se presentan en la Tabla S1. Dado que el rango óptimo de secuenciación es de 120 bp, algunas regiones se dividieron en varios amplicones para poder ser secuenciadas completas. Uno de los *primers* debe ir biotinilado (el que va en sentido contrario al primer de secuenciación) y deben de ser purificados por HPLC.

Las PCRs de amplificación se hicieron con el *PyroMark PCR kit (Qiagen)* utilizando 12.5 $\mu\text{L}$  *PyroMark PCR MasterMix 2x*, 2.5 $\mu\text{L}$  *CoralLoad Concentrate 10x*, 2.5 $\mu\text{L}$  de la mezcla de *primers* sentido y antisentido 10x y 20 ng de DNA convertido por bisulfito en un volumen final de 25 $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla S2. Los ensayos de pirosecuenciación se hicieron en el pirosecuenciador *Q24 Advanced* utilizando *Pyromark Q24 Advanced CpG Reagents*. Brevemente, para la purificación del producto PCR se utilizaron 10 $\mu\text{L}$ , 1 $\mu\text{L}$  de perlas de sefarosa cubiertas de estreptavidina y 40 $\mu\text{L}$  de buffer de unión en un volumen total de 80 $\mu\text{L}$ . Los productos de PCR biotinilados unidos a las perlas de sefarosa se someten a lavados con etanol 70%, solución de desnaturalización (NaOH) y solución de lavado en la estación de vacío (*PyroMark Q24 Vacuum Prep Workstation*). Posteriormente, las perlas se liberan a una placa que contiene 20 $\mu\text{L}$  del *primer* de

secuenciación (0.375 $\mu$ M). Esta se somete a una incubación a 80°C por cinco minutos antes de iniciar la corrida.

### **7.9. Suplementación con folato en cultivo**

Las células endoteliales obtenidas de cordones umbilicales de pacientes expuestas al GRS de riesgo en conjunto con dosis bajas de suplementación con ácido fólico durante el embarazo se sometieron a un esquema de suplementación con 200 nmol/L de 5-metiltetrahidrofolato (5-MeTHF) por 72 horas en cultivo. En mujeres embarazadas, la dosis recomendada de suplementación con ácido fólico para corregir anemia por deficiencia de ácido fólico o para prevención de malformaciones en pacientes con antecedentes de productos malformados es de 5mg al día. Con esta dosis se ha observado que la concentración que se alcanza de 5-MeTHF en suero es de 200 nmol/L (121, 122), por lo tanto, se utilizó esta concentración para suplementar los cultivos de células endoteliales del cordón umbilical. Adicionalmente, después de 48 horas de suplementación con folato en cultivo, el exporte de homocisteína de las células disminuye significativamente y después de 72 horas alcanza el nivel más bajo (123).

### **7.10. Ensayos de activación endotelial**

Para determinar los niveles de expresión de las moléculas de adhesión VCAM1 y ICAM1, se hicieron ensayos de activación endotelial. Se utilizaron HUVECs de los productos de 3 pacientes con GRS de riesgo y baja suplementación contra 3 pacientes con GRS protector. Se hicieron cultivos por triplicado de cada paciente para cada experimento. Se sembraron 59,000 células por pozo (en placas de 12 pozos) y una vez que llegaron al 90% de confluencia se incubaron con TNF $\alpha$  (1ng/mL) durante 16 horas. Al finalizar esta incubación se lisaron las células para hacer extracción de RNA. Adicionalmente, se hicieron ensayos en los cuales se suplementaron los cultivos de HUVECs con 200nM 5-MeTHF y durante las últimas 16 horas de las 72 horas de suplementación con folato, se incubaron las células con TNF $\alpha$  para la posterior extracción de RNA.

### **7.11. Síntesis de cDNA y ensayos de qRT-PCR**

El RNA fue purificado de HUVECs obtenidas mediante raspados de la vena umbilical y de cultivos con el *AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)*. La concentración del RNA obtenido se analizó utilizando un NanoDrop ND 1000. Se hizo retrotranscripción mediante el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* a partir de 1 $\mu$ g de RNA. Para los casos en los que no se obtuvo 1 $\mu$ g de RNA, se hizo la retrotranscripción con el doble de volumen de los reactivos del kit. El mínimo de RNA necesario para la síntesis de cDNA fue de 100ng.

Se utilizó PCR en tiempo real (qPCR) para caracterizar las HUVECs mediante la expresión de marcadores específicos de este linaje celular. Se utilizaron los genes vWF

(Factor Von Willebrand), PECAM-1 y CD146 que son específicos de HUVECs. Adicionalmente se utilizó CD45 como un marcador de linaje hematopoyético, que se expresa en la mayoría de leucocitos para determinar la presencia de células contaminantes de otros linajes. Se hicieron cuantificaciones relativas a B2M ( $\beta$ -2 microglobulina), como gen de expresión constitutiva, mediante el método  $\Delta\Delta C_t$ . Los *primers* utilizados se muestran en la Tabla S3. Se utilizó el kit *Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (ThermoFisher)*, con 10 ng de cDNA y 0.3  $\mu$ M de *primers* sentido y antisentido en un volumen total de 12.5  $\mu$ L. Las reacciones se corrieron en el sistema *Step One Plus (Applied Biosystems)* por triplicado. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla S4.

Adicionalmente, se utilizó qPCR para analizar la expresión de genes cuyos niveles de metilación de DNA en sus regiones reguladoras resultaron asociados con factores maternos de interés, así como de las moléculas de adhesión VCAM1 y ICAM1 de HUVECs en las cuáles se indujo activación endotelial. Se utilizaron 10 ng de cDNA, 0.3  $\mu$ M de cada primer sentido y antisentido en un volumen total de 20  $\mu$ L con el *QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen)* en un sistema *Step One Plus (Applied Biosystems)* por triplicado. De igual forma se hicieron cuantificaciones relativas a B2M, como gen de expresión constitutiva, mediante el método  $\Delta\Delta C_t$ . Dado que no fue posible parear a las pacientes en los análisis de expresión de VCAM1 y ICAM1, se calculó el número de veces del cambio en su expresión relativa después de la activación endotelial, comparado con su expresión relativa basal mediante el método de Livak. De esta forma se toman en cuenta condiciones intrínsecas de las pacientes, como el IMC y otras condiciones inflamatorias, que pudieran causar cambios en la expresión de las moléculas de adhesión analizada. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla S5 y las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en la Tabla S6.

## 7.12. Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron hechos en R 3.4.3 (124) salvo para los que se indica de otra manera. Se analizó que todos los SNPs utilizados estuvieran en equilibrio Hardy-Weinberg con el programa PLINK v1.07 (125). Con este mismo programa se calcularon las frecuencias alélicas. Los análisis de asociación entre las variantes génicas y homocisteína o folato hechos en la cohorte de 614 mujeres, se hicieron con modelos de regresión lineal en los que se incluyeron como covariables IMC pregestacional, edad materna, hospital de referencia, dosis de suplementación con ácido fólico y los 10 primeros componentes obtenidos de un análisis de componente principales (PCA) de un panel de 118 AIMs para corregir por estratificación poblacional.

El GRS construido a partir de las variantes seleccionadas y los coeficientes  $\beta$  de las mismas obtenidos de la primera cohorte de 614 mujeres, fue evaluado en la segunda cohorte de 172 mujeres mediante modelos de regresión lineal con el término de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación con ácido fólico. Se incluyeron como covariables IMC pregestacional, edad materna, los 15 primeros componentes principales de un panel de 32 AIMs (dado a que contuvieron el 70% de la varianza) y número de gestas (para rasgos metabólicos relacionados con el metabolismo de carbohidratos). Ambos paneles de AIMs

utilizados han sido previamente validados con datos de genoma completo. Algunas características importantes de los marcadores utilizados son: 1) distribuidos en todos los cromosomas y 2) ningún marcador se encuentra en desequilibrio de ligamiento.

Para cada región de estudio, se calculó el porcentaje global de metilación como la media de metilación de todos los sitios CpGs. En cada sitio CpG el porcentaje de metilación se determinó mediante el software *PyroMark Q24 Advanced (Qiagen)* como:

$$\% \text{ metilación} = \frac{\text{altura de la señal C}}{\text{altura de la señal C} + \text{altura de la señal T}}$$

Para los ensayos en dirección reversa se utiliza la misma fórmula, pero con la altura de los picos del nucleótido G en vez de C y de A en vez de T. Los análisis de asociación para el porcentaje de metilación global de cada región, se hicieron mediante regresiones lineales con el término de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación con ácido fólico e incluyendo como covariables IMC pregestacional, edad materna, homocisteína y glucosa 120' durante la CTOG. Adicionalmente, se hizo un análisis de mediación utilizando la paquetería *mediation* de R (126). Este análisis fue hecho en una submuestra de 30 pares madres-hijos por lo cual para evaluar su aleatoriedad y representatividad se compararon parámetros bioquímicos y clínicos relevantes entre las pacientes incluidas y no incluidas en esta submuestra, mediante pruebas de U Mann-Whitney.

Para los experimentos en cultivo, las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante pruebas no paramétricas. Se utilizó la prueba U Mann Whitney cuando se compararon dos grupos y una ANOVA no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) cuando las comparaciones fueron entre más de dos grupos. Para este último caso, se utilizó la prueba post-hoc de Dunn para determinar cuál de los pares de comparaciones era más significativo.

## 8. Resultados

### 8.1. Estadística descriptiva de la cohorte madres-hijos

Se incluyeron 172 mujeres de las cuales se cuentan con 53 muestras de HUVECs de sus hijos. Las características de las mujeres como de los neonatos se muestran en la tabla 4. En esta cohorte la mediana de la edad de las madres fue de 27 años y la mediana del IMC pregestacional fue de 24.59 Kg/m<sup>2</sup>. El porcentaje de mujeres con DG, obesidad o edad materna avanzada fue de 16.92, 16.27 y 19.18, respectivamente. Dichas patologías o condiciones han sido ampliamente descritas como condiciones que contribuyen a alteraciones del ambiente intrauterino y riesgos para la salud durante la vida adulta de los fetos expuestos. Por otro lado, la mediana del inicio de suplementación con ácido fólico fue a las 4 semanas de gestación (SDG) y la dosis mediana diaria fue de 0.8mg. Únicamente el 2.32% de las pacientes se suplementaron con una dosis menor a 400µg, actualmente recomendada para prevenir DTN.

La mediana del peso de los recién nacidos fue de 3036 gr y el 1.7% fueron productos macrosómicos. Únicamente el 3.77% de los partos fueron pretérmino. De los recién nacidos el 46.43% fueron mujeres y el 53.57% fueron hombres.

**Tabla 4. Estadística descriptiva de la cohorte madres-hijos.** Se Muestra la mediana [percentil 25 - percentil 75].

<b>Características Maternas</b>	<b>Mediana [percentil 25 – percentil 75] N=172</b>
Edad (años)	27 [23 – 33]
IMC pregestacional (Kg/m <sup>2</sup> )	24.59 [22.12 – 27.70]
Homocisteína (µmol/L)	4.43 [3.63 – 5.13]
Folato (ng/mL)	17.05 [13.60 – 22.52]
Vitamina B12 (pg/mL)	295.5 [238 – 328.2]
Semana gestacional de inicio de suplementación con ácido fólico (semana)	4 [0 – 6.45]
Dosis de suplementación con ácido fólico (mg/día)	0.8 [0.4 – 1.4]
Semana gestacional de la CTOG (semana)	25.5 [25 – 26.5]
Glucosa en ayuno (mg/dL)	81 [76 – 85]
Glucosa 60' (mg/dL)	121 [103 – 143.2]
Glucosa 120' (mg/dL)	108 [88 – 123.5]
AUC (mg*min/dL)	16275 [14220 – 19193]
Triglicéridos (mg/dL)	211.5 [171.2 – 258.8]
Colesterol Total (mg/dL)	226 [194 – 250.8]
HDL (mg/dL)	63 [55 – 74]
LDL (mg/dL)	114.6 [96.6 – 135.8]
DG (%)	16.92
Edad materna avanzada (%)	19.18
Obesidad (%)	16.27
Alta paridad (%)	27.9
Suplementación de ácido fólico menor a 400 µg (%)	2.32

Características neonatales	Mediana [percentil 25 – percentil 75] N= 53
Semana gestacional del parto (semana)	39 [38 – 40]
Peso (gramos)	3036 [2737 – 3420]
Talla (cm)	49.5 [48 – 51]
Macrosomía (%)	1.7
Parto pretérmino (%)	3.77%
Femenino (%)	46.43
Masculino (%)	53.57

## 8.2. Puntaje de riesgo genético para hiperhomocisteinemia en interacción con la dosis de suplementación de ácido fólico y su asociación con indicadores glucémicos

Los SNPs utilizados para la generación del GRS fueron variantes en CUBN (rs1), FIGN (rs1) y MTHFR (rs1), las cuales mostraron asociación con homocisteína, folato o ambos metabolitos en la cohorte de 614 mujeres (Tabla 5). La estadística descriptiva de la muestra se presenta en la tabla S7. Adicionalmente, el coeficiente  $\beta$  de la regresión lineal de folato con homocisteína fue -0.5126 (p-valor <0.001, ajustado por IMC pregestacional, edad, hospital de referencia, nivel de vitamina B12 sérica y dosis de suplementación con ácido fólico).

**Tabla 5. Asociación de SNPs en genes que codifican para enzimas y transportadores del metabolismo de unidades de carbono con homocisteína o folato séricos en la cohorte de 614 mujeres.**

SNP	Homocisteína		Folato	
	Coefficiente $\beta$	p-valor*	Coefficiente $\beta$	p-valor*
<b>CUBN (rs1)</b>	0.0344	0.50	0.0046	0.93
<b>CUBN (rs2)</b>	0.1549	<b>0.001</b>	-0.1804	<b>&lt;0.001</b>
<b>FIGN (rs1)</b>	0.2199	<b>0.02</b>	-0.0363	0.48
<b>MTHFR (rs1)</b>	0.0020	0.96	0.1147	<b>0.02</b>
<b>MTR (rs1)</b>	0.0109	0.82	-0.0757	0.13
<b>SARDH (rs1)</b>	0.0008	0.98	-0.0145	0.77
<b>SLC19A1 (rs1)</b>	0.0344	0.50	-0.0093	0.85

\*p-valor de regresiones lineales ajustados por IMC pregestacional, edad materna, hospital de referencia, los 10 primeros componentes principales de 118 AIMs y por la dosis de suplementación con ácido fólico.

p-valores significativos se muestran resaltados en negro.

El GRS generado se evaluó en la cohorte de madres-hijos de 172 pacientes. La frecuencia del alelo menor (MAF) de las variantes que conforman el GRS concuerdan con las reportadas previamente (MAF CUBN rs2 = 0.14, FIGN rs1 = 0.13, MTHFR rs1=0.47). La mediana del GRS generado fue de 0 y el percentil 25 y 75 fue de -0.11 y 0, respectivamente. Dicho GRS no se asoció con los niveles séricos de homocisteína ni folato. Sin embargo, el GRS en interacción con la dosis de suplementación de ácido fólico resultó en una asociación significativa con los niveles séricos de homocisteína en la SDG 24 a 28, más no con los de folato (Tabla 6.). En la figura 5 se muestra el modelo de interacción en

asociación con homocisteína. En esta figura se observa como los valores del GRS más negativos son de riesgo para presentar niveles elevados de homocisteína. No obstante, este riesgo es modulado por la dosis de suplementación con ácido fólico. Aquellas pacientes que recibieron una dosis de suplementación mayor, particularmente las del tercil superior, presentaron niveles de homocisteína menores a pesar de tener un GRS de riesgo. Adicionalmente, se evaluó la asociación del GRS en interacción con la dosis de suplementación con otros fenotipos metabólicos adversos durante el embarazo tales como niveles elevados de glucosa durante el tercer trimestre del embarazo y desarrollo de DG (Tabla 6). De estos análisis se identificó una asociación significativa del término de interacción con los niveles de glucosa a los 120 minutos de la CTOG (Figura 6A) y también una asociación marginal con el AUC durante la CTOG (Figura 6B). Los valores de riesgo del GRS se asocian con mayores valores de glucosa 120' y AUC; sin embargo, de igual forma que para homocisteína, las pacientes con GRS de riesgo que recibieron una mayor dosis de suplementación, presentaron valores de AUC menores.

**Tabla 6. Resultados de los modelos de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación con ácido fólico para asociaciones con fenotipos metabólicos adversos durante el tercer trimestre del embarazo.**

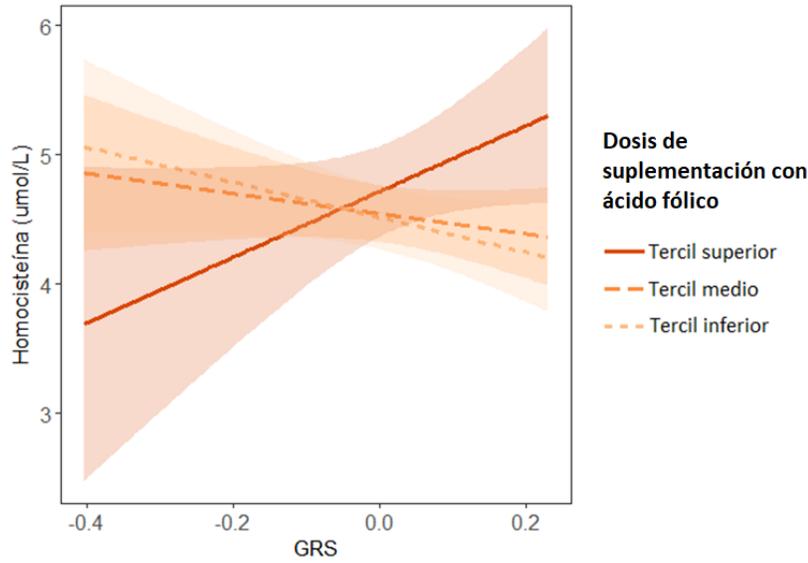
<b>Rasgo metabólico</b>	<b>Estimador<sup>†</sup> / OR<sup>‡</sup></b>	<b>p-valor*</b>
<b>Homocisteína</b>	1.69	<b>0.04</b>
<b>Folato</b>	2.67	0.48
<b>Glucosa Basal</b>	-2.38	0.68
<b>Glucosa 60'</b>	21.72	0.24
<b>Glucosa 120'</b>	39.6	<b>0.04</b>
<b>AUC</b>	4412.70	<b>0.06</b>
<b>Diabetes Gestacional</b>	1.24	0.31

\*modelos ajustados por IMC pregestacional, edad, 15 primeros componentes principales de 32 AIMs (para asociación con homocisteína y folato) y número de gestas (para rasgos metabólicos relacionados con el metabolismo de carbohidratos).

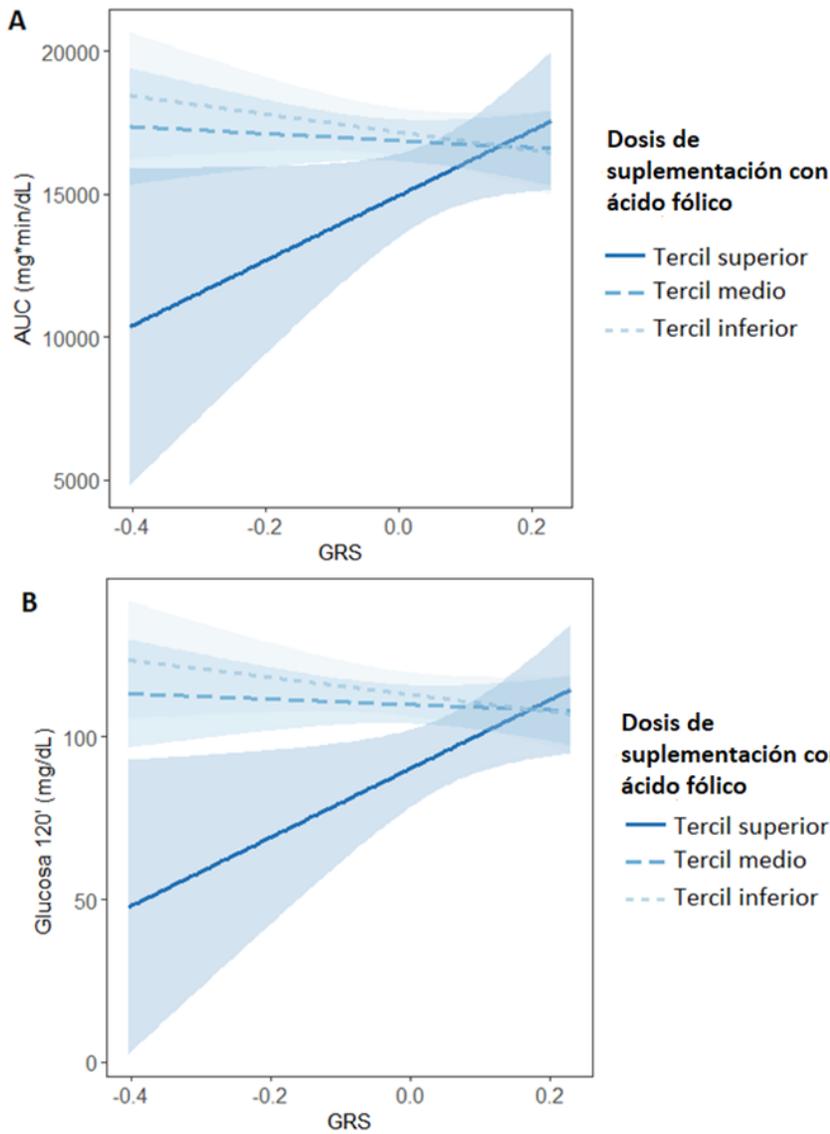
<sup>†</sup>Se muestra el estimador de los modelos de regresión en las unidades de cada variable evaluada.

<sup>‡</sup>Para la variable Diabetes Gestacional se muestra el OR.

p-valores significativos se muestran resaltados en negro.



**Figura 6. Modelo de asociación entre la concentración de homocisteína sérica en la SDG 24 - 28 y el GRS, en interacción con dosis de suplementación con ácido fólico.** Las líneas representan los terciles y el sombreado representa un intervalo de confianza de 0.9.



**Figura 5. Modelo de asociación entre (A) glucosa 120' y (B) AUC de la CTOG con el GRS en interacción con dosis de suplementación con ácido fólico.** Las líneas representan los terciles y el sombreado representa un intervalo de confianza de 0.9.

Por lo tanto, aquellas pacientes con puntajes más negativos del GRS tienen una predisposición genética a presentar niveles elevados de homocisteína y glucosa 120', así como valores mayores del AUC durante el tercer trimestre del embarazo. A su vez estos metabolitos reflejan la capacidad materna de secretar insulina en el contexto fisiológico de resistencia a la insulina que presenta el embarazo. De tal forma que el conjunto de alteraciones genéticas y metabólicas en el metabolismo de unidades de carbono contribuye al establecimiento de un ambiente intrauterino adverso. Estas asociaciones concuerdan con resultados previamente obtenidos en el laboratorio en los cuales se ha elucidado una relación entre el metabolismo de unidades de carbono con el metabolismo de carbohidratos durante el embarazo.

### **8.3. Análisis de asociación entre el puntaje de riesgo genético y metabolitos maternos con niveles de metilación global y en regiones reguladoras de genes asociados a disfunción endotelial y aterosclerosis**

Una vez establecido el GRS de riesgo relacionado a la predisposición en las madres a presentar alteraciones metabólicas durante el tercer trimestre del embarazo, se analizó el efecto de dicha predisposición genética, a través del establecimiento de un ambiente intrauterino adverso, sobre la metilación de DNA fetal. Para abordar esta pregunta se utilizaron HUVECs como modelo para el estudio de adaptaciones que podrían suceder en el sistema circulatorio fetal, en las cuales se estudiaron posibles cambios en los patrones de metilación global y en regiones reguladoras de genes asociados con disfunción endotelial y aterosclerosis. Dichos análisis se hicieron en HUVECs obtenidas directamente de la vena umbilical mediante raspados citológicos dado a la posibilidad de que, en el proceso de adaptación en cultivo, pudieran ocurrir cambios en los patrones de metilación no relacionados con el fenómeno de estudio, sino con el establecimiento del cultivo celular. Se caracterizaron las células obtenidas por este método mediante la expresión de marcadores específicos de HUVECs como el factor von Willebrand (vWF), CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*) y CD146 (*Melanoma cell adhesion molecule*). No obstante, también se determinó una proporción de leucocitos contaminantes (e.g. monocitos y linfocitos predominantemente), mediante la expresión del marcador específico CD45 (*Protein tyrosine phosphatase receptor type C*) (Figura S1 y S2).

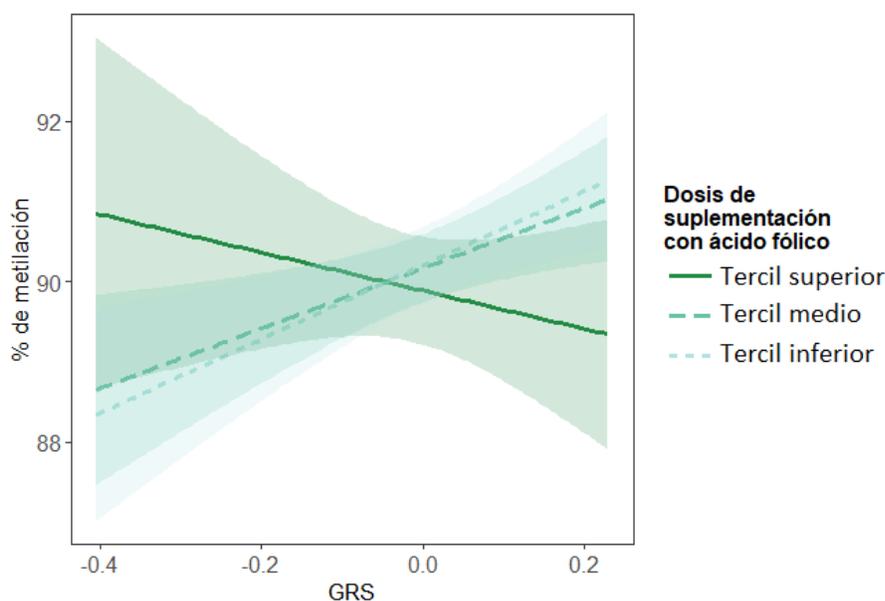
De las 7 regiones analizadas mediante pirosecuenciación de DNA convertido por bisulfito, ninguna alcanzó significancia estadística para la asociación entre el porcentaje global de metilación en cada región con el término de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación con ácido fólico, después de la corrección por Bonferroni para múltiples comparaciones. No obstante, detectamos una asociación marginal con la metilación en la región de -2007 a -1731 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de TNF $\alpha$  (Tabla 7). En esta región, la mediana del porcentaje global de metilación es de 89.77%, y el percentil 25 y 75 es de 88.83 y 91.05%, respectivamente. La distribución del porcentaje de metilación en los sitios CpG individuales se muestran en la Fig.S3. El tamaño del efecto es consistente con la hipótesis, en donde valores negativos del GRS (de riesgo) se asocian con

hipometilación de DNA en la región previamente mencionada, y en dónde las HUVECs de aquellos neonatos de pacientes del tercil superior de dosis de suplementación presentan niveles mayores de metilación en esta región a pesar de tener puntajes de riesgo del GRS (Figura 7). En la figura S4 se presentan pirogramas representativos de un caso expuesto al ambiente intrauterino de una paciente con GRS de riesgo y de un caso expuesto al ambiente intrauterino de una paciente con GRS protector. Por otra parte, esta región resultó en una asociación con glucosa a los 120' post carga de la CTOG, que alcanzó significancia estadística después de la corrección por Bonferroni para múltiples comparaciones ( $\beta = -0.44$   $p = 0.006$ ), y en una asociación marginal con los niveles de homocisteína ( $\beta = -0.26$   $p = 0.08$ ). La edad materna y el sexo del recién nacido no fueron variables confusoras en estos análisis, mientras que el IMC pregestacional mostró una asociación con la metilación en la región reguladora de TNF ( $p = 0.04$ ).

**Tabla 7. Asociación de la interacción entre el GRS y la dosis de suplementación de ácido fólico con niveles de metilación global y en regiones reguladoras de genes asociados con disfunción endotelial y aterosclerosis.**

Región	Número de sitios CpGs	Coefficiente $\beta$	p-valor*
LEPR	20	-0.02	0.85
<b>TNF<math>\alpha</math> (-2007 a -1731)</b>	6	-0.17	<b>0.06</b>
TNF $\alpha$ (-312 a -41)	11	0.04	0.75
MCP-1 (-354 a -164)	4	0.05	0.61
IGF2 (-2085 a -1914)	14	-0.04	0.69
H19 (-2299 a -1826)	29	0.08	0.49
LINE-1	3	0.04	0.66

\*modelos ajustados por IMC pregestacional, edad materna, homocisteína y glucosa 120'.  
p-valores nominalmente significativos se muestran resaltados en negro.



**Figura 7. Modelo de interacción entre el GRS y la dosis de suplementación de ácido fólico con los niveles de metilación en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ .** Las líneas representan los terciles y el sombreado representa un intervalo de confianza de 0.9.

Dada la observación de la asociación entre los niveles de glucosa al minuto 120 post carga y la metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$ , así como la asociación nominal con la interacción entre el GRS y la dosis de suplementación, se hizo un análisis de mediación moderada causal. Este es un tipo de análisis estadístico el cual permite explicar el efecto total de la exposición sobre la variable respuesta por el efecto directo y por el indirecto; siendo el efecto indirecto aquel que es transmitido a la variable respuesta a través del mediador. La hipótesis del modelo evaluado es que la interacción del GRS con la dosis de suplementación de ácido fólico tiene un efecto sobre los niveles de metilación de DNA en esta región, a través del establecimiento de un ambiente intrauterino caracterizado por deficiencias en la capacidad de secreción de insulina en respuesta a un estímulo, reflejada en los niveles de glucosa 120' en la CTOG. El paquete *mediation* de R requiere dos modelos, el modelo del mediador y de la respuesta, para estimar el efecto directo y el indirecto. El modelo del mediador es una regresión lineal entre el mediador (glucosa 120') y la exposición (GRS en interacción con la dosis de suplementación de ácido fólico), controlando por covariables de ajuste (IMC pregestacional, edad materna, homocisteína y los primeros 15 componentes principales de 32 AIMS). Por otro lado, el modelo respuesta es una regresión lineal de la variable respuesta (el nivel de metilación en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ ) contra la exposición controlando por el mediador y las covariables de ajuste. Adicionalmente, la dosis de suplementación de ácido fólico se incluye como un moderador, bajo la suposición de que el efecto mediado o indirecto puede ser distinto en la población que recibió dosis distintas de suplementación. Por lo tanto, se incluye como un término de interacción con el GRS en ambos modelos (del mediador y de la respuesta). Para este análisis se utilizaron aquellos pares madres-hijos que tenían datos completos ( $n=30$ ). Para esta submuestra de la cohorte original se reportan las estadísticas descriptivas de parámetros maternos y neonatales (Tabla 8). Como se observa en los p-valores reportados para las comparaciones entre las pacientes incluidas en el análisis contra aquéllas no incluidas, no hay diferencia significativa para ninguno de los parámetros clínicos estudiados. Por lo tanto, dicha submuestra no está sesgada y se consideran que las pacientes incluidas en el análisis de mediación son representativas y seleccionadas al azar.

**Tabla 8. Estadística descriptiva de la submuestra utilizada para el análisis de mediación moderada.**

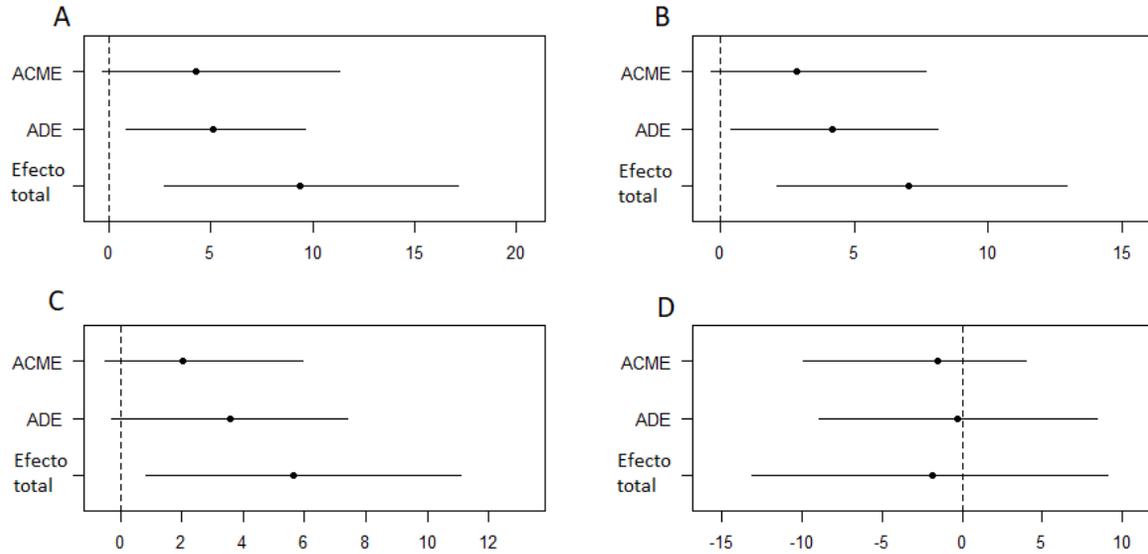
<b>Características Maternas</b>	<b>Incluidas en el análisis de mediación moderada causal</b> N=30	<b>No incluidas en el análisis de mediación moderada causal</b> N=142	<b>p-valor*</b>
Edad (años)	26.50 [24 – 31.75]	27 [22 - 34]	0.95
IMC pregestacional (Kg/m <sup>2</sup> )	24.43 [21.54 – 26.2]	24.66 [22.18 – 27.72]	0.70
Homocisteína ( $\mu$ mol/L)	4.44 [3.69 – 5.29]	4.42 [3.37 – 5.05]	0.73
Folato (ng/mL)	17.30 [13.82 – 22.57]	17.05 [13.32 – 22.35]	0.57
Vitamina B12 (pg/mL)	279.5 [229.2 – 384.8]	351.5 [244.5 – 384.8]	0.48
Semana gestacional de inicio de suplementación con ácido fólico (semana)	4 [0 - 6]	4 [0 – 6.25]	0.62
Dosis de suplementación con ácido fólico (mg/día)	0.75 [0.4 – 1.1]	0.8 [0.4 – 1.4]	0.98

Semana gestacional de la CTOG (semana)	25 [24.5 – 26.55]	25.6 [25 – 26.55]	0.23
Glucosa en ayuno (mg/dL)	82 [78 – 86]	80.50 [76 - 84]	0.19
Glucosa 60' (mg/dL)	114.5 [101.8 – 133.8]	122 [104.2 – 149.2]	0.37
Glucosa 120' (mg/dL)	114 [89.5 – 121.8]	107 [88 – 124]	0.76
AUC (mg*min/L)	15930 [14565 – 17318]	16320 [14212 – 19230]	0.60
<b>Características neonatales</b>	N=30	N=23	
Semana gestacional del parto (semana)	39 [37.7 – 39.5]	39 [38 - 40]	0.68
Peso (gramos)	2940 [2695 – 3440]	3075 [2744 – 3396]	0.72
Talla (cm)	49 [48 – 50]	50 [48 – 51]	0.43
*p-valores reportados de las comparaciones entre las pacientes incluidas para el análisis de mediación y aquellas no incluidas mediante una prueba de U Mann-Whitney.			

Los resultados del análisis se presentan en la tabla 9 y la figura 8. Los resultados representan el efecto a través del mediador a distintos valores del moderador. A dosis de suplementación con ácido fólico bajas (400µg) se observa que el efecto directo es estadísticamente significativo, mientras que el indirecto es nominalmente significativo. La proporción de mediación es del 42% (Figura 8A). No obstante, conforme aumenta la dosis de suplementación con ácido fólico se va perdiendo la significancia estadística del efecto indirecto, directo y de la proporción mediada (Figura 8B a 8D). Por lo tanto, los resultados sugieren que aquellas pacientes con un GRS de riesgo tienen una predisposición a desarrollar un ambiente intrauterino adverso a través del metabolismo de glucosa y su capacidad secretora de insulina, que resultará en hipometilación de DNA en la región reguladora estudiada de TNF en HUVECs. Sin embargo, en aquellas pacientes con GRS de riesgo que se suplementaron con una dosis de ácido fólico mayor, se atenúa el riesgo de generar un ambiente intrauterino que resulte en hipometilación de las células fetales en la región estudiada.

**Tabla 9. Resultados del análisis de mediación.** Se presentan los estimadores del efecto total, directo e indirecto con sus respectivos p-valores, para cada dosis de suplementación con ácido fólico.

Dosis de ácido fólico (mg)	Efecto directo		Efecto indirecto		Efecto total		Proporción de mediación (%)
	Estimado r	p-valor	Estimador	p-valor	Estimador	p-valor	
<b>0.4</b>	5.09	<b>0.018</b>	4.24	<b>0.08</b>	9.33	<b>0.002</b>	42.13
<b>1</b>	4.19	<b>0.03</b>	2.85	<b>0.09</b>	7.04	<b>0.006</b>	38.08
<b>1.4</b>	3.59	0.07	2.03	0.14	5.62	<b>0.02</b>	34.1
<b>4</b>	-0.33	0.9	-1.53	0.7	-1.85	0.78	24.5
p-valores significativos se muestran resaltados en negro.							



**Figura 8. Modelo de mediación por glucosa 120' del efecto del GRS sobre la metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$ .** Se muestran los efectos directos (ADE) e indirectos (ACME) a distintos valores de suplementación con ácido fólico (A) 0.4mg (B) 1 mg (C) 1.4 mg y (D) 4mg.

#### 8.4. Implicaciones funcionales de la metilación de DNA en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ .

Para elucidar la función que podría tener la hipometilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$  asociada con puntajes de riesgo del GRS en interacción con la dosis de suplementación de ácido fólico, glucemia 120' e hiperhomocisteinemia, se hizo un análisis bioinformático mediante los datos publicados en ENCODE (127). Se analizaron datos disponibles de estados de la cromatina, marcas de histonas y metilación de DNA en HUVECs y dos líneas celulares (GM12878 y K562), con estos datos disponibles como comparación. Adicionalmente, se analizaron datos de predicción de unión de factores de transcripción basados en secuencia generados a partir del programa JASPAR disponibles en ENCODE. En la figura 9 se muestra la región analizada, la cual se encuentra en el último exón del gen LTA que se encuentra aledaño a TNF $\alpha$ . La cromatina en esta región se encuentra en un estado compacto en HUVECs, mientras que en otras líneas celulares como GM12878 (linfocitos B) tiene función de *enhancer* fuerte o de transcripción débil en K562 (de médula ósea de leucemia mieloide aguda) (Figura 9C). De manera interesante, esta región se reporta metilada en HUVECs, no obstante, en linfocitos B y en las K562 se encuentra parcialmente metilada, identificado mediante el panel de metilación 450k de Illumina (Figura 9B). De igual forma, se observan diferencias en las marcas de histonas y otros rasgos epigenéticos, obtenidos por CHIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*), que podrían explicar las diferencias en el estado de la cromatina entre las líneas celulares. En HUVECs únicamente se observa un enriquecimiento en la presencia de la variante de histonas H2A.Z en esta región, la cual no se presenta en los otros dos linajes. Por otra parte, las GM12878 presentan un enriquecimiento de la monometilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me1) en

mayor medida (que se asocia con regiones de *enhancer*) y de la H3K4me3 en menor medida (que se asocia con regiones promotoras). También se observa un enriquecimiento de la acetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac) que de igual forma se utiliza para identificar regiones *enhancer*. Estas características se muestran únicamente en la línea de linfocitos B. En contraste, en las K562 únicamente se observa un enriquecimiento de HDAC1 y de p300 el cual se ha reportado como un coactivador transcripcional (Figura 9F).

Adicionalmente, se identificó un número abundante de factores transcripcionales que, con base en la secuencia de la región, se predice que podrían unirse. De éstos se resaltan PAX3 y ZNF423, que son reguladores importantes de la diferenciación de linfocitos B, y YY1 (Figura 9D) que se ha involucrado en la represión de diversos promotores. Adicionalmente, se observa la unión de EBF1 mediante CHIP-seq. De este análisis se observa que esta región en HUVECs se encuentra en un estado de la cromatina compacto con un nivel elevado de metilación de DNA, lo cual concuerda con los datos obtenidos mediante pirosecuenciación. No obstante, en otros linajes celulares esta región parece tener una función reguladora, reflejado por las marcas de histonas presentes y en niveles más bajos de metilación. Por lo tanto, es posible que cambios en las marcas epigenéticas en conjunto (incluyendo metilación de DNA) podrían generar un cambio en el estado compacto de la cromatina a estados más accesibles.

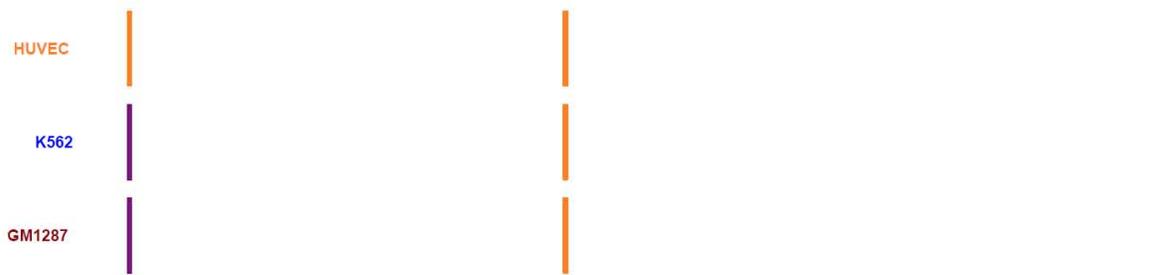
Con base en estos resultados, se hizo qRT-PCR para determinar si los niveles de metilación de DNA en esta región se correlacionaban con los niveles de RNAm de TNF $\alpha$ . Se midió la expresión de TNF $\alpha$  relativa a B2M en HUVECs obtenidas mediante raspados de la vena del cordón umbilical, de tal forma que el material genético utilizado para determinar los niveles de metilación de DNA y los niveles de expresión de TNF $\alpha$  fueron obtenidos de las mismas células. Los niveles de expresión relativa de TNF $\alpha$  se encontraron significativamente asociados con los niveles de metilación de DNA en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba de su TSS ( $\beta=-0.36$ ,  $p=0.04$ ) mediante un modelo de regresión lineal ajustado por el IMC materno pregestacional y homocisteína sérica. Los niveles séricos de homocisteína también se asociaron con la expresión de TNF $\alpha$  ( $\beta=0.39$ ,  $p=0.03$ ). La correlación entre la expresión relativa de TNF $\alpha$  y el nivel de metilación de DNA en la región -2007 a -1731 bp río arriba de su TSS así como el nivel sérico materno de homocisteína se muestra en la Figura 10. Los tamaños del efecto concuerdan con la hipótesis de que la hipometilación de DNA en esta región se asocia con sobreexpresión de TNF $\alpha$ . De igual forma, la hiperhomocisteinemia, que previamente se había encontrado marginalmente asociada con hipometilación de DNA en esta región, se asoció con sobreexpresión de TNF $\alpha$ . Por otra parte, ni los niveles de glucemia a los 120 minutos de la CTOG ni la interacción entre el GRS y la suplementación con ácido fólico resultaron asociados con los niveles de expresión de TNF $\alpha$ .

A) Genes

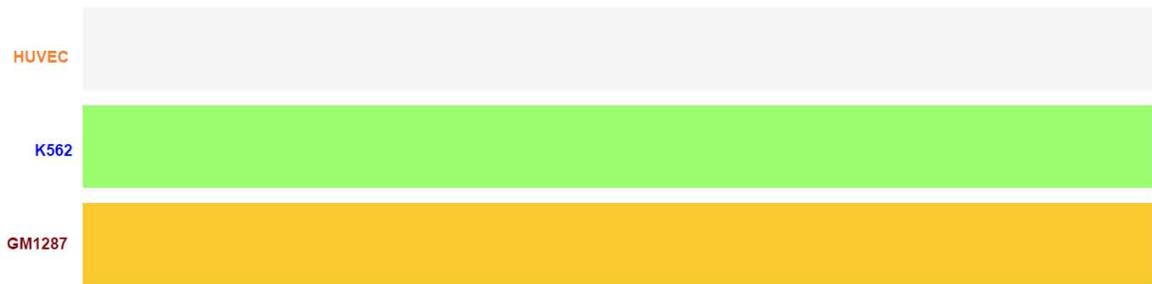
LTA --->



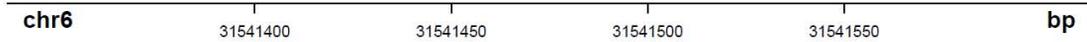
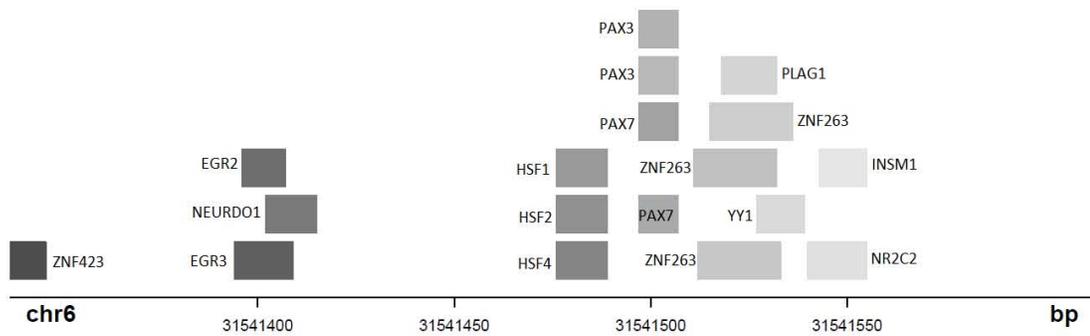
B) Metilación de sitios CpG



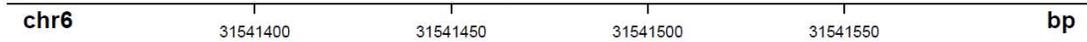
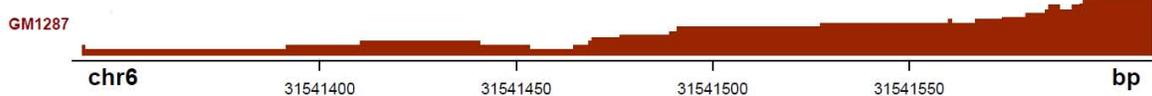
C) Estados de la cromatina



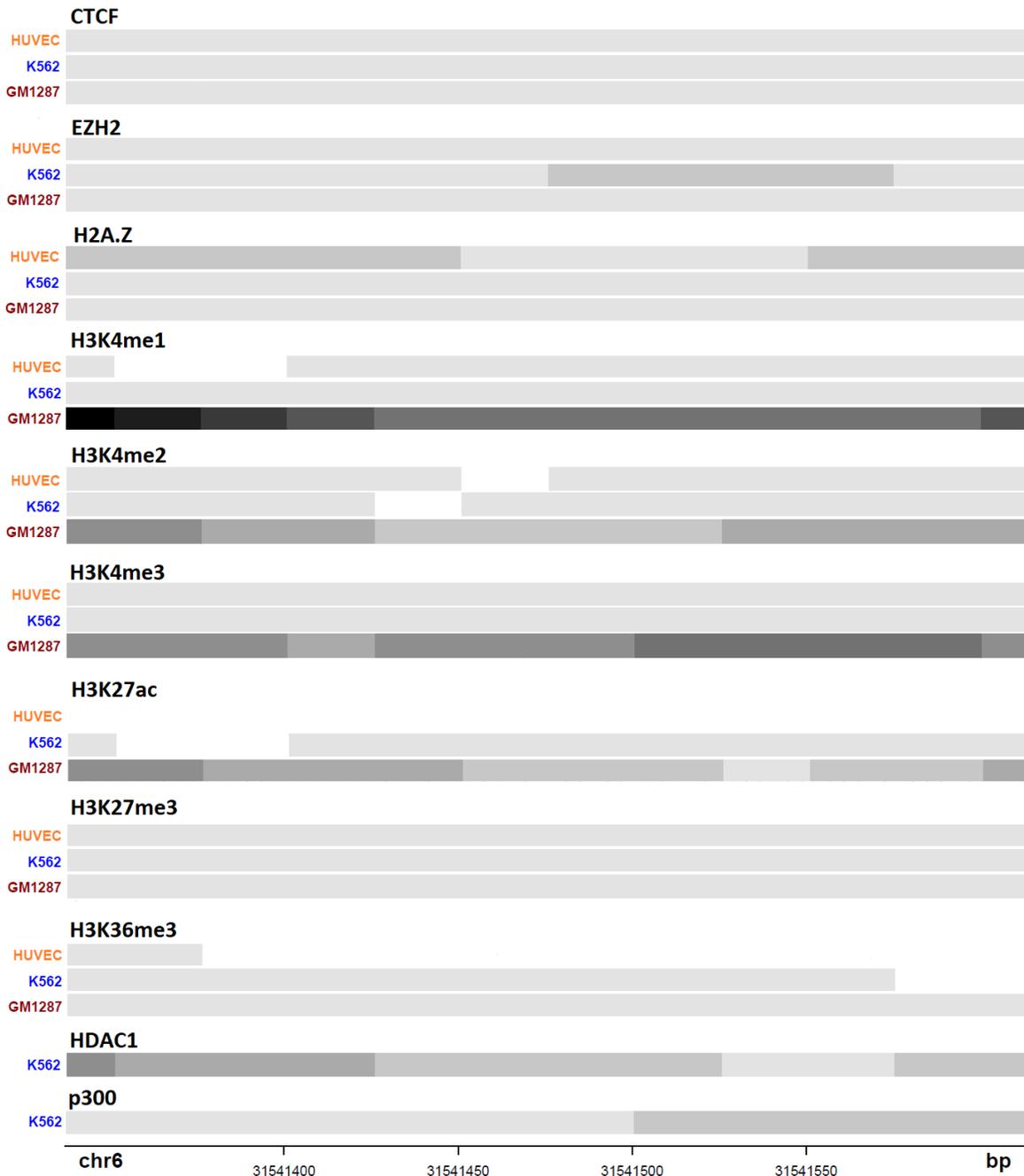
D) Predicción de unión de Factores de transcripción



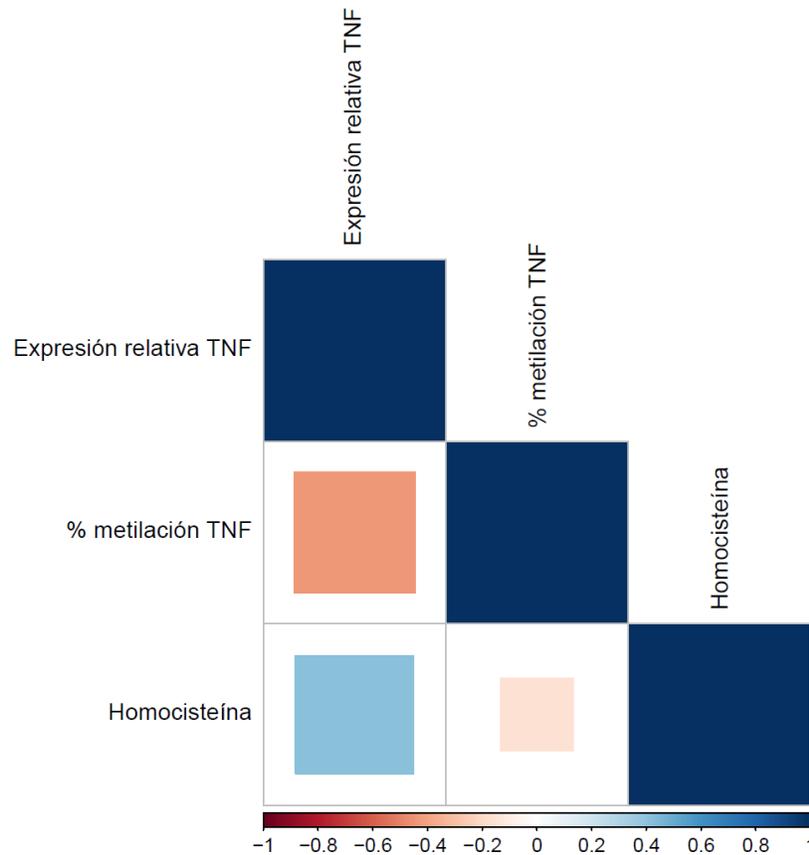
E) CHIP-seq EBF1



**F) Modificaciones de histonas y factores de transcripción por CHIP-seq**



**Figura 9. Análisis bioinformático de la región reguladora de TNF $\alpha$  mediante datos de ENCODE.** (A) Genes anotados en la región. (B) Metilación de sitios CpG (metilado, parcialmente metilado) mediante el panel 450k de Illumina. Metilación CpG. (C) Estado de Cromatina: *Enhancer fuerte*, *transcripción débil*, heterocromatina. (D) Predicción de unión de factores de transcripción mediante los datos de JASPAR disponibles en ENCODE. (E) Señal de CHIP-seq para EBF1. (F) Modificaciones de histonas y unión de factores de transcripción por CHIP-seq: escala de gris en donde tonos más fuertes representan un enriquecimiento de la señal. La figura se hizo con el paquete *Sushi* (128) de Bioconductor (129) en R.

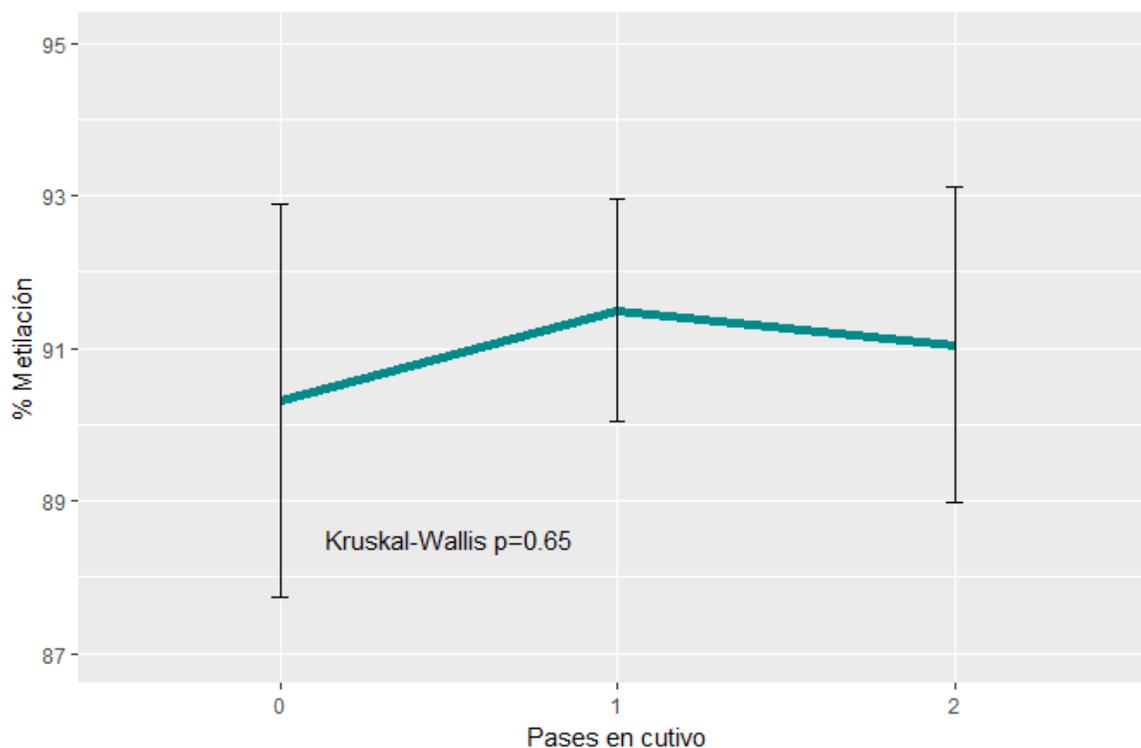


**Figura 10. Matriz de correlación entre la expresión relativa de TNF $\alpha$ , la metilación de DNA en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$  y el nivel sérico materno de homocisteína. La escala representa el valor del coeficiente de correlación.**

### 8.5. Efecto de la suplementación con folato en cultivo sobre los niveles de metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$

Con los datos obtenidos previamente, nos preguntamos si en las HUVECs de neonatos de pacientes con puntajes de riesgo del GRS y baja suplementación de ácido fólico, era posible revertir la hipometilación en la región reguladora de TNF $\alpha$  mediante la suplementación con 5-MeTHF en cultivo. No obstante, para estos experimentos realizados en condiciones de cultivo, se determinó primero si la metilación de DNA en esta región sufría cambios al establecer las células en cultivo. Para esto se seleccionaron 8 pacientes al azar en las que se compararon los niveles de metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$  entre HUVECs obtenidas directamente del cordón umbilical mediante raspados citológicos y cultivos de primer y segundo pase. En la figura 11 se observan las medias del porcentaje de metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$  a través de los pases en cultivo, entre las cuales no hay una diferencia significativa ( $p=0.65$  mediante una ANOVA no paramétrica). Adicionalmente, en la figura S5 se muestra el perfil de metilación de cada sitio CpG para la región reguladora de TNF $\alpha$  y para LINE-1, para HUVECs obtenidas mediante raspados citológicos, de primer y segundo pase en cultivo. Los perfiles de metilación de DNA son similares entre las tres

condiciones y no presentan claras diferencias entre sí. Por lo tanto, el establecimiento de HUVECs en condiciones de cultivo celular no parece alterar los patrones de metilación en esta región en particular, validando el uso de dichas células para los experimentos subsecuentes.

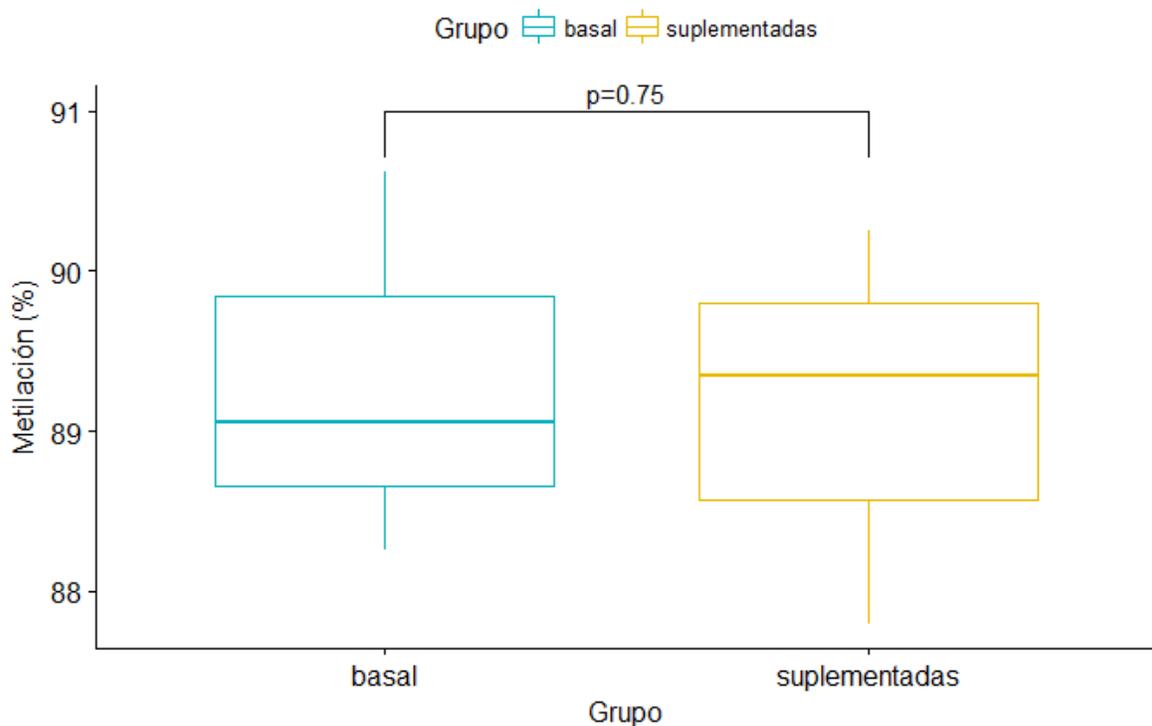


**Figura 11. Promedio del porcentaje de metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$  a través de los pases en cultivo.** Se muestran las medias y las barras de error representan la desviación estándar. N=8 de cada pase en cultivo.

Se eligieron HUVECs de neonatos de 3 pacientes con puntajes de riesgo del GRS y baja suplementación con ácido fólico. Los valores del GRS, la dosis de suplementación y el porcentaje de metilación global en la región reguladora de TNF $\alpha$  de los 3 pares de madres-hijos elegidos se muestran en la tabla 10. No se observó una diferencia en los niveles de metilación entre los cultivos suplementadas y no suplementadas ( $p=0.75$  mediante una prueba de U Mann-Whitney pareada) (Figura 12). Por lo tanto, la suplementación de HUVECs con 5-MeTHF a la concentración de 200nM durante 72 horas no fue capaz de revertir la hipometilación en la región reguladora de TNF $\alpha$ .

**Tabla 10. Características de las pacientes seleccionadas con GRS de riesgo.**

Muestra	GRS	Dosis de suplementación con ácido fólico(mg)	% de metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$
Caso 1	-0.14	0.4	90.62
Caso 2	-0.40	1	88.22
Caso 3	-0.26	1	89.06



**Figura 12. Efecto de la suplementación con 5-MeTHF sobre los niveles de metilación de DNA en la región -2007 a -1731 bp río arriba del sitio de TSS de TNF $\alpha$  en cultivos de HUVECs de neonatos de pacientes con puntajes de riesgo del GRS y dosis bajas de suplementación con ácido fólico durante embarazo. Se muestra un gráfico de cajas en el cual las líneas de las cajas representan el percentil 25, la mediana y el percentil 75. N=3 de cada grupo. p-valor de una prueba U Mann-Whitney.**

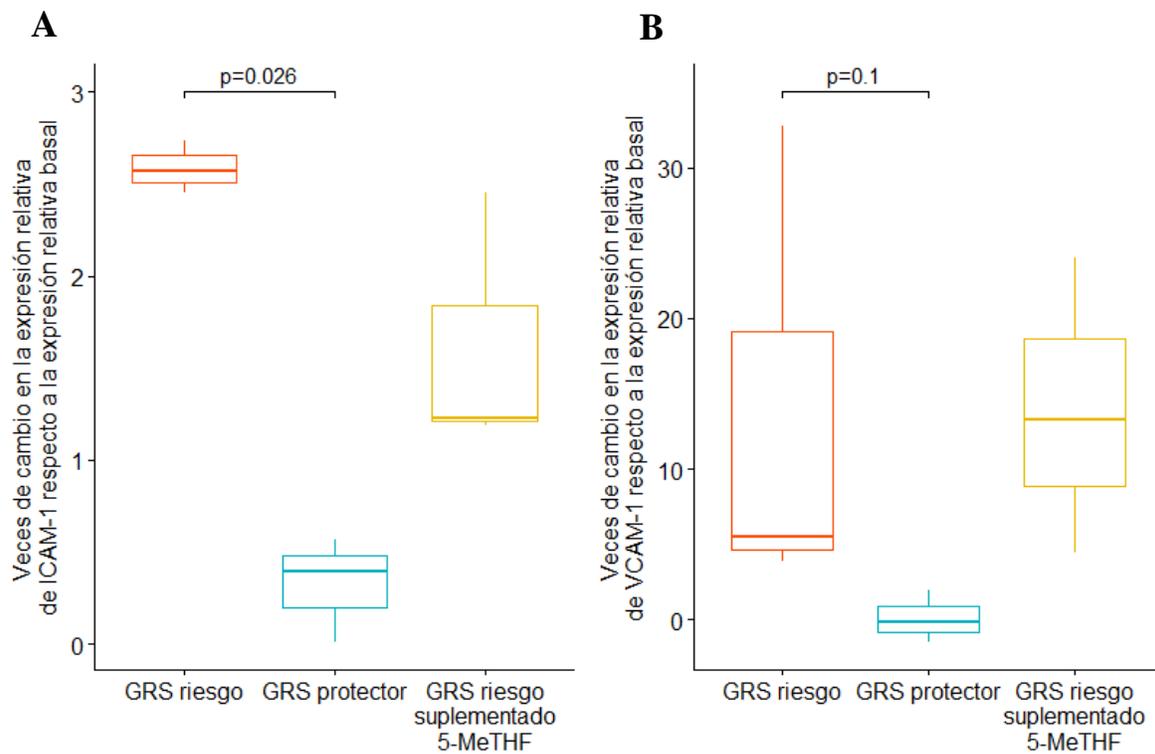
### **8.6. Expresión de moléculas de adhesión y su asociación con el puntaje de riesgo genético.**

El aumento en la adhesión de leucocitos al endotelio vascular es un fenotipo característico de la patología de disfunción endotelial y aterosclerosis. A su vez, es incremento se debe a la sobreexpresión de moléculas de adhesión ante un estímulo inflamatorio o de activación endotelial. En estudios previos se ha descrito que las células endoteliales de neonatos que estuvieron expuestos a condiciones intrauterinas adversas como DG, sobreexpresan las

moléculas de adhesión ICAM1 y VCAM1. Por lo tanto, se buscó elucidar si las HUVECs de neonatos de pacientes con puntajes de riesgo del GRS y dosis bajas de suplementación con ácido fólico presentaban adaptaciones funcionales pro-aterogénicas, a través del estudio de la expresión de las moléculas de adhesión VCAM1 e ICAM1. Se seleccionaron 3 pacientes con puntajes de riesgo y suplementación menor o igual a 1mg de ácido fólico (las mismas cuyas características se presentan en la tabla 10) y 3 pacientes con puntajes protectores para estos experimentos (tabla 11). Se determinó la expresión de VCAM1 y ICAM1 relativa a B2M mediante qRT-PCR, ante un estímulo de TNF $\alpha$ , que induce activación endotelial. Adicionalmente, las HUVECs de neonatos de las pacientes con GRS de riesgo fueron suplementadas con 5-MeTHF antes de la inducción de activación endotelial. En condiciones basales de cultivo, no identificamos diferencias significativas en la expresión de VCAM1 (p-valor de una prueba U Mann-Whitney = 0.2) y ICAM1 (p-valor de una prueba U Mann-Whitney = 1.0) entre el grupo de GRS de riesgo y GRS protector (Figura S6). No obstante, ante el estímulo con TNF $\alpha$ , se observa una clara tendencia para ambas moléculas de adhesión en donde las HUVECs de neonatos expuestos al GRS de riesgo y baja dosis de suplementación, sobreexpresan tales genes en comparación con HUVECs expuestas a un GRS protector (Figura 13). No obstante, la dispersión para la expresión de VCAM-1 es muy alta y la tendencia es menos clara que para ICAM-1, para la cual se observan claras diferencias en la expresión entre ambos grupos. Se hizo una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas en la comparación entre los tres grupos: GRS de riesgo, protector y GRS de riesgo suplementado con 5-MeTHF. El p-valor obtenido de esta prueba fue de 0.03 para la expresión de ICAM1 y de 0.06 para la expresión de VCAM1. Adicionalmente, se hizo una prueba post-hoc de Dunn para 3 comparaciones. Mediante este análisis se determinó que la expresión de ICAM1 en HUVECs de neonatos expuestos al GRS de riesgo y dosis de suplementación baja es significativamente mayor que en HUVECs expuestas a un ambiente impuesto por el GRS protector (p=0.026), mientras que para la expresión de VCAM1 únicamente se observa esta tendencia sin ser estadísticamente significativa (p=0.1). Entre los otros pares de comparaciones no se observó significancia estadística. Adicionalmente, mediante la suplementación con 5-MeTHF en cultivo se observa una tendencia en la que se revierte la sobreexpresión de ICAM1, sin embargo, ésta no es estadísticamente significativa. Por otra parte, la suplementación en cultivo resultó en una tendencia opuesta de lo esperado respecto a la expresión de VCAM1 cuya expresión tiene una mediana más alta que en los otros dos grupos. No obstante, la dispersión de la expresión de esta molécula en el grupo de HUVECs expuestas al GRS de riesgo suplementado en cultivo con 5-MeTHF es particularmente alta.

**Tabla 11. Características de las pacientes seleccionadas con GRS protector.**

Muestra	GRS	Dosis de suplementación con ácido fólico(mg)	% de metilación en la región reguladora de TNF $\alpha$
Caso 4	0.23	0.8	92
Caso 5	0.11	0.4	92.12
Caso 6	0.11	0.4	92.01



**Figura 13. Veces de cambio en la expresión relativa de (A) ICAM1 y (B) VCAM1 con respecto a la expresión basal, en HUVECs de neonatos expuestos al ambiente intrauterino establecido por el GRS de riesgo, protector y expuesto al GRS de riesgo, pero suplementadas con 5-MeTHF en cultivo. Se muestra el p-valor para la diferencia de la expresión de ICAM1 entre el grupo de riesgo y el protector obtenido mediante la prueba post-hoc de Dunn. N=3 de cada grupo.**

## 9. Discusión

El periodo gestacional se ha identificado como una ventana de tiempo determinante para el establecimiento de condiciones de salud y de enfermedad durante la vida adulta de los individuos, y se han descrito múltiples condiciones intrauterinas adversas vinculadas con la programación fetal de enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Las condiciones intrauterinas que han sido predominantemente descritas involucran cuestiones metabólicas. En este trabajo se identificó un ambiente intrauterino caracterizado alteraciones relacionadas con el metabolismo de unidades de carbono. La exposición a dicho ambiente induce cambios en la metilación de DNA y expresión de genes asociados a disfunción endotelial y aterosclerosis en HUVECs, utilizadas como un modelo de estudio del sistema circulatorio y cardiovascular fetal.

Las asociaciones entre variantes en genes que codifican para enzimas y transportadores de la vía de unidades de carbono y metabolitos como folato, homocisteína y vitamina B12 han sido ampliamente reportadas (68-70). Nuestros datos confirman algunas asociaciones bien establecidas entre variantes en MTHFR y FIGN con los niveles de folato y homocisteína. No obstante, se elucidó una nueva asociación entre la variante rs1 en CUBN con estos metabolitos. Resulta interesante señalar que esta variante únicamente se había reportado en asociación con los niveles de vitamina B12 (68).

Por otra parte, la generación de puntajes de riesgo genético (GRS) ha sido un enfoque recientemente utilizado para predecir fenotipos patológicos o clínicamente relevantes, a partir de la combinación del efecto de múltiples variantes. Adicionalmente, se han ido incorporando fenotipos intermedios y otros parámetros relevantes para el desenlace patológico de interés, con el fin de integrar factores genéticos, metabólicos y ambientales. El GRS generado en este trabajo refleja la utilidad de la construcción de estos puntajes para predecir desenlaces relevantes. Una virtud particular del GRS generado es que se construyó con coeficientes  $\beta$  obtenidos de población mexicana. Es relativamente común que la construcción de los GRS ponderados, se haga a partir de coeficientes  $\beta$  de otras poblaciones dada la falta de estudios previos en la misma población. En particular, este GRS, en conjunto con la dosis de suplementación con ácido fólico, permite predecir el desarrollo de alteraciones metabólicas que reflejan en niveles elevados de homocisteína, glucosa 120' y el AUC durante el tercer trimestre del embarazo. A su vez, estos parámetros se relacionan con la capacidad materna de secretar insulina en respuesta a un estímulo. El embarazo representa un estado fisiológico de resistencia a la insulina, por lo que deben ocurrir cambios fisiológicos en la madre que le permitan contender con este reto metabólico, de los cuales, las adaptaciones que ocurren en las células  $\beta$  pancreáticas para poder secretar más insulina son de particular importancia. En trabajos previos de nuestro laboratorio se había reportado la asociación entre variantes del metabolismo de unidades de carbono con el desarrollo de DG y su modulación por el tiempo de inicio y la dosis de suplementación con ácido fólico (datos no publicados). Los resultados obtenidos van en línea con este antecedente, y con otros estudios en los cuales se ha determinado la relación entre homocisteína y la secreción de insulina. En un estudio realizado en cultivos de la línea BRIN-BD11 de células beta pancreáticas se determinó que la secreción de insulina era inhibida por homocisteína de

manera dependiente de concentración (130). Adicionalmente, la interacción del GRS con la dosis de suplementación con ácido fólico que se reporta en los resultados, apoya esta dirección de la vía dado que el incremento en la suplementación atenúa el riesgo conferido por estas variantes, tanto para los niveles de homocisteína como para los de glucemia. A pesar de esta observación, es importante tener en cuenta que también un exceso de suplementación con ácido fólico podría tener efectos adversos. Existen reportes de efectos neonatales adversos por un exceso de folatos tales como bajo peso al nacer y resistencia a la insulina (131, 132). A partir de los modelos que se reportan en este estudio, se observa que en el tercil superior de suplementación, que recibió una dosis mayor a 1.1mg de ácido fólico, se atenúa el riesgo conferido por el GRS. Sin embargo, no se cuentan con suficientes datos para hacer inferencias sobre el punto de corte superior en el cual el exceso de folatos pueda resultar en efectos adversos. Adicionalmente, en estos modelos no se elucidó un papel significativo del tiempo de inicio de la suplementación con ácido fólico en la modulación de este fenómeno, como se había reportado previamente. Esto podría deberse a la distribución del tiempo de inicio de suplementación en esta cohorte, que en general se da más temprano durante el embarazo comparado con otros estudios. En la cohorte de 172 mujeres utilizada en este estudio, el percentil 75 inició a suplementarse con ácido fólico en la SDG 6.5, mientras que, en la cohorte de 614 mujeres utilizada en estudios previos de nuestro laboratorio, el percentil 75 inició a suplementarse hasta la SDG 9.

Por otra parte, el hecho de que no se elucidó una asociación entre la interacción del GRS y la dosis de suplementación con los niveles de folato podría deberse al método utilizado para las determinaciones de folato. En principio, para que estas determinaciones sean más informativas, es deseable que se hagan de forma que reflejen los niveles intracelulares de este metabolito. Por esta razón, en muchos estudios se hacen determinaciones de folato en eritrocitos. No obstante, por las dificultades metodológicas que presenta esta técnica, únicamente se hizo la determinación de folatos en suero. Adicionalmente, el tipo de ensayo utilizado no tiene la sensibilidad para detectar sólo una forma de folato, sino que es inespecífico para distintas formas de ácido poliglútamico y monoglútamico. Por lo tanto, los niveles que se detectan no reflejan un paso único en la vía de unidades de carbono, sino múltiples pasos, por lo cual podría no evidenciarse la asociación.

En cuanto a los desenlaces en tejidos fetales, en nuestro estudio se identificó un cambio en el nivel de metilación de DNA en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$  y en la expresión de la misma. Este cambio se dió en respuesta a la exposición a un ambiente intrauterino adverso caracterizado por una deficiencia en la capacidad de secreción de insulina materna e hiperhomocisteinemia. No obstante, la dosis de suplementación con ácido fólico durante el embarazo fue capaz de modular la susceptibilidad metabólica de desarrollar un ambiente intrauterino adverso y por lo tanto adaptaciones en el nivel de metilación de DNA en esta región. Estudios previos habían reportado el papel de variantes genéticas maternas en el metabolismo de unidades de carbono sobre la metilación de DNA de algunos genes, en tejidos fetales, como la asociación de la variante rs1801133 en MTHFR con niveles de metilación de DNA en el *locus* de IGF2. Éste codifica una hormona de crecimiento fundamental durante el periodo de gestación. Dicha asociación no se replicó

en este estudio. Adicionalmente, reportan asociaciones entre una variante en MTRR y los niveles de metilación de DNA (133). Por otra parte, a partir de nuestros resultados no se elucidó la asociación ampliamente reportada entre el metabolismo de unidades de carbono, a través de los niveles de folato u homocisteína, con los niveles de metilación global, explorado en este trabajo a través de la evaluación de secuencias repetidas LINE-1. Esto podría indicar que es un fenómeno gen específico que podría funcionar mediante mecanismos de regulación mucho más finos que únicamente la disminución en la biodisponibilidad global de grupos metilo. Para las demás regiones seleccionadas para este trabajo, en las cuáles se había reportado previamente un cambio en los niveles de metilación en respuesta a diversas condiciones intrauterinas adversas, únicamente la región -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$  resultó en una asociación con los factores de interés en este estudio. Por lo tanto, es posible que los mecanismos vinculados con la programación fetal sean específicos de ambientes intrauterinos particulares y no sean extrapolables entre otras condiciones adversas que se pueden presentar durante el embarazo. Adicionalmente, otras condiciones maternas previamente reportadas en asociación con los patrones de metilación de DNA, como la edad materna avanzada y el IMC pregestacional, no tuvieron efecto en nuestros modelos, o uno nominal respectivamente. Esto va en línea con la posibilidad de efectos gen-específicos causados por distintos ambientes intrauterinos adversos. Adicionalmente, en la mayoría de estudios previos se han evaluado los patrones de metilación de DNA en sangre de cordón umbilical, lo que plantea la posibilidad de que las diferencias del papel de la obesidad pregestacional y la edad materna avanzada en nuestro estudio y otros sean debido a mecanismos de metilación tejido-específicos.

La identificación de metabolitos involucrados en el establecimiento del ambiente intrauterino adverso previamente descrito, permitió evaluarlos en asociación con distintos fenotipos en las células fetales. De tal forma se exploraron vías y mecanismos que podrían estar involucrados en el fenómeno de programación fetal, así como sus posibles efectos directos e indirectos. El nivel de glucosa al minuto 120 post carga se identificó como un marcador del ambiente intrauterino adverso caracterizado, que a su vez refleja una deficiencia en la capacidad de secreción de insulina por parte de la madre. Este marcador fue el que resultó en la asociación estadística más significativa con los niveles de metilación en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$ . Estos datos confirmaron la asociación entre hiperglucemia materna durante el embarazo y cambios en los patrones de metilación de DNA, que ha sido ampliamente reportada. Adicionalmente, esta región reguladora de TNF $\alpha$  para la cual se elucidó una asociación nominal con la interacción entre el GRS y la dosis de suplementación con ácido fólico, aparte de con glucosa al minutos 120 post carga, fue seleccionada a partir de un estudio en el que reporta herencia epigenética transgeneracional en ratas, siendo la hiperglucemia materna la exposición para la generación 1 (116). Por lo tanto, es interesante que se replique esta asociación a pesar de haberse identificado originalmente en otra especie. Adicionalmente, en este artículo reportan que la hipometilación del DNA en esta región, producto de hiperglucemia materna, correlaciona inversamente con la expresión de TNF $\alpha$ . Estos autores también hicieron un análisis de unión de factores de transcripción, basado en secuencia, en el cual identifican algunos que también reportamos en los resultados (mediante análisis *in silico*) en este estudio, basados en los datos

de JASPAR (134) y CHIP-seq disponibles en ENCODE (127). En particular, EBF1 se identificó tanto en este estudio como en el de Su et al (116). EBF1 es un factor de transcripción que tiene una función importante en la diferenciación de linfocitos B. Sin embargo, se ha identificado como una proteína que interacciona con remodeladores de la cromatina (135), y en contextos de cáncer de mamá se ha identificado que sus sitios de unión se encuentran enriquecidos en regiones diferencialmente hipometiladas del genoma (136). Por otro lado, en nuestro análisis se identificó la posible unión de YY1 (*Ying Yang 1*) para la cual existen reportes que describen una unión dependiente de metilación de DNA. En el locus de Nr3c1, se ha descrito que la hipometilación en una de sus regiones de islas CpGs, resultó en un enriquecimiento en la unión de YY1 (137).

De forma interesante, mediante los datos de ENCODE (127) de esta región se identificó que mientras en HUVECs la cromatina tiene un estado compacto, en una línea celular de linfocitos B, funciona como un *enhancer* fuerte. Esto podría deberse al conjunto de marcas epigenéticas que se identifican en la región, incluidos niveles menores de metilación de DNA que en HUVECs. Por lo tanto, es posible que la hipometilación en esta región sea el reflejo de un conjunto de cambios epigenéticos que podrían resultar en el remodelamiento de una cromatina cerrada a una más laxa y por lo tanto más accesible a factores de transcripción y otras proteínas. Los datos disponibles de modificaciones de histonas disponibles en ENCODE, sugieren que esta región puede funcionar como un *enhancer* por el enriquecimiento de la H3K27ac y H3K4me1. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que pudiera funcionar como un promotor por el enriquecimiento de la H3K4me3 observado. Adicionalmente, estudios recientes han revisitado la definición clásica de *enhancers* y promotores, dada la existencia de arquitecturas genómicas y componentes funcionales comunes entre ambos tipos de elementos regulatorios (138). De estas observaciones se propone que esta región reguladora de TNF $\alpha$ , que se encuentra en un estado compacto en HUVECs, sufre modificaciones en su estructura en respuesta al ambiente intrauterino adverso de hiperglucemia e hiperhomocisteinemia. Tales modificaciones podrían causar una apertura de la cromatina que resulte en una regulación a la alta de su actividad como *enhancer* o promotor. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que la hipometilación en esta región, resultó asociada con la sobreexpresión de TNF $\alpha$  en nuestro estudio. En ratas, también se había reportado previamente la correlación entre la hipometilación asociada a hiperglucemia en dicha región de TNF $\alpha$  y los niveles de expresión de la misma. Por lo tanto, se plantea la posibilidad que esta región tenga una función reguladora, modificando la expresión de TNF $\alpha$  y que su actividad está determinada por las marcas epigenéticas que inducen el estado de la cromatina. El cambio observado en los niveles de metilación de DNA podría tener un efecto causal directo en la regulación de la expresión de TNF $\alpha$  o bien podría ser un reflejo de cambios en el estado de la cromatina que ocurren en dicha región y que a su vez regulan la expresión de este gen. No obstante, cabe mencionar que con base en la asociación elucidada no es posible establecer con certeza que esta región regule directamente la expresión de TNF $\alpha$ , a pesar de que exista una correlación estadística.

El rango del cambio en la metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$  concuerda con aquellos reportados previamente por efectos de programación fetal, que van desde el 2% hasta valores mucho más elevados entre casos y controles. En este estudio, al no ser de casos y controles no se reporta una diferencia entre grupos, no obstante, entre el percentil 25 y 75 hay una diferencia del 2% en la metilación. Por otro lado, nuestros hallazgos indican que no existen diferencias en los patrones de metilación género-específicas en esta región. Sin embargo, existen estudios que reportan diferencias en los patrones de metilación dependiendo del sexo del recién nacido (139).

Por otra parte, el análisis de mediación identificó el nivel de glucosa a los 120 minutos de CTOG como el mediador entre la hipometilación asociada a la interacción del GRS con la dosis de suplementación con ácido fólico. Se ha reportado una vía a través de glucosa que podría jugar un papel en mecanismos de programación fetal. La modificación O-glucosil-N-acetilación (O-GlcNAc) es catalizada por la enzima OGT río debajo de la vía de las hexosaminas. Existen estudios que reportan que condiciones de hiperglucemia resultan en un aumento de esta modificación (140, 141). Por otra parte, se ha demostrado que la enzima OGT se une con TET1 (una desmetilasa de DNA) y la estabiliza para que pueda unirse a sus regiones blanco. En un experimento hecho en células troncales embrionarias, altos niveles de glucosa en el medio de cultivo resultaron en un incremento de la cantidad y actividad de TET1 mediado por la estabilización por OGT en un mecanismo dependiente de la O-GlcNAc (142). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la hipometilación observada no sea producto únicamente de la reducción en la biodisponibilidad de grupos metilo, sino una interacción compleja entre ambas vías metabólicas que podría explicar la observación de la relación entre ambas.

Otro marcador del ambiente intrauterino adverso identificado fue el nivel sérico de homocisteína, el cual se asoció nominalmente con el nivel de metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$  y con su expresión. A pesar de que este metabolito no se sugiere como el mediador entre la asociación de la interacción del GRS y la suplementación de ácido fólico con la hipometilación en la región reguladora de TNF, la asociación observada entre hiperhomocisteinemia y sobreexpresión de TNF $\alpha$  sugiere que también podría tener un efecto indirecto. Por lo que se propone que tanto la hiperglucemia, a través del reclutamiento de TETs, como el metabolismo de unidades de carbono, podrían estar involucradas en la regulación epigenética observada en este fenómeno de programación fetal. Cabe mencionar, que mientras el mecanismo propuesto a través de hiperglucemia es específico para metilación de DNA, los cambios en la biodisponibilidad de grupos metilo reflejado en hiperhomocisteinemia también afectarían los niveles de metilación de histonas, añadiendo un nivel más de complejidad en la regulación de este fenómeno. No obstante, al tratarse de un estudio de asociación, únicamente es posible hacer inferencias sobre las vías involucradas, pero se requerirían de estudios funcionales para elucidar el mecanismo en concreto por el cual el ambiente intrauterino descrito previamente establece hipometilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$ . Adicionalmente, cabe mencionar que una limitante de este estudio es que el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño. Por lo tanto, el poder estadístico puede ser insuficiente para evidenciar algunas asociaciones.

Además de los cambios epigenéticos observados en HUVECs en respuesta a alteraciones en el metabolismo de unidades de carbono, se identificaron cambios funcionales asociados con la disfunción endotelial. Previamente, un estudio había reportado que en HUVECs obtenidas de cordones umbilicales de embarazos con DG, había una sobreexpresión de las moléculas de adhesión VCAM1 e ICAM1 ante activación endotelial inducida por TNF $\alpha$ . No obstante, en este estudio no se reporta una diferencia en la expresión basal de estas moléculas entre embarazos con DG y normoglucémicos (93), con lo cual concuerdan nuestros resultados. En nuestros datos observamos una tendencia en dónde las células provenientes de embarazos con GRS de riesgo y dosis bajas de suplementación con ácido fólico sobreexpresan ambas moléculas ante estimulación, en comparación con las expuestas al GRS protector. La sobreexpresión de estas moléculas se traduciría en una adhesión incrementada de monocitos, un fenotipo característico de la patofisiología de disfunción endotelial y aterosclerosis. A pesar de que la diferencia en la expresión de VCAM1 entre los grupos no alcanzó significancia estadística, la tendencia es bastante clara; y para ICAM1 sí se observó una diferencia estadísticamente significativa. Esto es en comparación con el estudio mencionado previamente, en el cual observaron una diferencia en la expresión de VCAM1 entre grupos más robusta que para ICAM1 (93). De cualquier forma, para corroborar esta tendencia sería necesaria la inclusión de más pacientes.

Adicionalmente, en condiciones basales sin el estímulo de activación endotelial, no se observaron diferencias en la abundancia de RNAm de VCAM1 e ICAM1 entre los grupos. A pesar de que en nuestro modelo TNF $\alpha$  se encuentra sobreexpresada a nivel de RNAm, no es suficiente para producir una regulación a la alta de las moléculas de adhesión estudiadas en condiciones basales. A partir de esta observación, se podría proponer que las HUVECs expuestas al ambiente intrauterino adverso impuesto por el GRS, presentan alteraciones en los patrones de metilación de DNA y en la expresión de TNF $\alpha$ , que hacen a estas células más susceptibles a presentar fenotipos de disfunción endotelial ante estímulos inflamatorios subsecuentes que se pudieran presentar durante la vida de estos sujetos. No obstante, cabe mencionar que en un contexto fisiológico las células endoteliales se encuentran en una interacción con células sanguíneas, las cuáles en sujetos expuestos al ambiente intrauterino adverso, también podrían sobreexpresar la citocina TNF $\alpha$ , creando la posibilidad de que en condiciones fisiológicas la concentración de TNF $\alpha$  producida por diversos linajes celulares sea suficiente para producir una sobreexpresión basal de VCAM1 e ICAM1 en las células endoteliales. Por otro lado, la sobreexpresión de RNAm no necesariamente resulta en sobreexpresión de las proteínas por lo que se requerirían hacer *Western Blots* o ensayos funcionales de adhesión con monocitos en cultivo. No obstante, estos resultados sugieren que la exposición a las condiciones intrauterinas previamente descritas resulta en fenotipos funcionales pro-aterogénicos, como la sobreexpresión de una citocina proinflamatoria y de moléculas de adhesión, desde etapas muy tempranas. Dichos fenotipos impondrían un ambiente proinflamatorio que predispone a estos neonatos a desarrollar aterosclerosis durante su vida adulta. Otro punto importante es que estos experimentos fueron hechos en células que tenían dos pases en cultivo (aproximadamente 15 días), por lo que estos fenotipos son estables y se mantienen a través de las divisiones celulares, sustentando la posibilidad de que

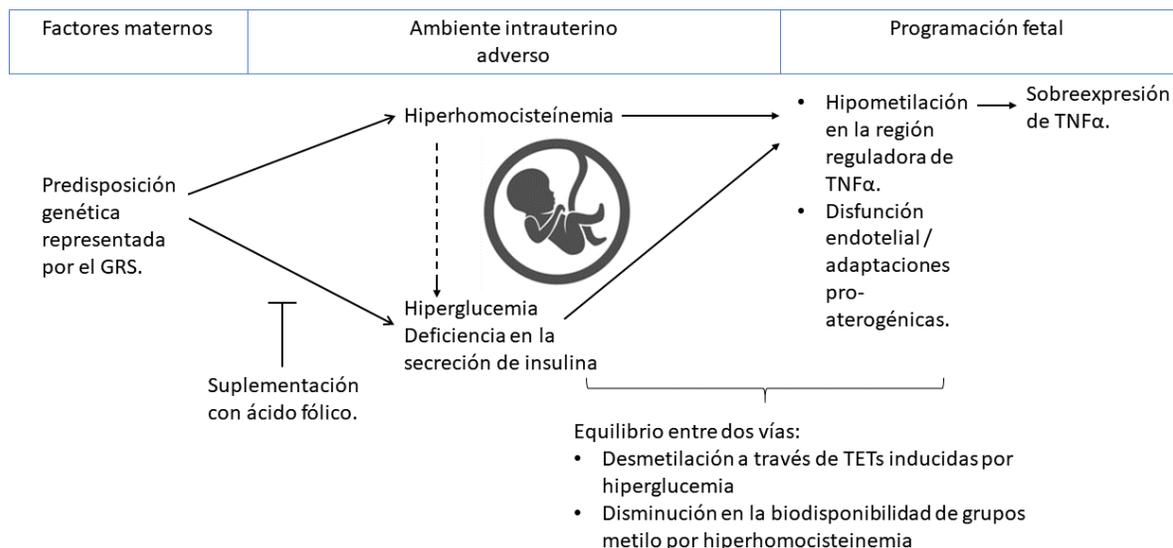
son adaptaciones establecidas por el ambiente intrauterino adverso y que pueden tener una repercusión en la salud a largo plazo.

Dado que se había elucidado que la suplementación con ácido fólico durante el embarazo podía modular el riesgo conferido por la predisposición genética para el desarrollo de un ambiente intrauterino adverso y los cambios en la metilación de DNA en la región reguladora de  $TNF\alpha$  asociados a este, se planteó probar si una vez establecidas estas alteraciones, era posible revertirlas mediante suplementación con folato. Las HUVECs suplementadas con 5-MeTHF en cultivo no mostraron un restablecimiento en los niveles de metilación de DNA en la región reguladora de  $TNF\alpha$ . Adicionalmente, la suplementación en cultivo tampoco atenuó la sobreexpresión de VCAM1 en el grupo de riesgo, pero si se observó esta tendencia en la expresión de ICAM1 aunque sin significancia estadística. Por lo tanto, estos resultados parecerían indicar que revertir las adaptaciones epigenéticas y los fenotipos establecidos por el ambiente intrauterino adverso es mucho más complejo. Para evidenciar el efecto de un determinado esquema de suplementación se requerirían hacer experimentos a múltiples concentraciones e incluso se podría explorar la posibilidad del uso de otros micronutrientes involucrados en el metabolismo de unidades de carbono, como vitamina B12. Otra posibilidad, es que los individuos utilizados para estos experimentos sean portadores de otras variantes en enzimas del metabolismo de unidades de carbono como en MTR, MTRR, SLC19A1 o DNMT1 que pudieran afectar su actividad enzimática, y por lo tanto no hubieran podido metabolizar eficientemente el 5-MeTHF que se utilizó en este esquema de suplementación. Dada la alta frecuencia del SNP de MTHFR que se sabe que disminuye su actividad enzimática, la suplementación se hizo con 5-MeTHF que está río debajo de la reacción catalizada por MTHFR en la vía, no obstante, no se puede descartar la prevalencia de otros SNPs en estos pacientes a pesar de que no sean de tan alta frecuencia. Dada la falta de reportes sobre el efecto de suplementación con folato en cultivo sobre los niveles de metilación de DNA, se utilizó una concentración de 5-MeTHF que pudiera ser clínicamente relevante dado que es la concentración que se alcanza en suero después de una ingesta de 5mg de ácido fólico. Esta dosis es la que se utiliza en pacientes con antecedentes de malformaciones o para el tratamiento de anemia por deficiencia de folatos. Sin embargo, se podría explorar el uso de otros micronutrientes a concentraciones clínicamente relevantes en otros puntos de la vía que pudieran también restablecer los perfiles de metilación y fenotipos pro-aterogénicos en estas células. Cabe mencionar que el efecto de la interacción de la suplementación con ácido fólico sobre la susceptibilidad metabólica de desenlaces adversos maternos y neonatales, se identificó durante etapas tempranas del embarazo, por lo que es posible que intervenciones tardías no sean capaces de revertir los patrones establecidos.

Con estos datos proponemos un modelo en el cual el GRS en interacción con la dosis de suplementación con ácido fólico impone un ambiente intrauterino adverso caracterizado por una deficiencia en la secreción de insulina como resultado de los niveles elevados de homocisteína, que se refleja en los niveles de glucosa al tiempo 120' de la CTOG. A su vez este ambiente intrauterino resulta en hipometilación en la región reguladora de  $TNF\alpha$ , y se propone que podría ocurrir a través de la posible interacción de dos vías que resultan en la

sobreexpresión de TETs (a través de niveles incrementados de O-GlcNAc y su estabilización por OGT resultado de la hiperglucemia) y una disminución en la biodisponibilidad de grupos metilo (resultado de hiperhomocisteinemia). A su vez esta hipometilación se refleja en la sobreexpresión de TNF $\alpha$ , que promueve una condición proinflamatoria desde etapas muy tempranas. Dicha sobreexpresión predispone a los neonatos al desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis a través del establecimiento de un fenotipo de inflamación crónica, que puede ser empeorado por exposiciones ambientales subsecuentes. Además, el ambiente intrauterino resultó en fenotipos pro-aterogénicos como la sobreexpresión de moléculas de adhesión. Ésta a su vez, se traducen en un posible aumento en la unión de leucocitos ante activación endotelial, un fenotipo característico de aterosclerosis. Este modelo se muestra en la Figura 14. Cabe señalar que, al tratarse de un estudio de asociación, únicamente es posible hacer inferencias sobre las vías involucradas, pero se requerirían de estudios funcionales para elucidar el mecanismo en concreto por el cual el ambiente intrauterino descrito previamente establece hipometilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$ . Adicionalmente una limitación importante del estudio en general es que el tamaño muestral fue muy pequeño.

No obstante, integrando todos nuestros hallazgos, proponemos al GRS en conjunto con la dosis de suplementación con ácido fólico, como una herramienta que permite clasificar a las pacientes de acuerdo al riesgo de desarrollar un ambiente intrauterino adverso. Puntaje de riesgo del GRS se asocian con adaptaciones adversas en el sistema circulatorio fetal en la metilación de DNA en una región regulatoria de TNF $\alpha$ , en la expresión de TNF $\alpha$  y de las moléculas de adhesión VCAM1 e ICAM1. De tal forma, esta herramienta permite identificar individuos con adaptaciones previamente asociadas con disfunción endotelial y aterosclerosis, y que podrían ser susceptibles a desarrollar dichas patologías durante su vida adulta.



**Figura 14. Modelo de los factores maternos genéticos y metabólicos vinculados con programación fetal de disfunción endotelial y aterosclerosis.** Las flechas sólidas representan asociaciones elucidadas en este estudio mientras que las líneas punteadas reflejan posibles mecanismos que se sugieren por la literatura.

Finalmente, el modelo utilizado en este estudio tiene como característica principal que las HUVECs representan un tejido relevante de estudio para patologías cardiovasculares. Muchos trabajos de programación fetal en los que se estudia metilación de DNA, se han hecho a partir de sangre de cordón umbilical, a pesar de que se sabe que los perfiles de metilación son tejido-específicos debido a que es una modificación fundamental en el proceso de diferenciación celular. Por lo que extrapolar los hallazgos a otros tejidos que sean relevantes en patologías metabólicas y cardiovasculares puede ser cuestionable. No obstante, este es un enfoque experimentalmente más sencillo que ha permitido generar conocimiento sobre los mecanismos vinculados al fenómeno de programación fetal. Por otra parte, el uso de HUVECs como modelo experimental permitió hacer experimentos funcionales en las células, lo cual no es posible de hacer con sangre de cordón umbilical. Sin embargo, nuestro modelo también tiene ciertas limitaciones. Al ser cultivo primario, existen fracciones de células contaminantes cuyos patrones de metilación podrían ser distintos a aquellos de HUVECs. Adicionalmente la fracción contaminante de otros linajes celulares es mayor utilizando la técnica de obtención de HUVECs mediante raspados citológicos de la vena umbilical y va disminuyendo progresivamente a través de los pases en cultivo. No obstante, las HUVECs obtenidas mediante raspados son las más representativas del estado en el que se encontraban *in vivo*. Adicionalmente, los cultivos de HUVECs tienen una menor fracción de leucocitos contaminantes, no obstante, conforme se mantienen más tiempo en cultivo, la fracción contaminante de fibroblastos aumenta (143). A pesar de que se determinó que la metilación de DNA en la región reguladora de TNF $\alpha$  no cambió al establecer las células en cultivo, existe la posibilidad de que si haya cambios en otras regiones del genoma. En un artículo se reporta que sí se dan cambios entre las HUVECs de pase 0 en cultivo y pase 4 (144). Estas modificaciones podían ser aumentos o disminuciones en los niveles de metilación de DNA y se daban predominantemente en regiones de *enhancer*. Por lo tanto, es una cuestión que se debe tener en cuenta dado que no resulta posible determinar el efecto que podrían tener estos cambios en la metilación de DNA en las HUVECs. No obstante, el uso de ambos modelos, HUVECs obtenidas mediante raspados de la vena umbilical con una mayor fracción de células contaminantes de otros linajes y HUVECs establecidas en cultivo le da robustez al uso de este modelo.

## 10. Conclusiones

El ambiente intrauterino caracterizado por una deficiencia en la secreción de insulina e hiperhomocisteinemia, resulta en la hipometilación en la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$  y sobreexpresión de la misma; así como en la sobreexpresión de moléculas de adhesión en HUVECs. A su vez, estas adaptaciones resultan en un fenotipo proinflamatorio que se ha asociado previamente con susceptibilidad para desarrollar disfunción endotelial y aterosclerosis. No obstante, la predisposición de desarrollar este ambiente intrauterino adverso (reflejado por el GRS), puede ser atenuada por la suplementación con ácido fólico. En el tercil superior de dosis de suplementación con ácido fólico en pacientes con mayor susceptibilidad metabólica, que recibió por encima de 1.1mg, se atenuaron desenlaces adversos maternos (hiperhomocisteinemia e hiperglucemia) y neonatales (hipometilación en la región reguladora de TNF $\alpha$ ).

## 11. Perspectivas

- La mayor limitación de este estudio fue el tamaño de muestra utilizado para los análisis, por lo tanto, sería importante aumentar la N para conseguir un mayor poder estadístico.
- Explorar esquemas de suplementación con micronutrientes (como vitamina B12, y colina entre otros) del metabolismo de unidades de carbono a distintas dosis, que pudieran revertir las adaptaciones pro-aterogénicas observada en HUVECs expuestas al ambiente intrauterino adverso.
- Determinar el mecanismo de regulación entre la región -2007 a -1731 bp río arriba del TSS de TNF $\alpha$  y la expresión de dicha proteína, mediante CRISPR/Cas9 o mediante la construcción de plásmidos reporteros.
- Evaluar expresión de TET1 en HUVECs de neonatos expuestos al ambiente intrauterino adverso de hiperhomocisteinemia e hiperglucemia.

## 12. Referencias

1. Barker DJ. The fetal origins of adult hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1992;10(7):S39-44.
2. Barker DJ, Martyn CN. The maternal and fetal origins of cardiovascular disease. *J Epidemiol Community Health.* 1992;46(1):8-11.
3. Winick M, Fish I, Rosso P. Cellular recovery in rat tissues after a brief period of neonatal malnutrition. *J Nutr.* 1968;95(4):623-6.
4. Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr.* 1966;89(3):300-6.
5. Widdowson EM, Crabb DE, Milner RD. Cellular development of some human organs before birth. *Arch Dis Child.* 1972;47(254):652-5.
6. Barker DJ. The fetal origins of diseases of old age. *European journal of clinical nutrition.* 1992;46 Suppl 3:S3-9.
7. Burger GCE SH, Drummond JC. Malnutrition and starvation in Western Netherlands, September 1944 to July 1945: Part I and II.: The Hague : General State Print. Office.; 1948.
8. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev.* 2006;82(8):485-91.
9. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
10. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17(11):1410-22.
11. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180(4093):1332-9.
12. Christensen M, Kronborg CS, Carlsen RK, Eldrup N, Knudsen UB. Early gestational age at preeclampsia onset is associated with subclinical atherosclerosis 12 years after delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017;96(9):1084-92.
13. Leduc L, Levy E, Bouity-Voubou M, Delvin E. Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(2):127-30.
14. Leiva A, Pardo F, Ramirez MA, Farias M, Casanello P, Sobrevia L. Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of human adult diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. *Experimental diabetes research.* 2011;2011:349286.
15. Thornburg KL. The programming of cardiovascular disease. *J Dev Orig Health Dis.* 2015;6(5):366-76.
16. Visentin S, Grumolato F, Nardelli GB, Di Camillo B, Grisan E, Cosmi E. Early origins of adult disease: low birth weight and vascular remodeling. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):391-9.
17. Zyzdorzcyk C, Armengaud JB, Peyter AC, Chehade H, Cachat F, Juvet C, et al. Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *J Dev Orig Health Dis.* 2017;8(4):448-64.
18. Szostak-Wegierek D. Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. *Int J Womens Health.* 2014;6:647-56.
19. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation

- precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2680-90.
20. Skilton MR, Evans N, Griffiths KA, Harmer JA, Celermajer DS. Aortic wall thickness in newborns with intrauterine growth restriction. *Lancet.* 2005;365(9469):1484-6.
  21. Skilton MR, Viikari JS, Juonala M, Laitinen T, Lehtimäki T, Taittonen L, et al. Fetal growth and preterm birth influence cardiovascular risk factors and arterial health in young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(12):2975-81.
  22. Stacy V, De Matteo R, Brew N, Sozo F, Probyn ME, Harding R, et al. The influence of naturally occurring differences in birthweight on ventricular cardiomyocyte number in sheep. *Anat Rec (Hoboken).* 2009;292(1):29-37.
  23. Pladys P, Sennlaub F, Brault S, Checchin D, Lahaie I, Le NL, et al. Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(6):R1580-8.
  24. Crispi F, Bijmans B, Figueras F, Bartrons J, Eixarch E, Le Noble F, et al. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation.* 2010;121(22):2427-36.
  25. Dodson RB, Rozance PJ, Fleenor BS, Petrash CC, Shoemaker LG, Hunter KS, et al. Increased arterial stiffness and extracellular matrix reorganization in intrauterine growth-restricted fetal sheep. *Pediatr Res.* 2013;73(2):147-54.
  26. Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, Gottschalk R, et al. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One.* 2012;7(2):e31017.
  27. Brawley L, Poston L, Hanson MA. Mechanisms underlying the programming of small artery dysfunction: review of the model using low protein diet in pregnancy in the rat. *Arch Physiol Biochem.* 2003;111(1):23-35.
  28. Topper JN, Gimbrone MA, Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today.* 1999;5(1):40-6.
  29. Kingdom JC, McQueen J, Connell JM, Whittle MJ. Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1993;100(5):476-82.
  30. Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int.* 2004;65(4):1339-48.
  31. Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):368-80.
  32. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293(5532):1074-80.
  33. DNA Methylation. *Methods and Protocols.* second ed. Walker JM, editor. Evry, France: Humana Press; 2009.
  34. Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nat Rev Genet.* 2017;18(11):643-58.
  35. Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet.* 2014;15(2):93-106.
  36. Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD, Hanson MA. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr Res.* 2007;61(5 Pt 2):5R-10R.

37. Lane RH. Fetal programming, epigenetics, and adult onset disease. *Clin Perinatol.* 2014;41(4):815-31.
38. Gabory A, Attig L, Junien C. Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(6 Suppl):1943S-52S.
39. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology.* 2011;106(1):272-80.
40. Roseboom TJ, Watson ED. The next generation of disease risk: are the effects of prenatal nutrition transmitted across generations? Evidence from animal and human studies. *Placenta.* 2012;33 Suppl 2:e40-4.
41. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 2018;19(2):81-92.
42. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature.* 1978;274(5673):775-80.
43. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010-22.
44. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 2017;18(9):517-34.
45. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One.* 2011;6(1):e14524.
46. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:245-54.
47. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Rev Genet.* 2016;17(9):551-65.
48. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell.* 1999;98(3):387-96.
49. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251-60.
50. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-95.
51. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):484-92.
52. Lin XH, Wu DD, Gao L, Zhang JY, Pan HT, Wang H, et al. Altered DNA methylation in neonates born large-for-gestational-age is associated with cardiometabolic risk in children. *Oncotarget.* 2016;7(52):86511-21.
53. Krause BJ, Costello PM, Munoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanello P. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics.* 2013;8(9):944-52.
54. Santhanam L, Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE. Arginase and vascular aging. *J Appl Physiol (1985).* 2008;105(5):1632-42.
55. Scotti M, Stella L, Shearer EJ, Stover PJ. Modeling cellular compartmentation in one-carbon metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2013;5(3):343-65.
56. Kalhan SC. One-carbon metabolism, fetal growth and long-term consequences. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2013;74:127-38.

57. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem.* 2012;23(8):853-9.
58. Bentley S, Hermes A, Phillips D, Daoud YA, Hanna S. Comparative effectiveness of a prenatal medical food to prenatal vitamins on hemoglobin levels and adverse outcomes: a retrospective analysis. *Clin Ther.* 2011;33(2):204-10.
59. Fernandez-Morera JL, Rodriguez-Rodero S, Menendez-Torre E, Fraga MF. The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, consequence, or both. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:605163.
60. Tchernia G, Blot I, Rey A, Kaltwasser JP, Zittoun J, Papiernik E. Maternal folate status, birthweight and gestational age. *Dev Pharmacol Ther.* 1982;4 Suppl:58-65.
61. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992;327(26):1832-5.
62. Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem.* 2009;20(12):917-26.
63. Dolinoy DC. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev.* 2008;66 Suppl 1:S7-11.
64. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr.* 2002;132(8 Suppl):2393S-400S.
65. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J.* 1998;12(11):949-57.
66. Myte R, Gylling B, Haggstrom J, Schneede J, Magne Ueland P, Hallmans G, et al. Untangling the role of one-carbon metabolism in colorectal cancer risk: a comprehensive Bayesian network analysis. *Sci Rep.* 2017;7:43434.
67. Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, Wu X, Ferguson-Smith AC, Fung E, et al. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell.* 2013;155(1):81-93.
68. Hazra A, Kraft P, Lazarus R, Chen C, Chanock SJ, Jacques P, et al. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. *Hum Mol Genet.* 2009;18(23):4677-87.
69. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. *Am J Hum Genet.* 2009;84(4):477-82.
70. Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, et al. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. *Biomed Res Int.* 2014;2014:560183.
71. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997;78(1):523-6.
72. Haggarty P, Hoad G, Horgan GW, Campbell DM. DNA methyltransferase candidate polymorphisms, imprinting methylation, and birth outcome. *PLoS One.* 2013;8(7):e68896.
73. Pangilinan F, Molloy AM, Mills JL, Troendle JF, Parle-McDermott A, Signore C, et al. Evaluation of common genetic variants in 82 candidate genes as risk factors for neural tube defects. *BMC Med Genet.* 2012;13:62.
74. Gardner DS, Bell RC, Symonds ME. Fetal mechanisms that lead to later hypertension. *Curr Drug Targets.* 2007;8(8):894-905.

75. Idzior-Walus B, Cyganek K, Sztefko K, Seghieri G, Breschi MC, Walus-Miarka M, et al. Total plasma homocysteine correlates in women with gestational diabetes. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;278(4):309-13.
76. Sreckovic B, Sreckovic VD, Soldatovic I, Colak E, Sumarac-Dumanovic M, Janeski H, et al. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis. *Diabetes Metab Syndr*. 2016.
77. Kartal Ozer N, Taha S, Azzi A. Homocysteine induces DNA synthesis and proliferation of vascular smooth muscle cells by interfering with MAPK kinase pathway. *Biofactors*. 2005;24(1-4):193-9.
78. Li L, Xie J, Zhang M, Wang S. Homocysteine harasses the imprinting expression of IGF2 and H19 by demethylation of differentially methylated region between IGF2/H19 genes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(6):464-71.
79. Wang J, Jiang Y, Yang A, Sun W, Ma C, Ma S, et al. Hyperhomocysteinemia-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promoter DNA Methylation by Nuclear Factor-kappaB/DNA Methyltransferase 1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Biores Open Access*. 2013;2(2):118-27.
80. Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(4):998-1003.
81. Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, et al. Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(8):1012-9.
82. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5 Suppl):1256S-61S.
83. Ernst S, Demirci C, Valle S, Velazquez-Garcia S, Garcia-Ocana A. Mechanisms in the adaptation of maternal beta-cells during pregnancy. *Diabetes Manag (Lond)*. 2011;1(2):239-48.
84. Wu P, Farrell WE, Haworth KE, Emes RD, Kitchen MO, Glossop JR, et al. Maternal genome-wide DNA methylation profiling in gestational diabetes shows distinctive disease-associated changes relative to matched healthy pregnancies. *Epigenetics*. 2016:0.
85. Veeraswamy S, Vijayam B, Gupta VK, Kapur A. Gestational diabetes: the public health relevance and approach. *Diabetes research and clinical practice*. 2012;97(3):350-8.
86. Yessoufou A, Moutairou K. Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory". *Experimental diabetes research*. 2011;2011:218598.
87. Finer S, Mathews C, Lowe R, Smart M, Hillman S, Foo L, et al. Maternal gestational diabetes is associated with genome-wide DNA methylation variation in placenta and cord blood of exposed offspring. *Hum Mol Genet*. 2015;24(11):3021-9.
88. Bouchard L, Hivert MF, Guay SP, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes*. 2012;61(5):1272-80.
89. Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, et al. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(11):2436-41.
90. El Hajj N, Pliushch G, Schneider E, Dittrich M, Muller T, Korenkov M, et al. Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 2013;62(4):1320-8.

91. Houde AA, Guay SP, Desgagne V, Hivert MF, Baillargeon JP, St-Pierre J, et al. Adaptations of placental and cord blood ABCA1 DNA methylation profile to maternal metabolic status. *Epigenetics*. 2013;8(12):1289-302.
92. Ruchat SM, Houde AA, Voisin G, St-Pierre J, Perron P, Baillargeon JP, et al. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics*. 2013;8(9):935-43.
93. Di Fulvio P, Pandolfi A, Formoso G, Di Silvestre S, Di Tomo P, Giardinelli A, et al. Features of endothelial dysfunction in umbilical cord vessels of women with gestational diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(12):1337-45.
94. Abbenhardt C, Miller JW, Song X, Brown EC, Cheng TY, Wener MH, et al. Biomarkers of one-carbon metabolism are associated with biomarkers of inflammation in women. *J Nutr*. 2014;144(5):714-21.
95. Wilson RD, Genetics C, Motherisk. Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2007;29(12):1003-13.
96. Davalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantu JM, Ibarra B, Sandoval L, et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet*. 2000;43(2):89-92.
97. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(3):701-7.
98. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab*. 1999;68(4):461-7.
99. Relton CL, Davey Smith G. Two-step epigenetic Mendelian randomization: a strategy for establishing the causal role of epigenetic processes in pathways to disease. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):161-76.
100. Allard C, Desgagne V, Patenaude J, Lacroix M, Guillemette L, Battista MC, et al. Mendelian randomization supports causality between maternal hyperglycemia and epigenetic regulation of leptin gene in newborns. *Epigenetics*. 2015;10(4):342-51.
101. Cooke Bailey JN, Igo RP, Jr. Genetic Risk Scores. *Curr Protoc Hum Genet*. 2016;91:129 1-19.
102. INEGI. Estadísticas de mortalidad 2015.
103. Organization WH. World Heart Day 2017 [Available from: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/world-heart-day-2017/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/)].
104. Horne BD, Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Renlund DG, Bair TL, et al. Generating genetic risk scores from intermediate phenotypes for use in association studies of clinically significant endpoints. *Ann Hum Genet*. 2005;69(Pt 2):176-86.
105. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5606-11.
106. Clifford AJ, Chen K, McWade L, Rincon G, Kim SH, Holstege DM, et al. Gender and single nucleotide polymorphisms in MTHFR, BHMT, SPTLC1, CRBP2, CETP, and

SCARB1 are significant predictors of plasma homocysteine normalized by RBC folate in healthy adults. *J Nutr.* 2012;142(9):1764-71.

107. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001;154(3):667-72.

108. Wibowo AS, Singh M, Reeder KM, Carter JJ, Kovach AR, Meng W, et al. Structures of human folate receptors reveal biological trafficking states and diversity in folate and antifolate recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(38):15180-8.

109. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab.* 2000;70(4):310-5.

110. Kohlmeier M, da Costa KA, Fischer LM, Zeisel SH. Genetic variation of folate-mediated one-carbon transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(44):16025-30.

111. Stanislawski-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, Buckley PT, Kealey C, Young IS, et al. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet.* 2009;73(Pt 5):484-91.

112. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.

113. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.

114. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481-5.

115. Roifman M, Choufani S, Turinsky AL, Drewlo S, Keating S, Brudno M, et al. Genome-wide placental DNA methylation analysis of severely growth-discordant monozygotic twins reveals novel epigenetic targets for intrauterine growth restriction. *Clin Epigenetics.* 2016;8:70.

116. Su R, Yan J, Yang H. Transgenerational Glucose Intolerance of Tumor Necrosis Factor with Epigenetic Alteration in Rat Perirenal Adipose Tissue Induced by Intrauterine Hyperglycemia. *J Diabetes Res.* 2016;2016:4952801.

117. Arroyo-Jousse V, Garcia-Diaz DF, Codner E, Perez-Bravo F. Epigenetics in type 1 diabetes: TNF $\alpha$  gene promoter methylation status in Chilean patients with type 1 diabetes mellitus. *Br J Nutr.* 2016;116(11):1861-8.

118. Liu ZH, Chen LL, Deng XL, Song HJ, Liao YF, Zeng TS, et al. Methylation status of CpG sites in the MCP-1 promoter is correlated to serum MCP-1 in Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(6):585-9.

119. Su R, Wang C, Feng H, Lin L, Liu X, Wei Y, et al. Alteration in Expression and Methylation of IGF2/H19 in Placenta and Umbilical Cord Blood Are Associated with Macrosomia Exposed to Intrauterine Hyperglycemia. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148399.

120. Michels KB, Harris HR, Barault L. Birthweight, maternal weight trajectories and global DNA methylation of LINE-1 repetitive elements. *PLoS One.* 2011;6(9):e25254.

121. Kelly P, McPartlin J, Scott J. A combined high-performance liquid chromatographic-microbiological assay for serum folic acid. *Anal Biochem.* 1996;238(2):179-83.

122. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, et al. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(7):1196-202.

123. van der Molen EF, van den Heuvel LP, te Poele Pothoff MT, Monnens IA, Eskes TK, Blom HJ. The effect of folic acid on the homocysteine metabolism in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Eur J Clin Invest.* 1996;26(4):304-9.
124. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017.
125. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-75.
126. Dustin Tingley TY, Kentaro Hirose, Luke Keele, Kosuke Imai. mediation: R Package for Causal Mediation Analysis. *Journal of Statistical Software.* 2014;59(5):1-38.
127. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57-74.
128. Phanstiel DH, Boyle AP, Araya CL, Snyder MP. Sushi.R: flexible, quantitative and integrative genomic visualizations for publication-quality multi-panel figures. *Bioinformatics.* 2014;30(19):2808-10.
129. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* 2015;12(2):115-21.
130. Patterson S, Flatt PR, McClenaghan NH. Homocysteine and other structurally-diverse amino thiols can alter pancreatic beta cell function without evoking cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(7):1109-14.
131. Crott JW. Effects of altered parental folate and one-carbon nutrient status on offspring growth and metabolism. *Mol Aspects Med.* 2017;53:28-35.
132. Selhub J, Rosenberg IH. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. *Biochimie.* 2016;126:71-8.
133. McKay JA, Groom A, Potter C, Coneyworth LJ, Ford D, Mathers JC, et al. Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12. *PLoS One.* 2012;7(3):e33290.
134. Khan A, Fornes O, Stigliani A, Gheorghe M, Castro-Mondragon JA, van der Lee R, et al. JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D260-D6.
135. Maier H, Ostraat R, Gao H, Fields S, Shinton SA, Medina KL, et al. Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat Immunol.* 2004;5(10):1069-77.
136. Fernandez-Jimenez N, Sklias A, Ecsedi S, Cahais V, Degli-Esposti D, Jay A, et al. Lowly methylated region analysis identifies EBF1 as a potential epigenetic modifier in breast cancer. *Epigenetics.* 2017;12(11):964-72.
137. Bockmuhl Y, Patchev AV, Madejska A, Hoffmann A, Sousa JC, Sousa N, et al. Methylation at the CpG island shore region upregulates Nr3c1 promoter activity after early-life stress. *Epigenetics.* 2015;10(3):247-57.
138. Kim TK, Shiekhhattar R. Architectural and Functional Commonalities between Enhancers and Promoters. *Cell.* 2015;162(5):948-59.
139. Khulan B, Cooper WN, Skinner BM, Bauer J, Owens S, Prentice AM, et al. Periconceptional maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia. *Hum Mol Genet.* 2012;21(9):2086-101.

140. Brown HM, Green ES, Tan TCY, Gonzalez MB, Rumbold AR, Hull ML, et al. Periconception onset diabetes is associated with embryopathy and fetal growth retardation, reproductive tract hyperglycosylation and impaired immune adaptation to pregnancy. *Sci Rep.* 2018;8(1):2114.
141. Dela Justina V, Goncalves JS, de Freitas RA, Fonseca AD, Volpato GT, Tostes RC, et al. Increased O-Linked N-Acetylglucosamine Modification of NF-KappaB and Augmented Cytokine Production in the Placentas from Hyperglycemic Rats. *Inflammation.* 2017;40(5):1773-81.
142. Shi FT, Kim H, Lu W, He Q, Liu D, Goodell MA, et al. Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2013;288(29):20776-84.
143. Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology.* 2009;59(1):31-44.
144. Magnusson M, Larsson P, Lu EX, Bergh N, Caren H, Jern S. Rapid and specific hypomethylation of enhancers in endothelial cells during adaptation to cell culturing. *Epigenetics.* 2016;11(8):614-24.

### 13. Material Suplementario

**Tabla Suplementaria 1. *Primers* de amplificación y de secuenciación para ensayos de pirosecuenciación**

Región	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Secuenciación (5' – 3')
<b>TNF -2007 → -1818</b>	GAAGATGGTGTATT TAGGGTTGTAG	*ACCCCTAAAATAATCAA AATAAAAACA	ATTTAGGGTTGTAG GAAT
<b>TNF -1869 → -2004</b>	*TTTTTTTTTAGTTT TTAGAAGATGGTGT ATT	ACCCCTAAAATAATCAA ATAAAAACA	ATTTTTTCTTTCTAA ATTTTTCC
<b>TNF -1792 → -1731</b>	GGGAGATTAGTTAT TTATTTATATAGAT GGTATT	*ACCTAAAATTCCTTCTTT AAAAACT	TGTTTTTATTTTGAT TATTTTAGGG
<b>TNF -312 → -228</b>	AAGAAATGGAGGT AATAGGTTTTGAG	*ACCAACAACCTTTTAT ATATCCC	GTTTTGAGGGGTAT GG
<b>TNF -178 → -41</b>	AAGAAATGGAGGT AATAGGTTTTGAG	*ACCAACAACCTTTTAT ATATCCC	TTTGTGTGTTTTTAA TTTTTTAAAT
<b>MCP1 -354 → -318</b>	TTGGAATGTGGTTT GAAGGTAAGTT	*ATTAAATCTACTAAACA AATACAACATCCTATAA	GTTTGAAGGTAAGT TGG
<b>MCP1 -164 → -318</b>	*TTTTGGAATGTGG TTTGAAGGTAAG	AATCTACTAAACAAATAC AACATCCTATAA	AAAAATAAAAAAAAA AAAACAAAAAA
<b>H19 -2299 → -2172</b>	AGGGGAATAATGA GGTGTTTTAG	*CTCCATAAATATCCTAT TCCCAAATA	ATGGATGATGGGGA T
<b>H19 -2164 → -2038</b>	*AGGGGAATAATGA GGTGTTTTAG	CTCCATAAATATCCTATT CCCAAATA	ATTCCCAAATAACC CC
<b>H19 -2005 → -1826</b>	GGGGTTATTTGGGA ATAGGATAT	*AACCCTTAAAACTAAA AAAATCAAAATATTC	GAATAGGATATTTA TGGGAG
<b>IGF -2085 → -2205</b>	*TATTTAGTAGGGG GTTAGGTGTATTTT	CCAAATCACCCAAAACCTT TACTTAACA	CTTTACTTAACAAAA CACTTAAATC
<b>IGF2 -2034 → -1914</b>	TAAGTAAAGTTTTG GGTGATTTGGGGTT ATAG	*ACATCTTCCCCTCCT AACTATA	ATTTGGGGTTATAG GG
<b>LEPR cg08234308</b>	*GGTTGTTTTTTTTT TTTTTTGAGAGT	AAAAAAAACAAATCCCAC CTT	ACAAATCCCACCTT AATC
<b>LINE-1 ‡</b>			

\* Primer biotinilado en el extremo 5'

‡ Ensayo prediseñado Qiagen #970012

**Tabla Suplementaria 2. Condiciones de amplificación para las regiones utilizadas en los ensayos de pirosecuenciación.**

Inactivación	15 minutos	95°C
45 ciclos		
Desnaturalización	30 segundos	94°C
Annealing	30 segundos	50°C*
		56°C‡
		58°C†
Extensión	30 segundos	72°C
Extensión Final	10 minutos	72°C

\* Para LINE-1  
† Para TNF -312 → -228, TNF -178 → -41, MCP1 -354 → -318, MCP1 -164 → -318, H19 -2299 → -2172, H19 -2164 → -2038, H19 -2005 → -1826, IGF -2085 → -2205, IGF2 -2034 → -1914,  
‡ Para TNF -2007 → -1818, TNF -1869 → -2004, TNF -1792 → -1731, LEPR cg08234308

**Tablas Suplementaria 3. Primers para la caracterización de HUVECs.**

Gen	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
vWF	TAAGTCTGAAGTAGAGGTGG	AGAGCAGCAGGAGCACTGGT
CD31	CCAAGGTGGGATCGTGAGG	TCGGAAGGATAAAACGCGGTC
CD146	AGGAGCCAAACATCCAGGTC	GTGTACAAACCACTCGACTCCA
CD45	TCTTAGGGACACGGCTGACT	TGAAAGTGGAACTGGGCA

**Tablas Suplementaria 4. Condiciones de qPCR para ensayos de expresión de marcadores de HUVECs**

Hold	10 minutos	95°C
40 ciclos	15 segundos	95°C
	60 segundos	60°C

**Tabla Suplementaria 5. Primers para análisis de expresión de moléculas de adhesión.**

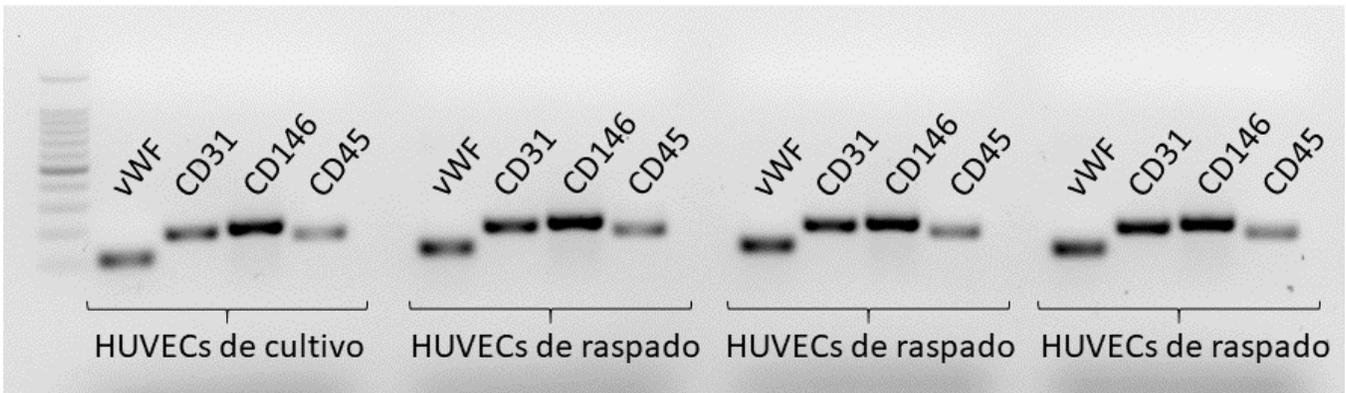
<b>Gen</b>	<b>Forward (5' – 3')</b>	<b>Reverse (5' – 3')</b>
<b>B2M</b>	CACCCCCACTGAAAAAGATGAG	CCTCCATGATGCTGCTTACATG
<b>ICAM1</b>	ACGGTGCTGGTGAGGAGAG	TCGCTGGCAGGACAAAGGT
<b>VCAM1</b>	GCAAGTCTACATATCACCCAAG	TCACAGAGCCACCTTCTT
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	AGACCAAGGTCAACCTCCT	AAAGTAGACCTGCCAGAC

**Tabla Suplementaria 6. Condiciones de qPCR para ensayos de expresión de moléculas de adhesión en HUVECs**

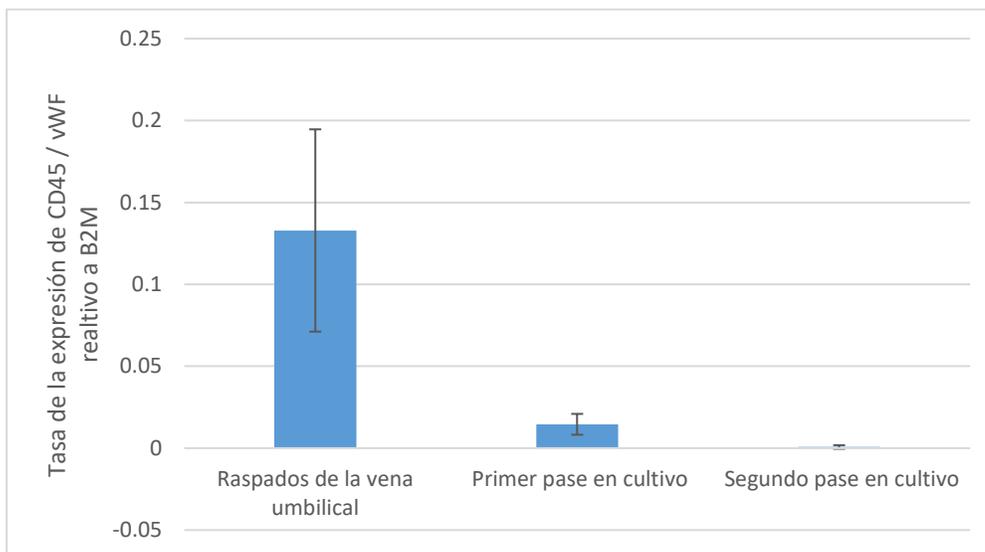
Hold	15 minutos	95°C
40 ciclos	15 segundos	94°C
	30 segundos	60°C
	30 segundos	72°C

**Tabla Suplementaria 7. Estadística descriptiva de la primera cohorte de 614 mujeres.**

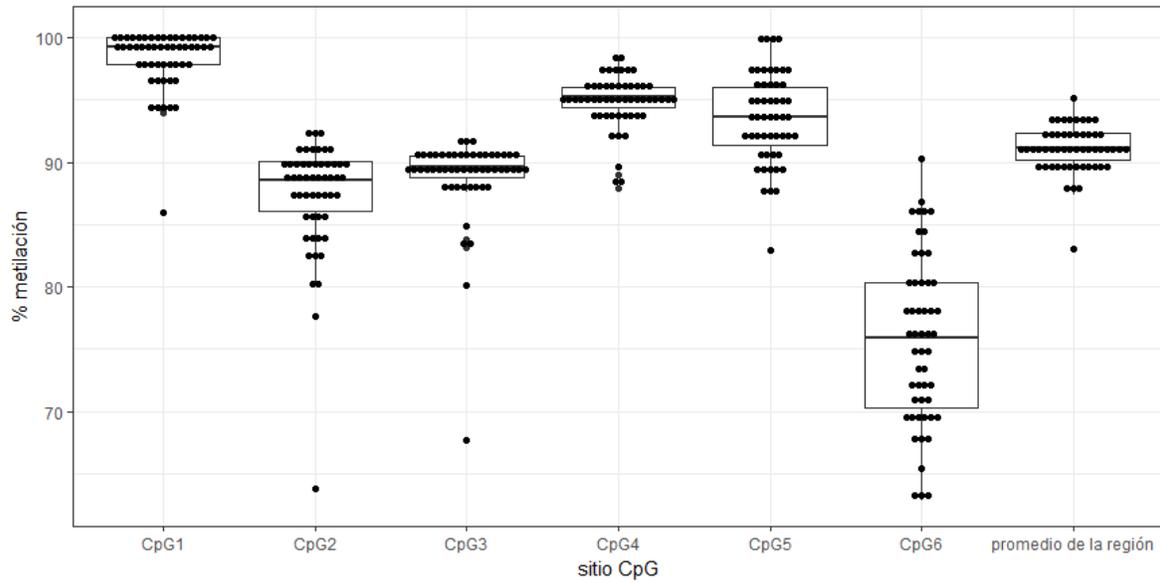
<b>Características Maternas</b>	<b>Mediana [percentil 25 – percentil 75] N=614</b>
Edad (años)	32 [26 - 37]
IMC pregestacional (Kg/m <sup>2</sup> )	25.48 [22.91 – 28.8]
Homocisteína ( $\mu$ mol/L)	7.040 [5.8 – 8.68]
Folato (ng/mL)	19.50 [13.35 – 25.25]
Vitamina B12 (pg/mL)	267.5 [200 - 374]
Semana gestacional de inicio de suplementación con ácido fólico (semana)	6.2 [0 - 9]
Dosis de suplementación con ácido fólico (mg/día)	1 [0.4 - 5]
Semana gestacional de la CTOG (semana)	27 [24 – 30]
Glucosa en ayuno (mg/dL)	85 [78 – 92.25]
Glucosa 60' (mg/dL)	154 [124 - 188]
Glucosa 120' (mg/dL)	132 [110 – 167.2]
AUC (mg*min/dL)	23025 [19230 - 27900]
Triacilglicerolos (mg/dL)	240 [189.2 – 292.2]
Colesterol Total (mg/dL)	226 [198 - 256]
HDL (mg/dL)	65 [53 – 76.5]
LDL (mg/dL)	109 [86.5 – 133.5]
DG (%)	47.33
Edad materna avanzada (%)	36.25
Obesidad (%)	19.05
Alta paridad (%)	43.9
Suplementación de ácido fólico menor a 400 $\mu$ g (%)	3.1



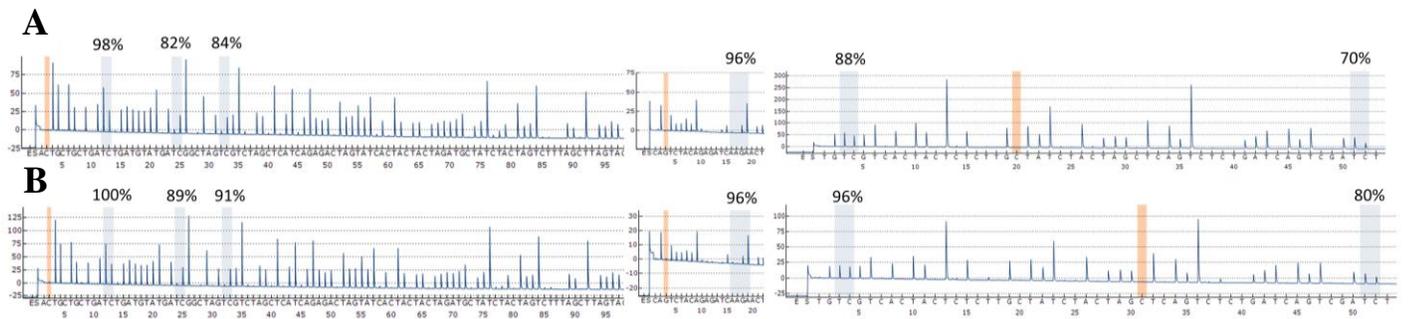
**Figura Suplementaria 1. Expresión de marcadores específicos de HUVECs. Se analizaron en HUVECs establecidas en cultivo y obtenidas mediante raspados de la vena umbilical.**



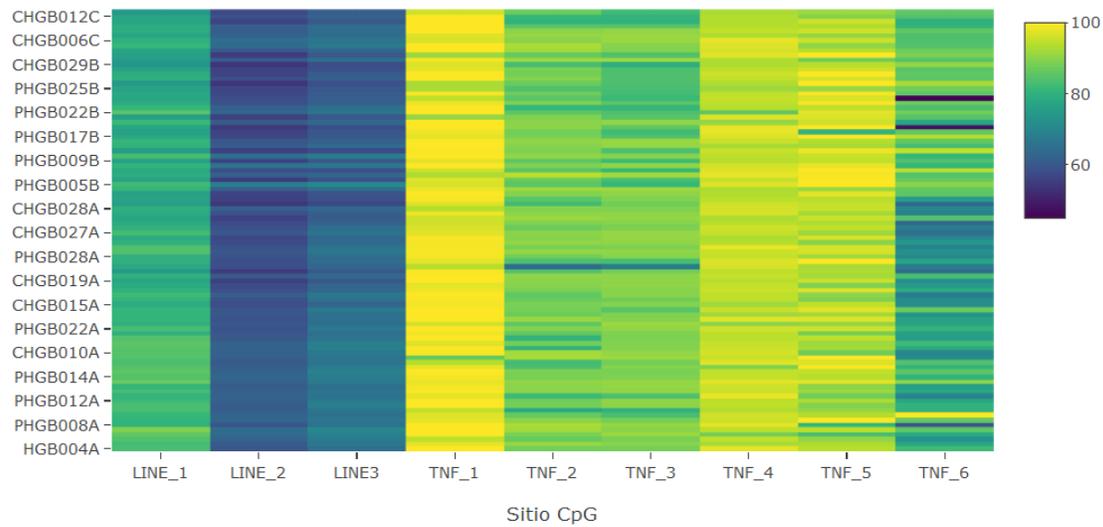
**Figura Suplementaria 2. Tasa de la expresión de CD45 / vWF relativa a B2M. Se observa como en las muestras obtenidas de los raspados hay una mayor expresión de CD45, que refleja una mayor cantidad de leucocitos contaminantes, la cuál va disminuyendo a través de los pases en cultivo.**



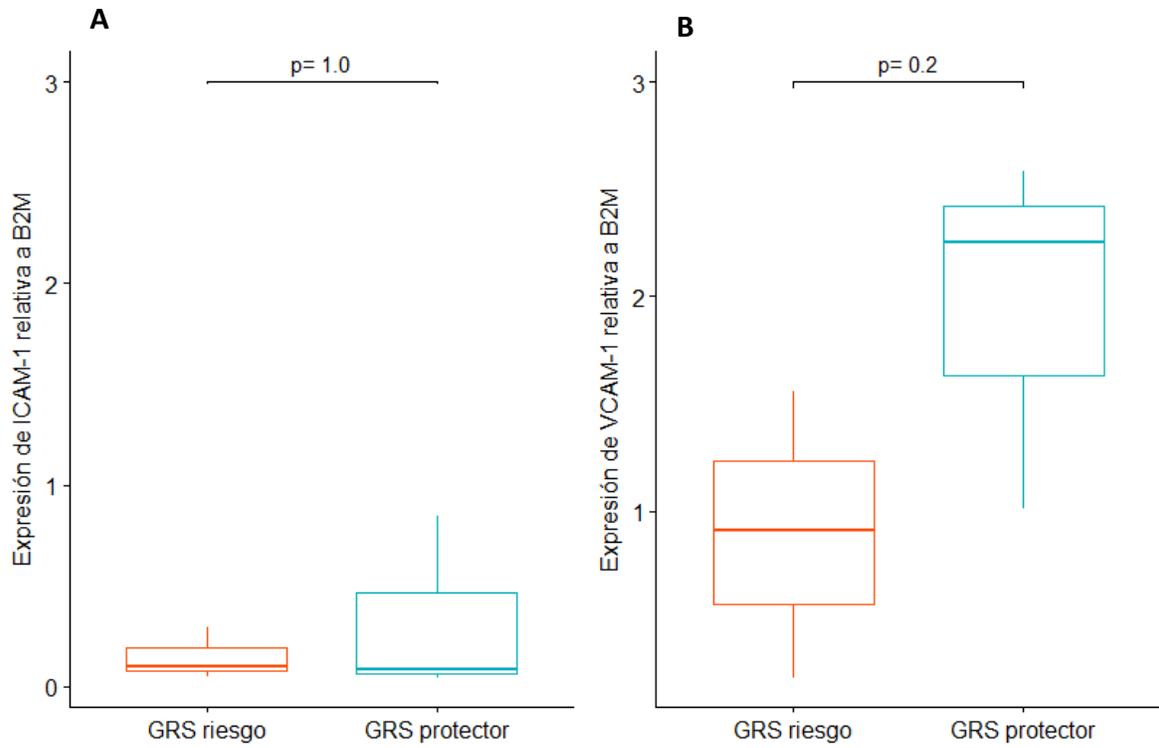
**Figura Suplementaria 3. Distribución del porcentaje de metilación en cada sitio CpG de la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba de TSS de TNF $\alpha$  para cada muestra.**



**Figura Suplementaria 4. Pirogramas representativos de la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba de TSS de TNF $\alpha$  de HUVECs expuestas al ambiente intrauterino de una paciente con GRS de riesgo (-0.14) (A) y de una paciente con GRS protector (0.23) (B). Ambas pertenecen al tercil inferior de dosis de suplementación con ácido fólico.**



**Figura Suplementaria 5. Perfil de metilación de DNA en cada sitio CpG de la región reguladora -2007 a -1731 bp río arriba de TSS de TNF $\alpha$  y LINE-1 para HUVECs obtenidas mediante raspados de la vena umbilical, de primer y segundo pase en cultivo.** La escala de colores representa el porcentaje de metilación que codificado del 0 al 100%. En el eje Y se muestran los nombres de las muestras. Las que contienen un A provienen de raspados de la vena umbilical (n=54), las que contienen B provienen de HUVECs de primer pase en cultivo (n=29) y las que contienen C provienen de HUVECs de segundo pase en cultivo (n=12).



**Figura Suplementaria 6. Expresión de las moléculas de adhesión ICAM1 (A) y VCAM1 (B) en condiciones basales de cultivo sin estimulación con  $TNF\alpha$ . Se muestra en p-valor de una prueba estadística de U Mann-Whitney.**