



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**"IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN DE DNA Y DE EXPRESIÓN GÉNICA TEJIDO-
ESPECÍFICOS ASOCIADOS A LA DIABETES GESTACIONAL: IMPACTO SOBRE LA REGULACIÓN
EPIGENÉTICA DE LA FUNCIÓN PLACENTARIA Y EN EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO
NEONATAL"**

**TESIS:
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

**PRESENTA:
DR. CÉSAR DAVID NIETO RUFINO**

**ASESORES:
M EN C. PAOLA VÁZQUEZ CÁRDENAS
DRA. ISELA JULIANA BARRITA DOMÍNGUEZ**

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO DEL 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



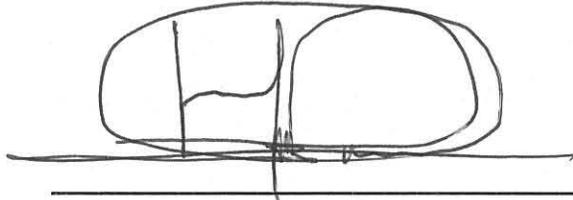
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

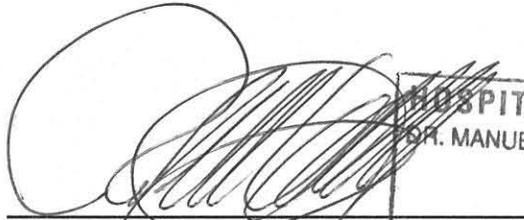
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

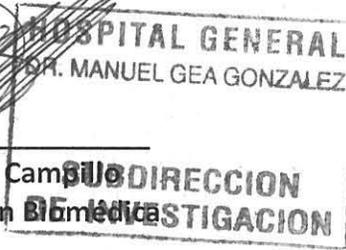
AUTORIZACIONES



Dr. Héctor Manuel Prado Calleros
Director de Enseñanza e Investigación.



Dr. José Pablo Maravilla Campos
Subdirector de Investigación



Dr. Jorge Román Audifred Salomón
Jefe de la División de Ginecología y Obstetricia



Dra. Isela Juliana Barrita Domínguez
Asesor metodológico y Médico Adscrito de la División de Ginecología y Obstetricia

Este trabajo de tesis con número de registro: 11-93-2015 presentado por el Dr. César David Nieto Rufino y se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis M en C. Paola Vázquez Cárdenas, con fecha febrero de 2019 para su impresión final.



Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



M en C. Paola Vázquez Cárdenas
Investigador Principal

“IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN DE DNA Y DE EXPRESIÓN GÉNICA TEJIDO-ESPECÍFICOS ASOCIADOS A LA DIABETES GESTACIONAL: IMPACTO SOBRE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA FUNCIÓN PLACENTARIA Y EN EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO NEONATAL”

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la División de Ginecoobstetricia bajo la dirección de **M en C. Paola Vázquez Cárdenas** con el apoyo de la **Dra. Isela Juliana Barrita Domínguez** y adscritos de la División quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

COLABORADORES:



M. en C. Paola Vázquez Cárdenas
Investigador Principal



Dr. César David Nieto Rufino
Investigador Asociado Principal



Dra. Isela Juliana Barrita Domínguez
Investigador Asociado



Dr. Jorge Román Audifred Salomón
Investigador Asociado

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

EMMA RUFINO EMETERIO
VICENTE NIETO CRUZ

Por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación como persona y estudiante, ejemplos de sabiduría, dedicación y esfuerzo. Guiándome por el camino de la honestidad y trabajo.

A MIS HERMANOS:

ALEJANDRA, IVETTE Y VÍCTOR

Personas ejemplares, que siempre han estado conmigo y que hoy son parte de esta meta.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO:

Por haberme albergado en su Alma Mater.

A LA M. EN C. PAOLA VÁZQUEZ CÁRDENAS:

Por permitirme formar parte de su equipo, brindándome apoyo, confianza y entusiasmo desde hace 3 años. Gracias por creer en mí y acompañarme en este proyecto, sin su intervención esta tesis no hubiera podido realizarse.

A LA DRA. ISELA JULIANA BARRITA DOMÍNGUEZ:

Por sus invaluable enseñanzas, constante apoyo y amistad. Ejemplo de perseverancia y disciplina. Gracias por guiarme en el difícil camino de la residencia.

AL SERVICIO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICA DEL HOSPITAL GENERAL DR MANUEL GEA GONZÁLEZ:

Encabezando al Dr. Jorge Román Audifred Salomón, le reitero mi gratitud por permitirme ser parte de esta gran familia.

A LA DRA. DANNIELA NIEBLA CÁRDENAS:

Por estar siempre pendiente de la parte académica y humana de cada uno de nosotros sus residentes. Gracias por enseñarme con el ejemplo a ser un líder.

A MIS MAESTROS:

Quienes de manera desinteresada han compartido su conocimiento: Dra. Alejandra Herrera, Dra. Atziri Ramírez, Dra. Luz María Hinojosa, Dra. Aida González, Dra. Gabriela Barrón, Dra. Priscilla Roque, Dra. Alma García, Dra. Luz María Uribe, Dra. Lizette Manzo, Dra. Cristina Cevallos, Dra. Rocío Santiago, Dr. Eduardo Lara, Dr. Gerardo Lara, Dr. Juan Pablo Aragón, Dr. Jorge Ceballos, Dr. Hugo Martínez, Dr. Aldelmo Reyes, Dr. Carlos Vargas, Dr. Rafael Topete, Dr. José Alanís.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

A cada uno de mis compañeros y excompañeros residentes, con quienes he compartido este largo camino.

A LOS COLABORADORES:

Este trabajo fue posible por la valiosa colaboración de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Especialmente, se agradece la colaboración de la Dra. Ma. Teresa Tusié Luna, la Dra. Hortensia Moreno Macías, la TS. Maribel Rodríguez Torres y la LIBB. Julia Carrasco-Zanini Sánchez. Este proyecto se realizó con recursos otorgados por CONACyT. Financiamiento FOSSIS-2015-01-262077.

ÍNDICE

1. RESÚMEN
2. INTRODUCCIÓN
3. MATERIALES Y MÉTODOS
4. RESULTADOS
5. DISCUSIÓN
6. CONCLUSIÓN
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
8. TABLAS
9. FIGURAS

1. RESÚMEN

Palabras clave: Diabetes gestacional; metilación de DNA; peso al nacer; programación fetal; folato.

INTRODUCCIÓN: La diabetes gestacional (DG) es un problema creciente en materia de salud, especialmente en ciertas poblaciones con particular predisposición genética como la mexicana, a la que se le suma la alta prevalencia de obesidad y factores ambientales de riesgo. Este proyecto contribuye al análisis de las regiones de susceptibilidad y genes relevantes y su regulación epigenética. Es relevante estudiar los perfiles epigenéticos en tejidos transitorios propios del embarazo como el cordón umbilical; por su implicación en los mecanismos vinculados con la programación fetal de riesgo para diabetes tipo 2 (DT2), y para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la vida adulta.

OBJETIVO GENERAL: Identificar los patrones de expresión génica y de metilación del DNA tejido-específicos asociados a la DG en mujeres embarazadas de la población Mestiza-Mexicana, así como su impacto sobre indicadores del crecimiento neonatal.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó un estudio observacional, prospectivo, analítico y longitudinal. Se captaron pacientes con menos de 14 semanas de gestación. Durante la semana de gestación 24 a 28 se les realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa. Se midieron niveles séricos de glucosa, homocisteína y folato. 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 de genes asociados a programación fetal.

RESULTADOS: El 16.9% de las mujeres estudiadas presentaron DG. Identificamos a los biomarcadores séricos y genéticos del metabolismo de folatos asociados significativamente con esta condición. La glucemia al minuto 120 postcarga y la homocisteína se asociaron con hipometilación de DNA en una región reguladora de TNF α . Además, la metilación en MCP-1 se asoció con el peso y longitud al nacer.

CONCLUSIÓN: La hiperglucemia en el embarazo favorece adaptaciones epigenéticas en $TNF\alpha$ en HUVECs. La metilación de DNA en la quimiocina MCP-1 se asocia con el peso al nacer. Estas adaptaciones podrían estar vinculadas con la programación metabólica fetal de riesgo para enfermedades crónicas.

2. INTRODUCCIÓN

La gestación representa un importante reto metabólico, ya que durante esta etapa se producen cambios drásticos en el metabolismo materno para asegurar las demandas de nutrientes del feto en crecimiento, aun cuando la madre también mantenga su incorporación (1). La segunda mitad del embarazo se caracteriza por un aumento en la resistencia a la insulina, producto de la ganancia de peso y secreción de hormonas placentarias (2), lo que se compensa con incremento en la biosíntesis y secreción de insulina. En las mujeres con DG la compensación no es suficiente y la concentración de glucosa plasmática alcanza niveles patológicos (3, 4).

La prevalencia de DG ha aumentado en los últimos años y es variable entre distintos grupos étnicos; por ejemplo, en poblaciones Asiáticas es de 5-10%, en México-Americanas de 5-7%, en Árabes de 5-7%, mientras que en poblaciones Europeas es de 2-4%. A diferencia de la DT2, no hay registros de su prevalencia en el país; sin embargo, estudios en diferentes entidades revelan frecuencias variables, muy probablemente dependientes del método de diagnóstico (5). Es importante mencionar que aún con las recomendaciones de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, American Diabetes Association), no hay un consenso internacional para el método de diagnóstico de la DG.

La dieta, la composición corporal y la salud materna contribuyen al riesgo a desarrollar DG. El aumento en la prevalencia de obesidad e intolerancia a los carbohidratos entre mujeres urbanas en edad reproductiva, particularmente entre niveles socioeconómicos alto y medio, representa un factor de riesgo para desarrollar DG. No obstante, también se han reportado altas prevalencias de la enfermedad entre mujeres con índice de masa corporal (IMC) y nivel socioeconómico bajo. Adicionalmente, la edad materna avanzada, la alta paridad y los antecedentes familiares de DM han mostrado conferir riesgo para desarrollar DG (6).

Se ha descrito que la DG tiene repercusiones importantes en la descendencia. Los niños diagnosticados con bajo peso para la edad gestacional al nacimiento, habiendo estado expuestos a un ambiente intrauterino adverso, determinado por la presencia de hiperglucemia

y/o de obesidad materna, tienen un mayor riesgo de desarrollar rasgos del síndrome metabólico durante la infancia o en la vida adulta. El incremento en la tasa de prevalencia de la obesidad en niños y adultos, tiene implicaciones importantes en la perpetuidad del ciclo de obesidad, resistencia a la insulina y sus consecuencias (DG, DT2, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares) en generaciones subsecuentes (7).

Tanto la DG como en la DT2 son enfermedades multifactoriales que involucran complejas interacciones entre factores genéticos y ambientales. La obesidad es el principal factor de riesgo para ambas condiciones metabólicas (8). Por su parte, el sedentarismo y la dieta son los factores de riesgo ambientales más fuertemente asociados a la obesidad, DT2 y DG. Así mismo, estudios de asociación genómica han identificado diferentes genes asociados con la DG y la DMT2, como KCNJ11, WFS1, TCF7L2, KCNQ1, HNF4A, entre otros relacionados más frecuentemente con la alteración en la secreción de insulina por la célula β pancreática (9-13), lo que sugiere que esta característica fisiopatológica podría ser más determinante en personas con alta susceptibilidad genética; mientras que la resistencia a la insulina y su exacerbación parece ser más debida principalmente a factores ambientales (14).

Adicionalmente, tanto la DG como la DT2 se asocian con hiperhomocisteinemia (15-17). La concentración de homocisteína se considera un biomarcador de la deficiencia de folatos, ya que está determinada por la disponibilidad de 5metilTHF en el metabolismo de unidades de carbono, la tasa de remetilación de homocisteína a metionina y la demanda de metilación por substratos específicos (p. ej. DNA) (18). En mujeres embarazadas, se ha observado que la hiperhomocisteinemia se asocia con mayor resistencia a la insulina (16), alteración de la función endotelial (19), mayor incidencia de abortos (20, 21), restricción del crecimiento intrauterino (22, 23), alteraciones placentarias (24), defectos del tubo neural (25) y pre-eclampsia (19).

La suplementación con ácido fólico ha demostrado efectos benéficos sobre las concentraciones de homocisteína y los parámetros relacionados con la resistencia a la insulina, inflamación y otras alteraciones metabólicas presentes en la obesidad, DT2 y DG. Solini et al,

demonstraron que la suplementación con 2.5 mg de ácido fólico durante 3 meses reduce significativamente las concentraciones de insulina en plasma, el índice de resistencia a la insulina y marcadores de inflamación como la proteína C-reactiva (26). Estos efectos también han sido observados en pacientes con DT2 (27), en los que además, se observa mejoría en el control glucémico medido por la hemoglobina glucosilada (HbA1c) (28). Mientras que algunos autores han demostrado que dosis tan bajas como 500 mcg de ácido fólico reducen la homocisteína plasmática y mejoran los parámetros metabólicos. Sin embargo, otros autores no reportan asociación significativa entre la suplementación con ácido fólico y la reducción de homocisteína. Las diferencias en la duración y la dosis de la terapia de suplementación podrían ser las responsables de la falta de consistencia entre los distintos estudios (27).

Por lo anterior, se propone que los mecanismos epigenéticos, particularmente la metilación de DNA dependiente de folatos, pueden tener un papel fundamental en la interacción gen-ambiente que se relaciona con los procesos de resistencia a la insulina y la secreción de la célula β pancreática involucrados en la DT2 y la DG. Dadas sus similitudes, es posible pensar en la DT2 y en la DG como dos fases de la misma enfermedad. Al compartir las mismas condiciones de predisposición, y reconociendo que el desarrollo de DT2 se relaciona con importantes mecanismos epigenéticos, es posible plantear la participación de estos mismos mecanismos en la DG.

Mecanismos epigenéticos: La metilación del DNA y la modulación de la expresión génica

Las células somáticas de un organismo multicelular tienen básicamente la misma información genética, no obstante, cada uno de los tipos celulares que forman parte del organismo tiene una estructura y función características. Esto se debe a la expresión diferencial del genoma, la cual es regulada principalmente por mecanismos epigenéticos (29). Los mecanismos de regulación epigenética se definen como los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA y que son mitóticamente heredables (30). Estos mecanismos incluyen, entre otros, a las

modificaciones covalentes de las histonas, el posicionamiento de variantes de histonas, el remodelamiento de los nucleosomas, los RNAs no codificantes, y la metilación del DNA. Todos ellos son fundamentales para la regulación de un gran número de procesos celulares, incluyendo la expresión de genes, la diferenciación celular, la embriogénesis, la inactivación transcripcional de elementos genéticos móviles y silenciamiento del cromosoma X y el proceso de impronta genómica (31).

La metilación del DNA es la única modificación epigenética que se presenta directamente en la molécula del DNA, la cual se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. La mayoría de las 5-metilcitosinas (5mC) en el DNA de mamíferos están presentes en los dinucleótidos CpG. También pueden estar metiladas secuencias no CpG, pero con menor frecuencia (32).

En las células somáticas humanas, la 5mC constituye 1% del total de las bases del DNA y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del DNA, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del DNA y la expresión génica (33).

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En 98% del genoma, los CpG están presentes en promedio una vez por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (> 50% de CG) y con una razón de frecuencias de dinucleótidos CpG observadas a la frecuencia estadísticamente esperada de al menos 0.6, denominadas "islas CpG" (33).

Alrededor del 60% de los promotores de genes humanos tienen islas CpG, las cuales se encuentran con mayor frecuencia no metiladas en células normales, aunque muchas de ellas, se presentan metiladas de manera tejido-específica durante el desarrollo embrionario o en tejidos diferenciados. En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión génica cuando se encuentran hipermetiladas (32).

La regulación transcripcional a partir de la metilación del DNA es un proceso complejo, dinámico y eficientemente regulado. Un prerequisite para entender las funciones de la metilación del DNA es conocer la existencia de patrones heredables del estado de metilación en el genoma de los mamíferos. Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación *de novo* particularmente activa en estos estadios. En general, el genoma de las células germinales femeninas se encuentra menos metilado que el de las masculinas. El patrón de metilación de los gametos es borrado por una desmetilación generalizada cerca del estadio 8 células. A partir de entonces, la metilación del DNA adquiere patrones específicos durante el desarrollo embrionario y se establece el patrón de metilación de las células somáticas. Se ha sugerido que los patrones de metilación de las islas CpG pueden servir para compartimentalizar al genoma en zonas transcripcionalmente activas e inactivas (34).

Desde hace varios años, una gran interrogante ha sido cómo se generan los patrones de DNA metilado y desmetilado durante el desarrollo y cómo se mantienen en las células diferenciadas. Estos procesos parecen ser el resultado de la acción combinada de enzimas que se encargan de metilar y de mantener los patrones de metilación, llamadas metiltransferasas *de novo* y de mantenimiento, respectivamente (35).

La reacción de metilación del DNA es catalizada por las DNA metiltransferasas e involucra la transferencia del grupo metilo de la S adenosil- L-metionina (SAM) al carbono 5 de la citosina. La SAM se produce tras una serie de reacciones que se desencadenan a partir de la ingesta (alimentaria o por suplementación) del ácido fólico. A través de la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), se logra que el metabolito 5,10 metil tetrahidrofolato (5,10 MTHF) se transforme en 5 metil tetrahidrofolato (5 MTHF), y a su vez, este dé lugar al tetrahidrofolato (THF). Esta cascada de reacciones garantiza que se donen grupos metilo, imprescindibles para la metilación de la homocisteína, con la ayuda del cofactor B12, y logra la formación de la metionina y de la S adenosil metionina (SAM), la mayor proteína donante de metilo intracelular (36).

A diferencia de los factores genéticos, los mecanismos de regulación epigenética son modificables. Existe una gran cantidad de evidencia de que estos mecanismos pueden ser modificados por factores ambientales y nutricionales, principalmente por el aporte de folatos (37-40), vitamina B12 (41, 42) y otros nutrimentos donadores de grupos metilo (43-47), lo que los hace relevantes en los mecanismos de adaptación metabólica involucrados en el embarazo y en la susceptibilidad a enfermedades metabólicas en la madre y en su descendencia (7, 48-56).

En México, se identifican tres factores de riesgo asociados a la deficiencia de folatos:

1) La deficiencia moderada de folatos (folato plasmático de 57 a 65 ng/ml) se presenta en 10.6% de las mujeres embarazadas, 2) La incidencia de defectos del tubo neural es más alta en México que en otros países (57) y 3) la frecuencia del alelo T de la variante C677T en el gen MTHFR es de 58%, siendo también más alta que en otras poblaciones (58). Considerando estos factores, en 2004 se establecieron las ingestas diarias sugeridas (IDS) de folato para la población mexicana: 460 µg eFD/día para mujeres no embarazadas y hombres mayores de 19 años y 750 µg eFD/día para mujeres embarazadas (59).

Adicionalmente a la ingesta de folatos naturales en la dieta, es fundamental la recomendación para mujeres en edad fértil de suplementar la dieta con 400 μg de ácido fólico sintético al menos tres meses antes del embarazo y durante el primer trimestre del mismo, ya que esta suplementación reduce en un 36% el riesgo de DTN (60), aún en poblaciones con una alta ingesta dietaria de folatos (61). Para mujeres con antecedentes personales o familiares de DTN o aquellas bajo tratamiento con anticonvulsivos, se recomienda la suplementación con 5 mg de ácido fólico tres meses antes de la concepción y durante el primer trimestre del embarazo (62).

Sin embargo, es posible que este patrón de suplementación no sea efectivo para todas las mujeres embarazadas, en función de la capacidad individual de absorber y metabolizar eficientemente los folatos. Esta capacidad estará determinada por la presencia de polimorfismos en los transportadores y enzimas involucrados en el metabolismo de los folatos (63).

La regulación epigenética y su papel en la programación fetal

Los estudios de Barker y colaboradores, en la década de 1980, establecieron que la incidencia de algunas enfermedades en el adulto, como la diabetes tipo 2, las dislipidemias, y los accidentes vasculares cerebrales se relacionaban con el bajo peso al nacer, el cual está fuertemente determinado por el ambiente intrauterino durante el desarrollo (hipótesis de Barker) (64). La hipótesis de la reprogramación metabólica señala que en condiciones de carencia de nutrimentos durante el desarrollo embrionario y fetal, ciertas estructuras y funciones de los órganos realizan una programación que determina los puntos de referencia que regularán las respuestas fisiológicas y metabólicas en la etapa adulta. Por lo tanto, se postula que el efecto de la programación a corto plazo permite la supervivencia del feto, mientras que a largo plazo predispone a enfermedades en la vida adulta (64).

La inducción de cambios persistentes en la función y estructura de los tejidos, por diferencias ambientales en la vida temprana, produce alteraciones permanentes en la

regulación de la transcripción de genes. Entre estos cambios adaptativos durante la vida fetal resaltan la resistencia a la insulina y el incremento en la capacidad para depositar lípidos en el tejido adiposo, y en la que se disminuye el tamaño de algunos órganos (músculo, hígado, páncreas etc), con el fin de priorizar el desarrollo óptimo del cerebro (65). En el periodo postnatal, una vez que el recién nacido deja de ser sometido a la presión ejercida por la carencia nutricional, se presentan fenotipos desfavorables y un mayor riesgo de padecer enfermedades metabólicas tales como obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (66).

La hipótesis de la programación fetal fue cuestionada por la ausencia de modificaciones genéticas que explicaran los mecanismos de establecimiento del fenotipo metabólico. Posteriormente, se identifica a los mecanismos epigenéticos como moduladores de la programación metabólica durante los periodos críticos del desarrollo pre y posnatal, en respuesta a distintos estímulos ambientales, los cuales inducen cambios permanentes en el metabolismo y la susceptibilidad para sufrir enfermedades (67).

Se reconoce que los individuos expuestos a hiperglucemia materna o DG durante su desarrollo embrionario tienen mayor susceptibilidad de presentar diabetes, obesidad y otras patologías metabólicas en la vida adulta (68, 69). Se ha demostrado que la hiperglucemia materna durante el embarazo modifica la metilación de DNA de genes involucrados en el metabolismo en tejidos embrionarios transitorios como la placenta y el cordón umbilical (70-73), lo que modifica la función placentaria de intercambio de oxígeno y nutrientes entre la madre y el feto. Sin embargo, aún no queda clara la relación que guardan los patrones de metilación en estos tejidos embrionarios transitorios con el epigenoma fetal y postnatal (70-75).

En cuanto al estudio de mecanismos de regulación epigenética involucrados en la programación metabólica fetal, la mayor limitante resulta de la dificultad para obtener tejidos fetales o neonatales. Como alternativa al análisis de células somáticas de origen fetal, se propone utilizar como modelo de estudio células endoteliales del cordón umbilical. El análisis de

marcajes de metilación de DNA en células de cordón umbilical podría producir resultados con una aproximación valiosa al marcaje epigenético en etapas tempranas del desarrollo, con posible influencia en la actividad transcripcional en tejidos relevantes para la susceptibilidad al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en la vida adulta (76).

Godfrey KM y colaboradores, identificaron regiones en los genes RXRA y eNOS diferencialmente metiladas en tejido de cordón umbilical. Además, el estado de metilación de estas regiones se asoció con el grado de adiposidad (porcentaje de masa total y central) a la edad de 6 y 9 años, respectivamente. Estos resultados orientan hacia la utilidad del análisis del estado de metilación en cordón umbilical como marcador de programación fetal a través de marcas epigenéticas que predisponen al producto a una mayor adiposidad en la vida adulta (77).

En la tabla 1 se resumen los hallazgos de estudios que han demostrado que la expresión de algunos genes se regula mediante la metilación de las islas CpG descritas en sus promotores, y que adicionalmente, los niveles de metilación de estas regiones han sido asociadas a rasgos fenotípicos maternos o fetales relacionados con DT2 u obesidad.

La relevancia principal del estudio de los patrones de metilación asociados a la DG y a la obesidad radica en que, dado que la metilación del DNA puede ser mitóticamente y meióticamente estable, los patrones de metilación en el gen de la leptina y en otros genes implicados en vías metabólicas asociadas con la adaptación al embarazo y a las alteraciones producidas por la DG en presencia o ausencia de obesidad podría tener importantes efectos fenotípicos a corto y largo plazo.

Sin embargo, hasta el momento se conoce poco sobre el papel de la metilación diferencial del DNA y expresión de genes importantes en tejidos relevantes para enfermedades complejas como la diabetes tipo 2, diabetes gestacional y obesidad.

El objetivo del presente análisis preliminar de los datos, fue Identificar los patrones de metilación del DNA asociados a la DG en células de cordón umbilical de mujeres embarazadas

de la población Mestiza-Mexicana, así como su impacto sobre indicadores del crecimiento neonatal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, analítico y longitudinal. En este análisis se incluyen los datos obtenidos hasta el momento 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”. Se cuenta con datos completos de 172 mujeres. De estas, únicamente se obtuvieron datos y muestras de sus neonatos en 53 casos, que fueron las que tuvieron seguimiento en nuestro hospital hasta el momento del parto.

Las pacientes fueron captadas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia. Se invitó 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°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.

Durante el parto se recolectó el cordón umbilical y se almacenó en PBS (sin calcio y magnesio), pH 7.2 a 4°C durante menos de 12 horas.

Mediciones y Parámetros Bioquímicos / Antropométricos

En las muestras de suero materno recolectadas durante las semanas 24 – 28 del embarazo se determinaron concentraciones 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 (78). Se determinaron concentraciones de folato y vitamina B12 en suero mediante métodos enzimáticos basados en quimioluminiscencia (Beckman Coulter) y de homocisteína mediante colorimetría (Beckman Coulter).

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 los 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 (79).

Se calculó el Modelo Homeostático (HOMA IR), a partir de las concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas, obtenidas en condiciones de ayuno, para estimar la resistencia a la insulina. Se calculó con la fórmula: $HOMA\ IR = (insulina\ \mu U/mL)(Glucosa\ mg/dL)/22.5 \times 18$ propuesta por Wallace (80).

Obtención de HUVECs

De los cordones umbilicales recolectados se obtuvieron fragmentos de 10 a 15 cm. Se realizaron raspados de la vena umbilical con cepillos de citología para obtener las células endoteliales. Los cepillos se colocan en PBS + 4% albúmina bovina y se agitaron a 3000 rpm. Posteriormente, se retiró el cepillo del tubo y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos.

Se realizó lavado del botón de células obtenidas con Buffer EL (Qiagen) y se incubó a 4°C por 10 minutos. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm, a 4°C por 10 minutos y se resuspendió el botón de células en 500µL de buffer EL, el cual se almacena a -70°C para realizar posteriormente la extracción de DNA.

Criterio de selección de regiones para el estudio de metilación de DNA

Se realizó una revisión en la literatura, con enfoque en los 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. Las regiones seleccionadas se muestran en la tabla 1. Adicionalmente, se incluyeron secuencias repetidas LINE-1, frecuentemente utilizadas como un indicador de los niveles de metilación globales en el genoma.

Conversión por bisulfito y Pirosecuenciación

De las HUVECs obtenidas se hizo extracción de DNA 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°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 PCRs de amplificación se hicieron con el *PyroMark PCR kit (Qiagen)* utilizando 12.5µL *PyroMark PCR MasterMix 2x*, 2.5µL *CoralLoad Concentrate 10x*, 2.5µL de la mezcla de *primers* sentido y antisentido 10x y 20 ng de DNA convertido por bisulfito en un volumen final de 25µL. 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 10µL, 1µL de perlas de sefarosa cubiertas de estreptavidina y 40µL de buffer de unión en un volumen total de 80µL. Los productos de PCR biotilados 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 20µL del *primer* de secuenciación (0.375µM). Esta se somete a una incubación a 80°C por cinco minutos antes de iniciar la corrida.

Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron hechos en R 3.4.3. 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.

Se realizó estadística descriptiva, calculando medias y desviaciones estándar, medianas y rango intercuartilar y frecuencias absolutas y relativas, según el nivel de medición de las variables. Se analizó la asociación entre los biomarcadores del metabolismo de folato (folato, vitamina B12 y homocisteína) y los valores de glucosa, insulina y HOMA-IR, ajustando modelos de regresión lineal incluyendo como covariables el IMC pregestacional, la edad materna, el número de gestas.

Se ajustó un modelo de regresión lineal para determinar el riesgo de DG cuando se incluyen variables clínicas (edad materna avanzada, obesidad o alta paridad) y se obtuvo la razón de momios. Posteriormente se ajustó el mismo modelo, pero incluyendo como variables regresoras a los biomarcadores del metabolismo de folato.

Los análisis de asociación se hicieron mediante regresiones lineales incluyendo como covariables el IMC pregestacional, la edad materna, el número de gestas. Para las asociaciones entre los parámetros metabólicos maternos y los niveles de metilación y el peso y longitud al

nacer, se realizaron regresiones lineales incluyendo como covariables el IMC pregestacional, la edad materna, el número de gestas, el sexo del bebé y la edad gestacional.

4. RESULTADOS

Se incluyeron 172 mujeres. De estas, 53 cuentan con muestras de HUVECs de sus hijos. Las características de las mujeres como de los neonatos se muestran en la tabla 2. La mediana de la edad de las madres fue de 27 años y la mediana del IMC pregestacional fue de 24.59 Kg/m². 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 los 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.

Análisis del efecto de los biomarcadores del metabolismo de folato sobre indicadores metabólicos asociados con la diabetes gestacional

La suplementación iniciada en el segundo trimestre del embarazo se asoció con parámetros glucémicos relacionados con DG. Existe una asociación significativa entre los tres biomarcadores de la vía metabólica de folatos (folato, vitamina B12 y homocisteína) y las concentraciones de insulina en ayuno. A mayor concentración de folato menores niveles de insulina en ayuno (p 0.001). A mayores niveles de homocisteína, mayor concentración de insulina en ayuno (p 0.008). Mientras que a mayores niveles de vitamina B12, incrementan los niveles de homocisteína. Las asociaciones entre los biomarcadores y la concentración de glucosa no resultaron significativas (tabla 3).

Adicionalmente, se analizó la asociación entre los biomarcadores del metabolismo de folato y los valores de HOMA-IR, como indicador del grado de resistencia a la insulina. Ante una concentración mayor de folato, existe un valor menor de HOMA-IR ($p < 0.010$), y a mayor concentración de homocisteína se presenta también un valor superior de HOMA-IR ($p < 0.010$).

Se ajustó un modelo de riesgo con variables clínicas, e identificamos que la probabilidad de padecer DG aumenta si la paciente tiene edad materna avanzada, obesidad o una alta paridad con un OR de 5.22 ($p < 0.0001$). Si a estos factores se les aumenta una deficiencia de AF el riesgo aumenta hasta un 6.2 ($p < 0.0001$) y si se relaciona con una concentración elevada de homocisteína el riesgo aumenta aún más, con un OR de 6.38 ($p < 0.0001$). Estos resultados se esquematizan en la figura 1.

Efecto de la glucemia y homocisteinemia sobre la metilación de DNA en regiones de programación para enfermedad cardiovascular

Dado el número insuficiente de mujeres con DG para establecer comparaciones entre grupos, realizamos los análisis con modelos lineales que para variables relacionadas con alteraciones metabólicas durante el tercer trimestre del embarazo. Posteriormente, se analizó el efecto de dichas alteraciones metabólicas sobre la metilación de DNA en HUVECs, como modelo de programación fetal.

De las 7 regiones analizadas mediante pirosecuenciación de DNA convertido por bisulfito, sólo una mostró asociaciones significativas entre sus niveles de metilación e indicadores metabólicos. Esta región fue la ubicada entre -2007 a -1731 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de TNF α . 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. El porcentaje de metilación en esta región resultó en una asociación con glucosa a los 120' postcarga de la CTOG ($\beta = -0.44$ $p = 0.006$) (tabla 4), 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 nominal con la metilación en la región reguladora de TNF ($p=0.08$).

Asociación de la metilación de DNA en regiones de programación fetal con marcadores de crecimiento neonatal

Se ajustaron modelos de regresión lineal para analizar el efecto de la metilación de DNA en las regiones propuestas, sobre el peso y longitud al nacer, como indicadores del crecimiento neonatal. De las 7 regiones analizadas, una localizada en la región promotora del gen MCP-1 resultó significativamente asociada con el peso del recién nacido (coef. β -124.33, p 0.012) y con la longitud al nacer (coef. β -0.79, p 0.004). Estas asociaciones se ajustaron por edad gestacional y sexo del recién nacido y por edad e IMC pregestacional de la madre. El resto de las regiones no se asociaron significativamente con ninguno de los parámetros de crecimiento.

5. 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 por factores maternos metabólicos, cuya exposición induce cambios funcionales y en la metilación de DNA en HUVECs como un modelo de estudio de la respuesta fetal.

De forma interesante, en este trabajo identificamos que el inicio de la suplementación con ácido fólico, así como los biomarcadores del metabolismo de folatos se asocian con indicadores metabólicos como la insulina y HOMA-IR. Lo anterior se refleja en niveles más elevados de glucosa al minuto 120' postcarga 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 β pancreáticas para poder secretar más insulina son de particular importancia. 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 (82). Adicionalmente, la asociación de la dosis de suplementación con ácido fólico que se reporta en los resultados, apoya este punto dado que el incremento en la

suplementación atenúa el riesgo conferido incluso por variantes genéticas, 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 (83, 84). Con los datos obtenidos hasta el momento, no es posible hacer inferencias sobre el punto de corte superior en el cual el exceso de folatos pueda resultar en efectos adversos.

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 α . Este cambio se dió en respuesta a la exposición a un ambiente intrauterino adverso caracterizado principalmente por una deficiencia en la capacidad de secreción de insulina materna, reflejada por la glucemia al minuto 120' postcarga.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es una citoquina proinflamatoria. Su efecto endocrino directo parece menos importante que los efectos indirectos resultantes de la modulación auto y paracrina de los ácidos grasos no esterificados, cuya captación por el tejido adiposo disminuye, así como de adiponectina e interleucina 6 (IL-6), cuya expresión inhibe. La expresión génica y los niveles circulantes de esta citoquina correlacionan positivamente tanto con la obesidad como con la resistencia a la acción periférica de la insulina y disminuye con la pérdida de peso. Constituye un predictor para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular, lo que es relevante en el contexto de la programación metabólica fetal (85)

Por otra parte, a partir de nuestros resultados no se demostró la asociación ampliamente reportada entre los niveles de folato u homocisteína, con la metilación global, explorado en este trabajo a través de la evaluación de secuencias repetidas LINE-1. Esto podría indicar que las adaptaciones fetales son fenómenos coordinados por genes específicos y que podrían 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 sitio de inicio de la transcripción de TNF α 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.

La identificación de metabolitos involucrados en el establecimiento de un ambiente intrauterino adverso caracterizado por hiperglucemia, permitió evaluarlos con distintos desenlaces en las células fetales. El nivel de glucosa al minuto 120 postcarga se identificó como un marcador del ambiente intrauterino adverso, 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 localizada -2007 a -1731 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción de TNF α . 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 α para la cual se encontró una asociación con glucosa al minutos 120 postcarga, 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. 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 α (86).

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 α . Por lo que se propone que tanto la hiperglucemia, como el metabolismo de unidades de carbono, podrían estar involucrados 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, con el estudio actual, sólo 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 α .

De forma interesante, identificamos una asociación entre la metilación de DNA en MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1) y el peso al nacer. A mayor porcentaje de metilación en esta región génica, menor peso y longitud al nacer. La regulación de la expresión de MCP-1 en HUVECs es particularmente relevante, dado que esta molécula de señalización es secretada por el tejido adiposo y tiene efectos proinflamatorios y aterogénicos. Particularmente, se han reportado asociaciones significativas entre el peso al nacer y los niveles circulantes de adipocinas en niños, además de que existe evidencia que sugiere que la desregulación de esta y otras adipocinas contribuye al desarrollo de aterosclerosis, disfunción endotelial, resistencia a la insulina y síndrome metabólico. Un estudio realizado en niños en edad escolar reportó que los niveles de MCP-1 fueron mayores en niños que tuvieron un bajo peso al nacer. Los niveles de MCP-1 también se asociaron con circunferencia de cintura en niños con bajo peso al nacer

(87). Nuestros resultados sugieren que la desregulación de esta adipocina proinflamatoria pudiera ser programada desde el desarrollo fetal. El hallazgo de la asociación entre los niveles de metilación en la región promotora de MCP-1 en HUVECs, y el peso y longitud al nacer sugiere un potencial mecanismo de alteración en la programación del endotelio vascular, con impacto en el desarrollo de fenotipos relacionados con riesgo cardiovascular.

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.

La principal 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, por lo que es necesario incrementar el número de pacientes y minimizar las pérdidas al seguimiento. Resalta que sólo el 30.8% de las pacientes incluidas durante el primer trimestre del embarazo llegaron a parto o cesárea en nuestro hospital, lo que limita el acceso a los tejidos y muestras de origen fetal para el análisis.

6. CONCLUSIÓN

En este estudio se confirma la asociación entre el metabolismo de folatos y niveles glucémicos en el embarazo. El nivel de glucosa al minuto 120 postcarga se encontró como un marcador del ambiente intrauterino adverso asociado con la metilación de DNA. La hiperglucemia e hiperhomocisteinemia en las madres, favorece adaptaciones epigenéticas en $TNF\alpha$ en HUVECs, lo que confirma la asociación entre hiperglucemia materna durante el embarazo y cambios en los patrones de metilación de DNA.

En cuanto a los desenlaces fetales, 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.

La metilación de DNA en la quimiocina MCP-1 se asocia con el peso al nacer. Estas adaptaciones podrían estar vinculadas con la programación metabólica fetal de riesgo para enfermedades crónicas, lo que amerita estudios mecanísticos y seguimientos a largo plazo para confirmar estas asociaciones. En este sentido, se continuará con el reclutamiento de mujeres embarazadas en nuestro hospital y como perspectiva, se plantea un seguimiento de los hijos de estas pacientes.

--

Este trabajo se realizó con financiamiento vigente del Fondo Sectorial de Investigación en Salud (FOSISS) de CONACyT (SALUD-2015-01-262077).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torgersen KL, Curran CA. A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q.* 2006;29(1):2-19.
2. Cunningham F, Gant, N., Leveno, K., Gilstrap, L., Hauth, J., Wenstrom, K. *Williams Obstetricia.* 21 ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2003. 1317 p.
3. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2005;115(3):485-91.
4. Vambergue A, Valat AS, Dufour P, Cazaubiel M, Fontaine P, Puech F. [Pathophysiology of gestational diabetes]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2002;31(6 Suppl):4S3-4S10.
5. Shaat N, Groop L. Genetics of gestational diabetes mellitus. *Curr Med Chem.* 2007;14(5):569-83.
6. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine.* 2004;21(2):103-13.
7. Fernandez-Morera JL, Rodriguez-Rodero S, Menendez-Torre E, Fraga MF. The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, consequence, or both. *Obstetrics and gynecology international.* 2010;2010:605163.
8. Lawlor DA, Relton C, Sattar N, Nelson SM. Maternal adiposity--a determinant of perinatal and offspring outcomes? *Nature reviews Endocrinology.* 2012;8(11):679-88.
9. Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E, et al. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Human reproduction update.* 2013;19(4):376-90.
10. Robitaille J, Grant AM. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 2008;10(4):240-50.
11. Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Pedersen O, et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2009;94(1):145-50.
12. Reyes-Lopez R, Perez-Luque E, Malacara JM. Metabolic, hormonal characteristics, and genetic variants of TCF7L2 associated with development of gestational diabetes mellitus in Mexican women. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2014.
13. Guzman-Flores JM, Escalante M, Sanchez-Corona J, Garcia-Zapien AG, Cruz-Quevedo EG, Munoz-Valle JF, et al. Association analysis between -308G/A and -238G/A TNF-alpha gene promoter polymorphisms and insulin resistance in Mexican women with gestational diabetes mellitus. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research.* 2013;61(2):265-9.
14. Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia.* 2008;51(7):1100-10.
15. Guven MA, Kilinc M, Batukan C, Ekerbicer HC, Aksu T. Elevated second trimester serum homocysteine levels in women with gestational diabetes mellitus. *Archives of gynecology and obstetrics.* 2006;274(6):333-7.

17. Huang T, Ren J, Huang J, Li D. Association of homocysteine with type 2 diabetes: a meta-analysis implementing Mendelian randomization approach. *BMC genomics*. 2013;14:867.
18. Zhou SS, Zhou YM, Li D, Lun YZ. Dietary methyl-consuming compounds and metabolic syndrome. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2011;34(12):1239-45.
19. Powers RW, Evans RW, Majors AK, Ojimba JI, Ness RB, Crombleholme WR, et al. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179(6 Pt 1):1605-11.
20. Kumar KS, Govindaiah V, Naushad SE, Devi RR, Jyothy A. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2003;23(1):55-8.
21. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2000;74(6):1196-9.
22. Hogeveen M, Blom HJ, den Heijer M. Maternal homocysteine and small-for-gestational-age offspring: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(1):130-6.
23. Gadhok AK, Sinha M, Khunteta R, Vardey SK, Upadhyaya C, Sharma TK, et al. Serum homocysteine level and its association with folic acid and vitamin B12 in the third trimester of pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. *Clinical laboratory*. 2011;57(11-12):933-8.
24. Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1996;66(1):23-9.
25. Kobus K, Ammar D, Nazari EM, Muller YM. Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2013;97(6):386-97.
26. Solini A, Santini E, Ferrannini E. Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. *International journal of obesity*. 2006;30(8):1197-202.
27. Sudchada P, Saokaew S, Sridetch S, Incampa S, Jaiyen S, Khaithong W. Effect of folic acid supplementation on plasma total homocysteine levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes research and clinical practice*. 2012;98(1):151-8.
28. Gargari BP, Aghamohammadi V, Aliasgharzadeh A. Effect of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obese men with type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;94(1):33-8.
29. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1057-68.
30. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128(4):635-8.

31. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2013;38(1):23-38.
32. Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(6):446-55.
33. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in mammalian genomes. *J Mol Biol*. 1987;196:261-82.
34. Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS genetics*. 2014;10(12):e1004868.
35. Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS genetics*. 2012;8(6):e1002750.
36. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*. 2014;533(1):11-20.
37. Choi SW, Friso S, Keyes MK, Mason JB. Folate supplementation increases genomic DNA methylation in the liver of elder rats. *The British journal of nutrition*. 2005;93(1):31-5.
38. Pogribny IP, Miller BJ, James SJ. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer letters*. 1997;115(1):31-8.
39. 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.
40. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1998;12(11):949-57.
41. Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L; et al. Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion*. 2003;68(2-3):133-40.
42. 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. *Clinical chemistry and laboratory medicine* : CCLM / FESCC. 2003;41(8):1012-9.
43. Guerrero AL, Colvin RM, Schwartz AK, Molleston JP, Murray KF, Diehl A, et al. Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(4):892-900.
44. Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*. 1983;4(12):1619-29.
45. Wang Z, Yao T, Pini M, Zhou Z, Fantuzzi G, Song Z. Betaine improved adipose tissue function in mice fed a high-fat diet: a mechanism for hepatoprotective effect of betaine in nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2010;298(5):G634-42.
46. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environmental health perspectives*. 2006;114(4):567-72.

47. Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr.* 2006;136(6 Suppl):1706S-10S.
48. Cencioni C, Spallotta F, Greco S, Martelli F, Zeiher AM, Gaetano C. Epigenetic mechanisms of hyperglycemic memory. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2014.
49. Del Rosario MC, Ossowski V, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ, Hanson RL. Potential epigenetic dysregulation of genes associated with MODY and type 2 diabetes in humans exposed to a diabetic intrauterine environment: An analysis of genome-wide DNA methylation. *Metabolism: clinical and experimental.* 2014;63(5):654-60.
50. Avrahami D, Kaestner KH. Epigenetic regulation of pancreas development and function. *Seminars in cell & developmental biology.* 2012;23(6):693-700.
51. Cheng Z, Almeida FA. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: an epigenetic link. *Cell cycle.* 2014;13(6):890-7.
52. de Mello VD, Pulkkinen L, Lalli M, Kolehmainen M, Pihlajamaki J, Uusitupa M. DNA methylation in obesity and type 2 diabetes. *Annals of medicine.* 2014;46(3):103-13.
53. Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nature reviews Endocrinology.* 2009;5(7):401-8.
54. Hino S, Nagaoka K, Nakao M. Metabolism-epigenome crosstalk in physiology and diseases. *J Hum Genet.* 2013;58(7):410-5.
55. Katada S, Imhof A, Sassone-Corsi P. Connecting threads: epigenetics and metabolism. *Cell.* 2012;148(1-2):24-8.
56. Schwenk RW, Vogel H, Schurmann A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Molecular metabolism.* 2013;2(4):337-47.
57. Mutchinick OM, López 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. *Molecular genetics and metabolism.* 1999;68(4):461-7.
58. Guéant-Rodriguez RM, Guéant 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;83:701-7.
59. Bourges H, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la Población Mexicana. Bases Fisiológicas. Tomo I. México: Editorial Medica Panamericana; 2005.
60. Wilson RD. 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. *JOGC.* 2007(201):1003-11.
61. Krawinkel MB, Strohm D, Weissenborn A, Watzl B, Eichholzer M, Barlocher K, et al. Revised D-A-CH intake recommendations for folate: how much is needed? *European journal of clinical nutrition.* 2014.
62. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu YH. Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Rev Obstet Gynecol.* 2011;4(2):52-9.
63. West AA, Caudill MA. Genetic variation: impact on folate (and choline) bioefficacy. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale*

- Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition. 2010;80(4-5):319-29.
64. Barker DJ. The fetal origins of diseases of old age. *European journal of clinical nutrition*. 1992;46 Suppl 3:S3-9.
65. Gueant JL, Elakoum R, Ziegler O, Coelho D, Feigerlova E, Daval JL, et al. Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2013.
66. Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(9):364-8.
67. Ivanova E, Chen JH, Segonds-Pichon A, Ozanne SE, Kelsey G. DNA methylation at differentially methylated regions of imprinted genes is resistant to developmental programming by maternal nutrition. *Epigenetics*. 2012;7(10):1200-10.
68. Green AS, Rozance PJ, Limesand SW. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *The Journal of endocrinology*. 2010;205(3):211-24.
69. Hogg K, Price EM, Hanna CW, Robinson WP. Prenatal and perinatal environmental influences on the human fetal and placental epigenome. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;92(6):716-26.
70. 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.
71. 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.
72. Houde AA, Guay SP, Desgagne V, Hivert MF, Baillargeon JP, Perron P, et al. Adaptations of Placental ABCA1 DNA Methylation to Maternal Glucose Metabolism and HDL-C Levels Are Associated With Cord Blood Lipid Profile. *Canadian journal of diabetes*. 2013;37(1):61.
73. 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.
74. Houde AA, Hivert MF, Bouchard L. Fetal epigenetic programming of adipokines. *Adipocyte*. 2013;2(1):41-6.
75. Ruchat S-M, Houde A-A, Voisin G, St-Pierre J, Perron P, Baillargeon J-P, et al. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics*. 2013;8(9):935-43.
76. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(11):2886-95.
77. Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C, et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes*. 2011;60(5):1528-34.
78. 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.
79. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.

80. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1487-95.
81. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017.
82. 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.
83. Crott JW. Effects of altered parental folate and one-carbon nutrient status on offspring growth and metabolism. *Mol Aspects Med*. 2017;53:28-35.
84. Selhub J, Rosenberg IH. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. *Biochimie*. 2016;126:71-8.
85. Arroyo-Jousse V, Garcia-Diaz DF, Codner E, Perez-Bravo F. Epigenetics in type 1 diabetes: TNFa gene promoter methylation status in Chilean patients with type 1 diabetes mellitus. *Br J Nutr*. 2016;116(11):1861-8.
86. 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.
87. Strufaldi MW, Puccini RF, Silverio OM, do Pinho Franco MC. Association of adipokines with cardiovascular risk factors in low birth weight children: a case-control study. *Eur J Pediatr*. 2013;172(1):71-6.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. 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.

8. TABLAS

Tabla 1. Resumen de los genes que se han asociado a rasgos fenotípicos maternos o fetales relacionados con la DT2 u obesidad mediante regulación por metilación diferencial del DNA.

Gen	Región	Rasgo asociado	Tejido
LEPR	Exón 1	Restricción de crecimiento intrauterino (IUGR) (88)	Placenta
TNFα	-2007 a -1731 respecto al TSS	Hiper glucemia materna (86)	Tejido adiposo perirrenal (ratas)
TNFα	Promotor -312 a -41	Niveles de homocisteína en pacientes con DT1(85)	Sangre periférica
MCP-1	Promotor -383 a -152	Niveles de MCP-1 en pacientes con DT2 (89) Niveles de homocisteína en ratones ateroscleróticos (90) Predominantemente metilada en controles delgados vs casos obesos (89)	Sangre periférica
IGF2	-2085 a -1914 respecto al TSS	Macrosomía Hiper glucemia materna (91) Hiperhomocisteínemia hiperproliferación de VSMCs (92)	Sangre de cordón umbilical VSMCs de cordón umbilical
H19	-2299 a -1826 respecto al TSS	Macrosomía Hiper glucemia materna (91)	Sangre de cordón umbilical
LINE-1		Macrosomía (93)	Sangre de cordón umbilical

Tabla 2. Estadística descriptiva de las pacientes estudiadas.

Características Maternas	Mediana [percentil 25 – percentil 75] N=172
Edad (años)	27 [23 – 33]
IMC pregestacional (Kg/m ²)	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

Se Muestra la mediana [percentil 25 - percentil 75], o bien frecuencias (%)

Tabla 3. Asociación de biomarcadores con niveles de glucosa e insulina en ayuno.

		Coefficiente β	IC 95%	P
Folato	glucosa	-0.048	-0.13 a 0.037	0.271
	insulina	-0.309	-0.50 a -0.12	0.001
Vitamina B12	glucosa	-0.000495	-0.002 a 0.001	0.635
	insulina	0.0046	0.0014 a 0.0078	0.005
Homocisteína	glucosa	-0.2724	-0.845 a 0.300	0.350
	insulina	1.16	0.3075 a 2.013	0.008

Tabla 4. Asociación de la glucemia al minuto 120' postcarga con los niveles de metilación global y en regiones reguladoras de genes seleccionados

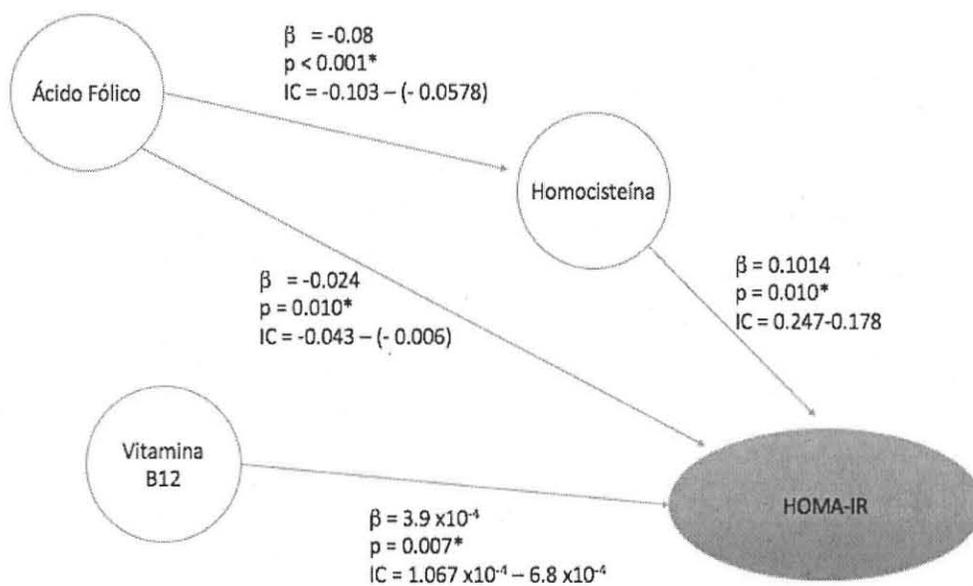
Región	Número de sitios CpGs	Coefficiente β	p-valor*
LEPR	20	-0.02	0.85
TNFα (-2007 a -1731)	6	-0.44	0.006
TNFα (-348 a -29)	11	0.04	0.75
MCP-1 (-383 a -152)	4	0.05	0.61
IGF2 (-2294 a -1731)	14	-0.04	0.69
H19 (-2238 a -1757)	29	0.08	0.49
LINE-1	3	0.04	0.66

*p-valor de las regresiones lineales, ajustadas por IMC pregestacional, edad materna, y paridad.

p-valores nominalmente significativos se muestran resaltados en negro.

9. FIGURAS

Figura 1.



Asociación de biomarcadores del metabolismo de folatos con resistencia a la insulina evaluado por HOMA-IR. En la figura se muestran los coeficientes β para la regresión lineal, p value e intervalos de confianza al 95%. Modelos ajustados por IMC pregestacional, edad materna, y paridad. HOMA: Homeostatic model assessment -IR: resistencia a la insulina.