



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Tesis de Maestría en Ciencias Químicas

Metilación en PPAR γ en el binomio madre-hija en casos de sobrepeso gestacional

Presentan

Alumna:

Biol. Ruth Elizabeth Casamadrid Vázquez

Tutores académicos

Dra. Araceli Amaya Chávez^a

Dr. Hugo Mendieta Zerón^b

- a. Facultad de Química
- b. Adscrito al Servicio de Terapia Intensiva, Hospital Materno Perinatal "Mónica Pretelini" del Estado de México y Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la UAEMex.
- c. Instituto Nacional de Cancerología INCAN



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 462/2013

Toluca, México, 17 de octubre de 2013

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
RUTH ELIZABETH CASAMADRID VAZQUEZ
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dra. Araceli Amaya Chávez
PRESIDENTE

Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benitez
SECRETARIO

Dr. Enrique Morales Avila
PRIMER VOCAL

Dr. Hugo Mendieta Zerón
SEGUNDO VOCAL

M. en C. Ma. del Carmen Colin Ferreira
TERCER VOCAL

Dra. Ma. Dolores Hernández Navarro
SUPLENTE

Dra. Miriam Verónica Flores Merino
SUPLENTE

FIRMA

(Handwritten signatures of the jury members)

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"

(Handwritten signature of Guadalupe Ofelia Santamaría González)
M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ
DIRECTORA



c.c.p.Archivo

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • quim@uaemex.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por dejarme vivir esta vida.

Agradezco a mis padres por haberme regalado la vida, por haberme dado la oportunidad de ser una persona de principios y valores, y en especial a mi padre por brindarme siempre su apoyo y llenarme de amor y por enseñarme que en esta vida nacimos para servir y ser humildes.

Agradezco a mis hijos Cristian y Jared que han sido el motor que me impulsa a seguirme superando y me hacen aprender lecciones todos los días.

Agradezco a mi esposo Ernesto ese ángel que cruzó mi vida para llenarla de felicidad y agradezco su paciencia, apoyo incondicional y su amor.

Agradezco a mis tutores por su gran apoyo en los momentos más duros de mi vida y el impulso que me dieron para terminar esta maestría.

Agradezco a todas las personas involucradas en este proyecto, así como al personal del Hospital Materno Perinatal Monica Pretelini, compañeros del Laboratorio de Biología Molecular y becarios que no solo pasaron a ser parte de mi formación sino también de mi vida.

A CONACYT por su apoyo en el financiamiento de mis estudios.

Índice

Índice de Figuras.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4
Abstract	6
Resumen	7
1. Marco Teórico	8
1.1. Sobrepeso y obesidad en el embarazo.....	8
1.2. Programación fetal.....	9
1.3. Epigenética	10
1.3.1. Metilación del ADN.....	11
1.3.1.1. Bases moleculares de la metilación	11
1.3.1.2. Regulación de la transcripción por metilación	14
1.3.1.3. Modificaciones epigenéticas en el desarrollo embrionario.....	15
1.4. Receptor activado por el proliferador peroxisoma gamma (PPAR γ).....	18
1.5. PPAR γ y Adipogénesis	19
2. Antecedentes	21
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos.....	25
6. Metodología.....	26
6.1. Aspectos éticos.....	26
6.2. Selección de los grupos de estudio	26
6.3. Captación de pacientes	27
6.4. Orientación nutricional de acuerdo a las características de las participantes.....	28
6.5. Valoración de la eficiencia de la orientación nutricional.....	28
6.6. Extracción de leucocitos	29
6.8. Modificación del ADN con Bisulfito de sodio	30
6.9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR- RT).....	30
Montaje de PCR-RT	31

Electroforesis	33
Definición de las variables de estudio	33
7. Acuse de artículo recibido	35
8. Bibliografía	59
9. Anexos	67
9.1. Anexo 1. Carta de Consentimiento informado.....	67
9.2. Anexo 2	69
9.3. Anexo 3	70
9.4. Anexo 4 Cuantificación de ADN (espectro)	71
9.5. Anexo 5	72
9.6 Anexo 6	73
9.7 Anexo 7	75

Índice de Figuras

Figura 1 Programación perinatal de la dieta (Tomado con permiso de: Mendieta Zerón H, 2008 (18)).....	9
Figura 2 Participación de la metilación del ADN en procesos celulares normales y en diferentes procesos fisiológicos (33).	11
Figura 3 Metilación de ADN Conversión de citosina (C) en 5-metilcitosina (5mC), regulada por la actividad de las ADN-Metiltransferasas (Dnmts) (34). .	12
Figura 4 Metilación de mantenimiento y <i>de novo</i> . Los rectángulos indican el sustrato de secuencias (generalmente CpGs), y los círculos representan los grupos metilo de las citosinas (36).....	13
Figura 5 Estructura Química de S-Adenosil-L-Metionina (SAM) La alta energía del ion sulfonio de SAM, promueve el ataque nucleofílico de los carbonos unidos a él, facilitando la transferencia del grupo metilo (indicado por el rectángulo) (38).....	13
Figura 6 Rutas de regulación y desregulación epigenéticas enfermedades metabólicas (SM: síndrome metabólico, DM2: diabetes mellitus tipo 2, DM1: diabetes mellitus tipo 1) (36).	16
Figura 7 Establecimiento de los patrones de metilación durante el desarrollo. (46)	17
Figura 8 Esquema común de la organización estructural de los receptores nucleares. Se presenta una estructura organizada en seis dominios (A-F) (59).....	19
Figura 9 Localización del gen que codifica a PPAR γ en humanos. Posición 3p25 (Extraído de Genetics Home Reference, National Institutes of Health) ...	19
Figura 10 Control transcripcional de la adipogénesis.....	20
Figura 11 Muestra equipo Magna Pure, Roche	29

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Idioma	
	Inglés	Español
5-meC	5-Methyl Cytosine	5-Metil Citosina
ADD1	Alpha-adducin	Alpha aducin
AHEI-P	Alternate Healthy Eating Index- Pregnancy	Índice de Alimentación Saludable Alternativo para Embarazo
C[Beta]S	Cistationina beta Sintetasa	Cistationina beta sintetasa
C\EBP α	CCAAT-enhancer-binding proteins	Proteínas de unión mejoradas CCAAT
CGI(s)	CG Islands	Islas Citocina Guanina
CpG(s)	CpG island	Islas CpG
DM2	-	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxiribonucleico
DNMT	DNA methyltransferase	DNA Metiltransferasa
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ácido Etilendiaminotetraacético
FOLH1	Folate Hydrolase (Prostate-Specific Membrane Antigen) 1	Folato hidrolasa (antígeno prostático específico de membrana) 1
FOXC2	Forkhead box protein C2	Forkhead box proteína C2
GR	Glucocorticoid Receptor	Receptor de glucocorticoides
H19	H19 gene	Gen H19
HDAC	Histone Deacetylases	Histonas de acetilasas
HEI	Healthy Eating Index	Índice de Alimentación Saludable
HMPMP	-	Hospital Materno Perinatal Monica Pretelini
HMT	Histone Methyltransferases	Metiltransferasas de Histonas
HSD2	Hydroxysteroid Dehydrogenase type 2	Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
IGFBP3	Insulin-like Growth Factor-binding Protein 3	Factor de crecimiento insulínico tipo 3
IMC	-	Índice de Masa Corporal
IOM	Institute of Medicine	Instituto de Medicina
LUMA	LUMinometric Methylation Assay	Ensayo Luminométrico de metilación
MBD	Methyl-CpG-binding domain	Proteína con dominio de unión a metil-CpG
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa reductasa
OMS	-	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline	Tampón fosfato salino

Abreviatura	Idioma	
	Ingles	Español
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma
PPARGC1A	Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma, coactivator 1 alpha	Coactivador 1 alpha de receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma
RFC1	Replication factor C subunit 1	Factor de replicación C Subunidad 1
RNA	Ribonucleic Acid	Ácido Ribonucléico
SAM	S-Adenosyl Methionine	S-Adenosil metionina
SHMT	Serine Hydroxymethyltransferase	Serina hidroximetil transferasa
SM	-	Síndrome Metabólico
SNC	-	Sistema Nervioso Central
SREBP1c	Sterol Response Element Binding Protein-1c	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
Tfam	Mitochondrial transcription factor A	Factor transcripcional mitocondrial
TZDs	Thiazolidinedione	Tiazolidinedionas
ZNT5	Zinc transporter 5	Transportador de Zinc 5

Abstract

Objective: Obesity is a global health problem, with transgenerational affection by genetic and epigenetic mechanisms. It has been hypothesized that a mother who suffers from obesity before and during pregnancy, causes adaptations in the epigenetic mechanisms that promote the development of obesity in children. Our main objective was to examine whether the rate of methylation is correlated with anthropometric and biochemical variables. **Study Design:** Two groups were conformed, a) normal weight and b) overweight-obese pregnant women. In each clinical consult the Healthy Eating Index (HEI) was applied. We evaluated the DNA methylation index in the M3 region of the promoter of the gene encoding the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). **Results:** The percentage of pregnant women who kept an ideal weight was 36% in the normal weight and 42% in the overweight group. According to the HEI, there was adherence to nutritional counseling in 38% for the normal weight group and 25% for the overweight group. All samples were found to be unmethylated in both groups. **Conclusion:** Under a diet supervision program there was no any case of M3 methylated region of the PPAR γ gene, suggesting that a methionine rich gestational diet with foods containing folic acid and B12 vitamin prevent M3 to be methylated, a second hypothesis is that this region should not be useful to evaluate epigenetic changes based on methyl groups when evaluating the effect of a diet intervention program.

Key words: diet; epigenetic; obesity; PPAR γ ; pregnancy.

Resumen

La obesidad es un problema de salud global, con afección transgeneracional por mecanismos genéticos y epigenéticos. Se ha planteado la hipótesis de que una madre que sufre de obesidad antes y durante el embarazo, provoca adaptaciones en los mecanismos epigenéticos que promuevan el desarrollo de la obesidad en los niños. El principal objetivo de este trabajo fue examinar si la tasa de metilación se correlaciona con las variables antropométricas y bioquímicas. Diseño del estudio: Este estudio fue de tipo cohorte pareado. Se formaron dos grupos: a) de peso normal y b) mujeres embarazadas con sobrepeso-obesidad. En cada consulta clínica se aplicó el Índice de Alimentación Saludable (HEI). Se evaluó el índice de metilación del ADN en la región M3 del promotor del gen que codifica el receptor proliferador peroxisomal activado gamma (PPAR γ). Resultados: El porcentaje de mujeres embarazadas que mantiene un peso ideal fue de 36% en peso normal y el 42% en el grupo de sobrepeso. De acuerdo con la IES, no había adherencia al asesoramiento nutricional en 38% para el grupo de peso normal y 25% para el grupo con sobrepeso. Todas las muestras se encontraron para M3 no metiladas en ambos grupos. Conclusión: La supervisión de un programa de dieta no arrojó ningún caso metilado en la región M3 del gen PPAR γ , lo que sugiere que una dieta rica en metionina (aminoácido esencial donador de grupos metilo) durante la gestación, con los alimentos que contienen ácido fólico y vitamina B12 previene la metilación de M3, una segunda hipótesis es que esta región no debe ser útil para evaluar los cambios epigenéticos basados en grupos metilados evaluar el efecto de una intervención de la dieta en un programa.

Palabras clave: dieta, epigenética, obesidad, PPAR γ , embarazo.

1. Marco Teórico

1.1. Sobrepeso y obesidad en el embarazo

La obesidad en el embarazo tiene efectos deletéreos sobre la salud materna al aumentar el riesgo de hipertensión inducida por el embarazo (1,2). Más aún, se ha sugerido que a mayor adiposidad de la madre habrá influencia en la programación de vías metabólicas en el feto que lo predispondrán para patologías cardiovasculares y diabetes (3).

Las ganancias de peso sugeridas y las tasas recomendadas de ganancia ponderal se dan en función del índice de masa corporal (IMC) de acuerdo a la siguiente tabla (4):

IMC (kg/m ²)	Ganancia de peso sugerida (Kg)	Tasa recomendada de ganancia ponderal (Kg/semana)
<18.5	12.7-18.14	0.45-0.58
18.5-24.9	11.33-15.87	0.36-0.45
25-29.9	6.80-11.33	0.22-0.31
>30	4.98-9.07	0.18-0.27

Tabla 1 Ganancia de peso sugerida de acuerdo al índice de masa corporal (5).

Se tienen varias escalas para evaluar la dieta en el período gestacional, dos de ellas son: el *Diet Quality Index* (6) y el *Alternate Healthy Eating Index for Pregnancy* (AHEI-P) (7). Las madres que tienen los mayores puntajes en la escala AHEI-P tienen menor riesgo de desarrollar restricción del crecimiento fetal en relación al peso (8). En todo caso es importante aplicar un cuestionario de frecuencia de comida (FFQ) (9).

Algunos autores clasifican la ganancia ponderal neta (que es el peso inmediato posterior al parto o cesárea menos el peso pregestacional) como: pobre (de 0 a 6.80 kg), normal-baja (de 7.25 a 11.33 kg), normal alta (de 11.79 a 15.87 kg) y excesiva (16.32 kg o más) (10).

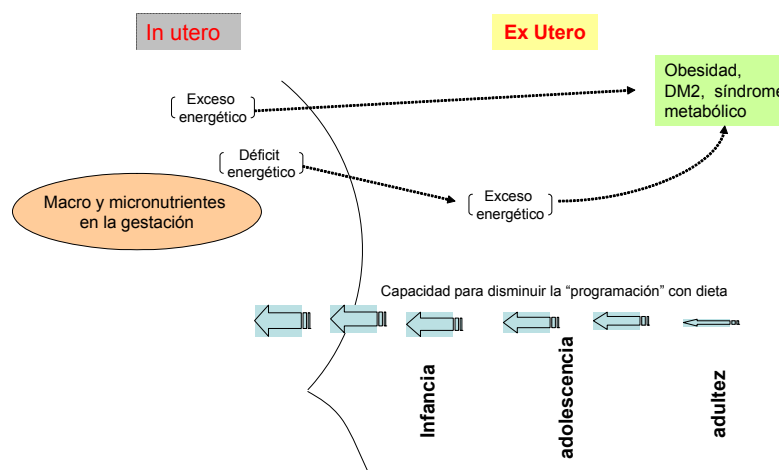
Un IMC mayor a 30 unidades incrementa el riesgo para malformaciones cardíacas (11). Las mujeres embarazadas con obesidad tienen mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas como: patologías cardiovasculares, DM2, osteoartritis y algunos tipos de cáncer (12), diabetes gestacional y enfermedad tromboembólica; además existe un mayor riesgo de aborto, muerte fetal, macrosomía, distocia de hombro y obesidad infantil (13,14). Los datos más consistentes de asociación con malformaciones son los de espina bífida y anencefalia (15,16).

En el año 2009 el Comité del Instituto de Medicina (IOM) para reevaluar las Guías de Ganancia de Peso Gestacional concluyó que había información insuficiente para integrar unas guías de ganancia de peso por severidad de obesidad. Por lo tanto, el comité recomendó un solo rango de 5-9 kg a término para todas las mujeres obesas (5).

1.2. Programación fetal

Se ha reconocido que la programación fetal es una clave determinante para el fenotipo y enfermedades del adulto, postulándose que, una adecuada alimentación durante la gestación y la etapa perinatal es una estrategia efectiva para prevenir enfermedades de la etapa adulta (17).

Figura 1 Programación perinatal de la dieta (Tomado con permiso de: Mendieta Zerón H, 2008 (18)).



DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

Los estudios de cohorte de la población holandesa sometida a hambruna sugieren que el primer trimestre del embarazo representa un periodo crítico de vulnerabilidad para el desarrollo subsecuente de obesidad (19). En esta misma cohorte se demostró que los hijos de madres sometidas a desnutrición durante la gestación tienen un riesgo tres veces mayor de enfermedad coronaria (20) un perfil lipídico más aterogénico (21) y obesidad (17,22). Esto confirma la evidencia de investigación en animales donde se establece que los factores pre-implantación y pre-concepción desempeñan un rol muy importante en la salud del adulto (23).

Tanto en rata como en humanos, la diabetes y obesidad gestacionales están asociadas con obesidad en la descendencia (24,25). Con relación a lo anterior se sabe que tanto la hiperinsulinemia como el déficit de insulina, así como también la sobrealimentación perinatal predisponen al desarrollo de obesidad y diabetes en la edad adulta (26,27).

Actualmente existe un gran interés en explicar el potencial de la nutrición prenatal sobre la influencia a largo plazo sobre la adiposidad y trastornos metabólicos asociados que se han corroborado en humanos (19,20). Hales y Barker (28) acuñaron el término “thrifty phenotype” (fenotipo ahorrador), relacionado a un fenotipo desnutrido atribuido a alteraciones nutricionales durante la gestación y lactancia. Conocemos ahora que los tejidos y órganos son sometidos a cambios genéticos y epigenéticos por medio de los ciclos de proliferación celular, diferenciación y apoptosis (29).

1.3. Epigenética

El término epigenética fue introducido por primera vez en 1942 por Conrad Waddington y se definió como las interacciones causales entre los genes y sus productos que permiten la expresión fenotípica (30). El término se ha redefinido y en consenso se denomina como los cambios heredables en el fenotipo debido a los procesos que surgen independientes de la secuencia primaria del ADN (31). Los mecanismos epigenéticos son parámetros genéticos flexibles que pueden cambiar la función genómica ante las influencias externas, además proveen un mecanismo que permite la propagación estable de los estados de la actividad génica de una generación de células a la próxima. La información epigenética se

puede transmitir principalmente de dos formas: la primera es la metilación del ADN y la segunda es mediante cambios estructurales en las proteínas de la cromatina, generalmente en forma de modificaciones en las colas de las histonas (32).

1.3.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN se da por la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina, formando 5-metilcitosina (5-meC). La metilación del ADN regula funciones celulares importantes tales como: la expresión en diferente tipos de células, la impronta genómica, el silenciamiento de los genes, la inactivación del cromosoma X, la reprogramación transferida al núcleo y algunos elementos de carcinogénesis(33) (Figura 2).

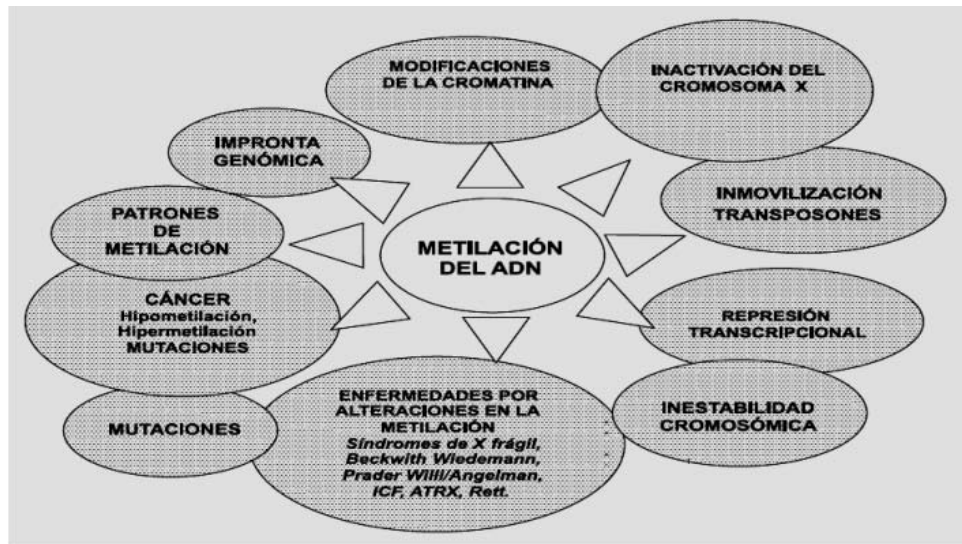


Figura 2 Participación de la metilación del ADN en procesos celulares normales y en diferentes procesos fisiológicos (33).

1.3.1.1. Bases moleculares de la metilación

A continuación se presentan las estructuras químicas de la citosina y 5-metilcitosina, en el contexto de la metilación.

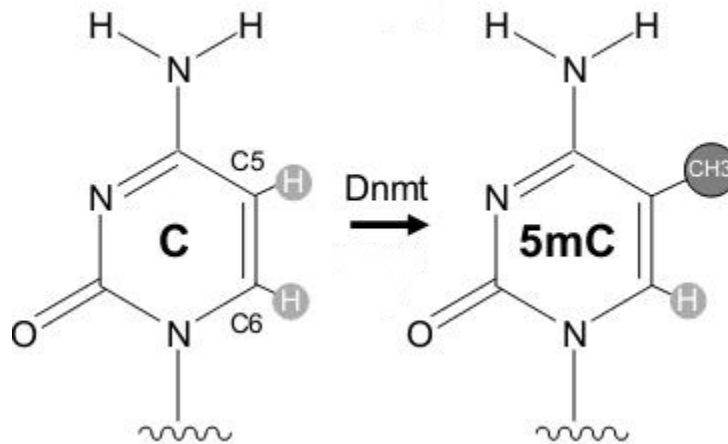


Figura 3 Metilación de ADN Conversión de citosina (C) en 5-metilcitosina (5mC), regulada por la actividad de las ADN-Metiltransferasas (Dnmts) (34).

La reacción de metilación del ADN en mamíferos es catalizada por DNA-metiltransferasas. Dependiendo de su función las DNMT se clasifican en enzimas de mantenimiento de la metilación y de metilación *de novo* (Figura 4). Los tipos de DNA-metiltransferasas son: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT2. En mamíferos la DNMT1 lleva a cabo la metilación de mantenimiento en los tejidos, ya que esta enzima reconoce preferencialmente sitios hemimetilados. Las enzimas DNMT3A y DNMT3B llevan a cabo la metilación *de novo*, aunque en algunos tejidos el mantenimiento de la metilación lo llevan a cabo estas dos últimas enzimas. La función de la enzima DNMT2 aún no ha sido completamente descrita, aunque se ha sugerido que es una RNA-metiltransferasa (35).

Las modificaciones epigenéticas se presentan en tres formas: Impronta genómica de los patrones de metilación, factores intrauterinos, y ambiente extrauterino.

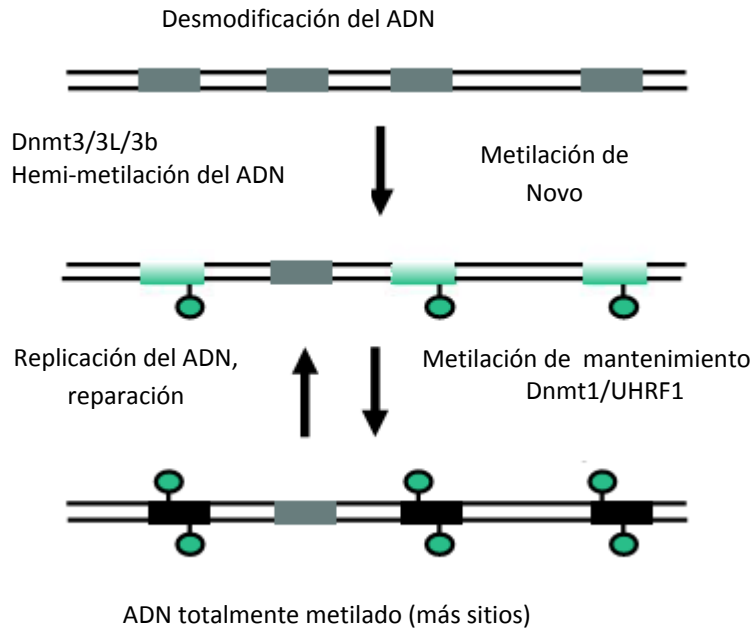


Figura 4 Metilación de mantenimiento y *de novo*. Los rectángulos indican el sustrato de secuencias (generalmente CpGs), y los círculos representan los grupos metilo de las citosinas (36)

El principal donador de grupo metilo que interviene en los procesos de metilación es el cofactor S-Adenosil-L-metionina (SAM) (Figura 5), la cual es una molécula precursora esencial presente en todos los tejidos de los organismos vivos y se sintetiza únicamente a partir de la metionina, colina y folatos adquiridos en la dieta (37).

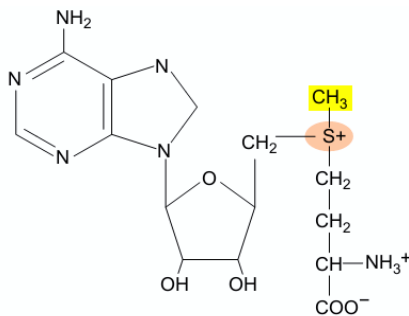


Figura 5 Estructura Química de S-Adenosil-L-Metionina (SAM) La alta energía del ion sulfonio de SAM, promueve el ataque nucleofílico de los carbonos unidos a él, facilitando la transferencia del grupo metilo (indicado por el rectángulo) (38).

La metilación ocurre generalmente en citosinas localizadas en dinucleótidos CpG, algunas de ellas se encuentran agrupadas en regiones llamadas islas CpG (CGIs, por las siglas en inglés de CpG Islands). Las CGIs fueron definidas en 1987 como secuencias de al menos 200 pares de bases (pb), que deben tener un cociente C/G de al menos 0.5 y un contenido de CpGs mayor a 0.6. Sin embargo esta definición se ha modificado a lo largo de los años y existen varios autores que han propuesto varias definiciones (39,40). Se han identificado cerca de 38,000 CGIs en el genoma humano, alrededor del 37% de éstas se localizan en las regiones 5' de los genes, también conocidas como promotores y en los primeros dos exones aunque también se sabe que existen 5- meC en regiones 3' o en regiones intergénicas (41).

Las CGIs generalmente se encuentran desmetiladas; esto les permite protegerse de sufrir desaminaciones espontáneas y mutaciones. Las excepciones corresponden a las CGI que se encuentran en las regiones promotoras de los genes improntados, genes sujetos a la inactivación del cromosoma X y transposones. La mayor parte de las CGI se encuentran traslapadas con el sitio de inicio de la transcripción y están involucradas en la regulación de la expresión génica, se ha propuesto que casi la mitad de las 5'CGI participan en la regulación de la transcripción. Aproximadamente 70% de los genes conocidos tienen una isla CpG en un fragmento de 2 kb a 1 kb del sitio de inicio de la transcripción.

1.3.1.2. Regulación de la transcripción por metilación

En mamíferos la metilación del DNA en regiones promotoras de genes está asociada con represión transcripcional, esto ocurre ya que el grupo metilo de la 5meC se extiende en el surco del DNA y por efectos estéricos inhibe la unión de factores de transcripción (TFs) a sus respectivos sitios de reconocimiento con contenido de CpG. Otro mecanismo de represión transcripcional por metilación del DNA involucra a un grupo de proteínas denominadas proteínas de unión a sitios metilados (MBD por sus siglas en inglés). Además las proteínas MBD reclutan enzimas cuya función es la modificación covalente de histonas, como

desacetilasas de histona (HDAC), metiltransferasas de histonas (HMT) así como enzimas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP, llevando a cabo modificaciones en el complejo de histonas y como resultado la estructura de la cromatina se compacta silenciando la transcripción de genes (42)

1.3.1.3. Modificaciones epigenéticas en el desarrollo embrionario

El patrón de metilación del ADN se establece a través de las diferentes fases del desarrollo de un organismo, esto como una medida de regulación y desregulación en las rutas epigenéticas; de manera general, se pueden dividir en tres: Impronta genómica, ambiente intrauterino y ambiente extrauterino (Figura 6). Existen dos ocasiones durante el desarrollo humano en donde se borran por completo dichos patrones. Una de estas etapas ocurre durante la gametogénesis y la segunda, durante el estadio 8 de la formación del blastocisto en la implantación embrionaria (43) Como lo muestra la Figura 7, los patrones de metilación son diferentes durante el desarrollo humano, aquí se muestra el grado de metilación en cada etapa del desarrollo embrionario, en la etapa adulta, las células somáticas, el patrón de metilación se mantiene.

Los cambios epigenéticos que pueden ser inducidos por las etapas en el desarrollo de un organismo vivo. El primero puede darse por la herencia paterna, el segundo en el ambiente intrauterino y el tercero por las modificaciones referentes después del nacimiento, en un ambiente extrauterino, provocando un cambio dinámico epigenético que provoca la modificación de la cromatina hacia la expresión fenotípica de distintas enfermedades, tales como: diabetes mellitus tipo 1 y 2 (DM1 , DM2), síndrome metabólico (SM) (36).

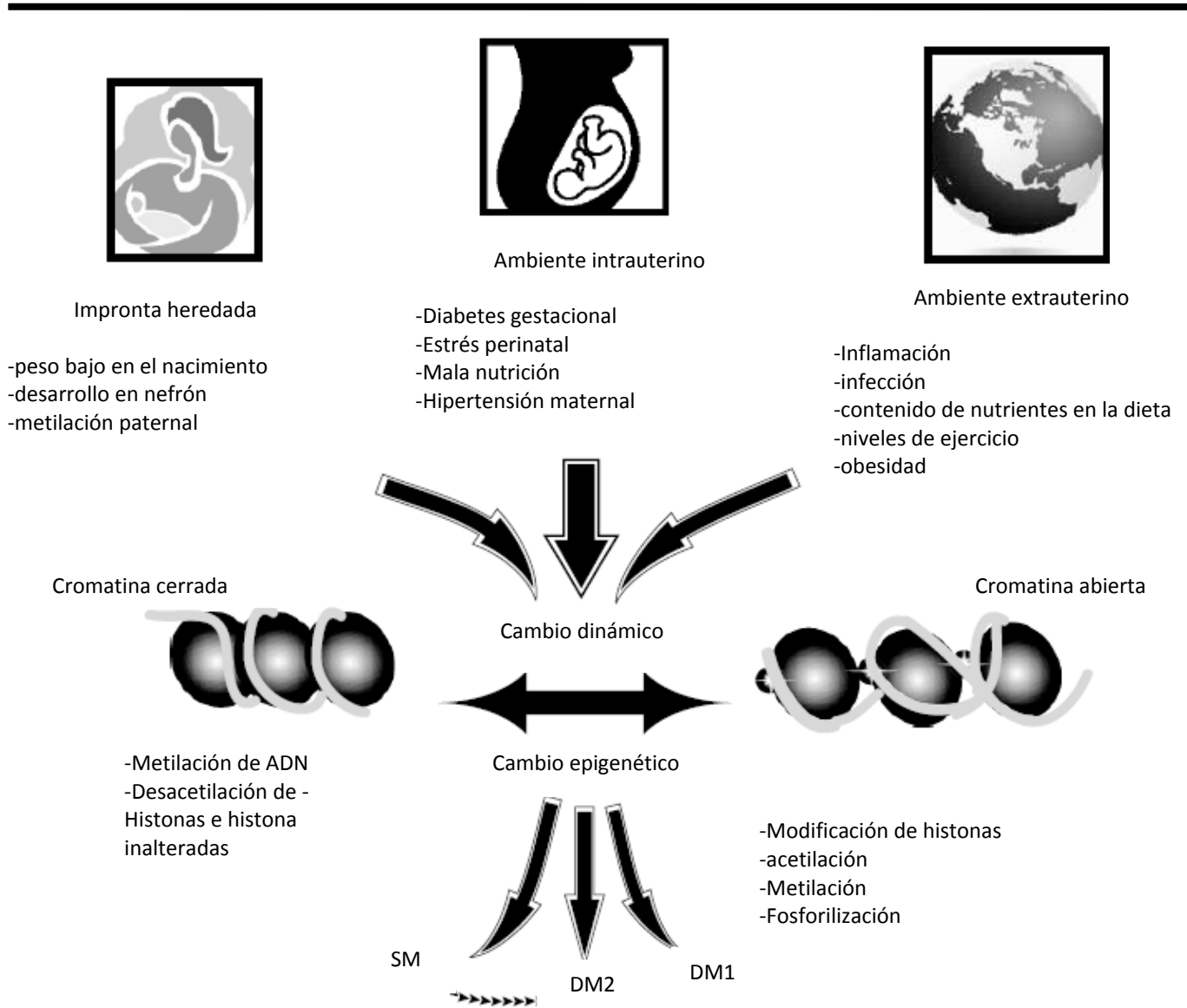


Figura 6 Rutas de regulación y desregulación epigenéticas enfermedades metabólicas (SM: síndrome metabólico, DM2: diabetes mellitus tipo 2, DM1: diabetes mellitus tipo 1) (36).

Durante el desarrollo embrionario, el genoma se somete a una amplia desmetilación seguida de remetilación, y el estado apropiado de metilación del ADN debe ser mantenido durante los ciclos de los pasos rápidos de proliferación celular (44). Las donaciones desbalanceadas de grupos metilo ocasionadas por la deficiencia nutricional de donadores durante el desarrollo embrionario, puede

afectar irreversiblemente la metilación del ADN (45). Un mecanismo propuesto incluye los efectos de fuentes dietéticas de metilo y de cofactores, como la vitamina B12 y el ácido fólico (27).

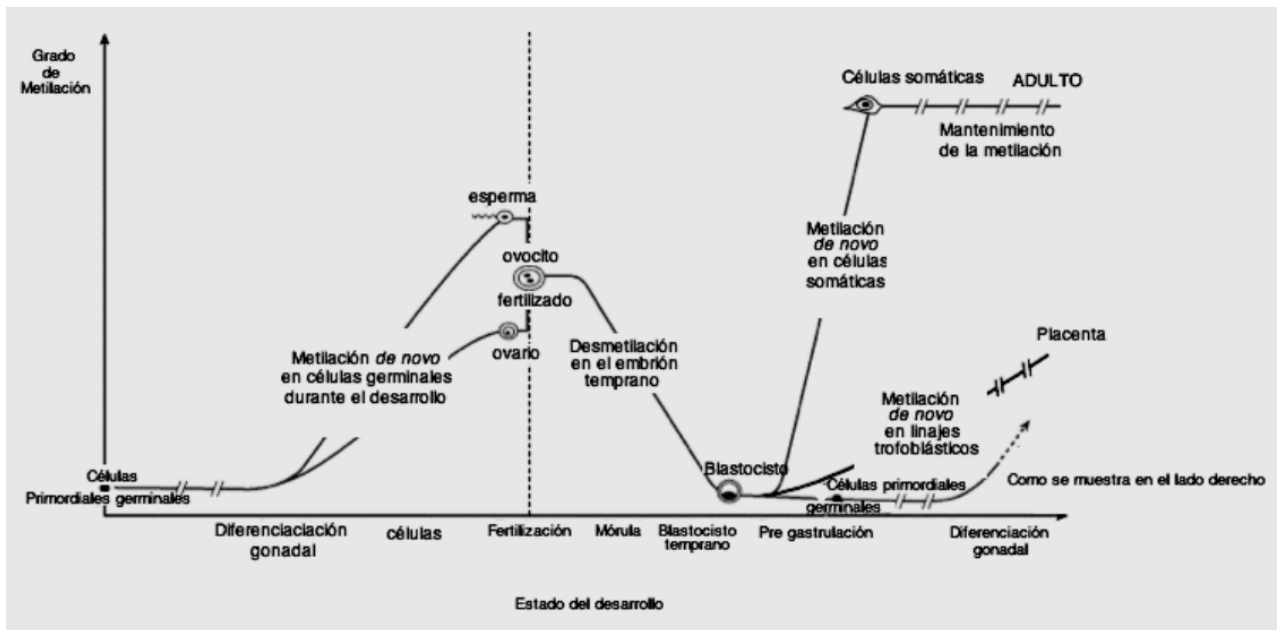


Figura 7 Establecimiento de los patrones de metilación durante el desarrollo.
(46)

Datos epidemiológicos y estudios experimentales en animales sugieren que las adaptaciones epigenéticas, debidas a la nutrición fetal y postnatal temprana, persisten y están presentes en adultos aún en ausencia del estímulo de estrés que las hayan iniciado (46). Esto puede ser explicado, en parte, porque los períodos tempranos de la vida corresponden en gran parte al período de la diferenciación neuronal y de la maduración del sistema nervioso central (SNC) por lo que la nutrición perinatal tiene una influencia crítica en el desarrollo y la regulación de vías y redes involucradas en la regulación de la homeostasis energética (47).

Por lo tanto, se han sugerido que los extremos en disponibilidad nutricional y distintos factores ambientales influyen en las modificaciones epigenéticas de la cromatina y aumentan la susceptibilidad a patrones epigenéticos alterados y más tarde a trastornos metabólicos y enfermedades crónicas de adultos (48). Como

ejemplo de esto, se pueden encontrar modificaciones específicas en la cromatina, que podría estar asociada a la pandemia mundial de la diabetes tipo 2 (50). Un modelo que apoya esta hipótesis es el de la restricción de proteína dietética en ratas preñadas, asociada a la hipometilación del receptor de glucocorticoides y de PPAR γ (51). PPAR γ está asociado con a la adipogénesis; se expresa en la placenta, en un desarrollo placentario anormal y se asocia con anomalías del crecimiento fetal y muy a menudo con la obesidad (49).

1.4. Receptor activado por el proliferador peroxisoma gamma (PPAR γ)

PPAR γ es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares hormonales (53). Los receptores nucleares hormonales se localizan en los núcleos celulares y actúan como factores de transcripción en forma de homodímeros o heterodímeros (54).

Existen cuatro isoformas de PPAR γ : PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 y PPAR γ 4; las isoformas PPAR γ 1, PPAR γ 3 y PPAR γ 4 codifican a la misma proteína, pero difieren en su estructura de activación. El cDNA de PPAR γ 2 codifica 30 aminoácidos adicionales N-terminales al primer codón ATG de PPAR γ 1 (54).

A pesar de que PPAR γ 1 y γ 2 se expresan predominantemente en los adipocitos (55,56), PPAR γ 1 también se encuentra en: mamas, colon, células vasculares, y en cantidades pequeñas, en hígado y corazón (57); PPAR γ 3 y PPAR γ 4 se han identificado en macrófagos y PPAR γ 3 también en colon (54)

El dominio A/B de PPAR γ presenta activación transcripcional independiente de ligandos (Figura 8). Sin embargo, la fosforilación de una serina en el dominio A/B inhibe su actividad transcripcional. Cuando se protege de fosforilación dicha serina, el receptor ya no puede ser inhibido, lo cual indica que este es el único sitio de fosforilación del receptor. Un factor de fosforilación de PPAR γ es la insulina (58).

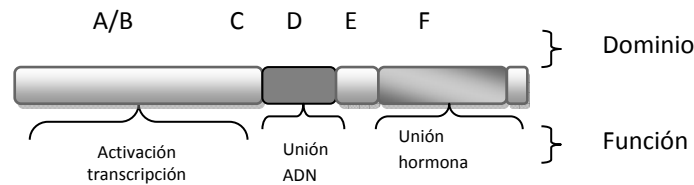


Figura 8 Esquema común de la organización estructural de los receptores nucleares. Se presenta una estructura organizada en seis dominios (A-F) (59).

El gen que codifica a PPAR γ en humanos, se encuentra en el cromosoma 3, posición 3p25 (Figura 9).

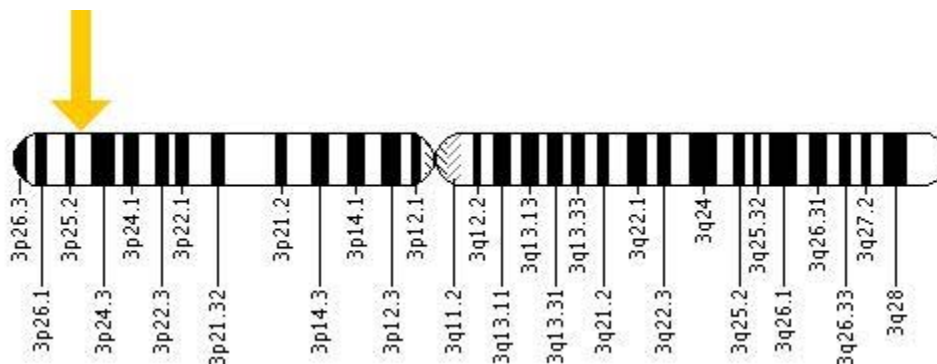


Figura 9 Localización del gen que codifica a PPAR γ en humanos. Posición 3p25 (Extraído de Genetics Home Reference, National Institutes of Health)

El promotor de PPAR γ 1 comprende una sección de 3kb, antes del sitio de inicio de transcripción, y el promotor de PPAR γ 2 se extiende hasta 1kb antes del sitio de transcripción, y contiene elementos similares TATA en la posición -68, respecto al sitio de iniciación de la transcripción, además su análisis de secuenciación identificó un sitio de unión de la proteína C/BEP parecido al CAAT en la posición -56 y un sitio perfecto AP-1 en el sitio +10 (57).

1.5. PPAR γ y Adipogénesis

PPAR γ es un regulador maestro de la adipogénesis (61); Spiegelman demostró que durante la adipogénesis se produce una cantidad masiva de PPAR γ (59). Posteriormente se observó que la expresión ectópica de PPAR γ en los

fibroblastos, preadipocitos y mioblastos, resulta en adipogénesis (60,61). Sin embargo, el descubrimiento de su papel en la adipogénesis, se dio al observar que C/EBP α no puede inducir adipogénesis en ausencia de PPAR γ , mientras que PPAR γ si puede inducir adipogénesis en ausencia de C/EBP α (62). Después de la diferenciación de preadipocitos, la diferenciación es promovida por varias familias de factores de transcripción, inicialmente se expresa las proteínas promotoras de unión CCAAT (C/EBP) β y C/EBP δ , seguidas de PPAR γ el cual activa a C/EBP α provoca una retroalimentación positiva sobre PPAR γ para mantener la diferenciación. Los esteroides de respuesta 1c (SREBP1c) que en unión a un factor de diferenciación (ADD1) aumentan la actividad transcripcional de PPAR γ . Estos factores inducen la expresión de genes que caracterizan al fenotipo de los adipocitos diferenciados. FOXC2 también activa los genes que estimulan la diferenciación de adipocitos(Figura 10) (66).

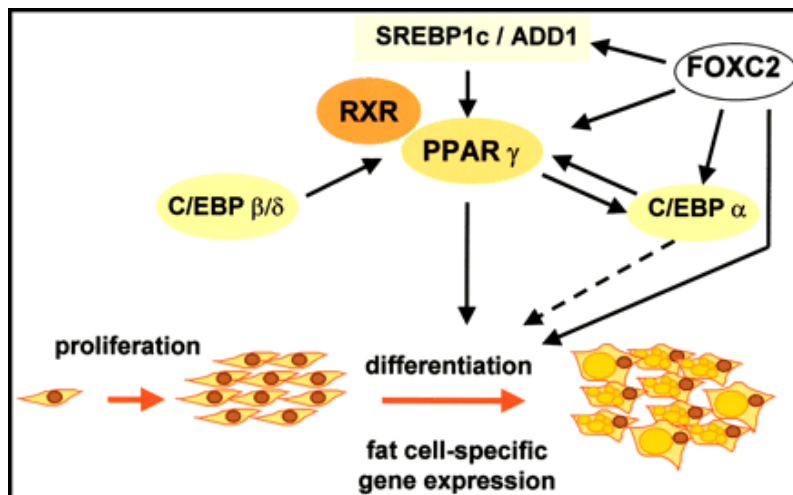


Figura 10 Control transcripcional de la adipogénesis.

El sitio clásico del heterodímero PPAR γ /RXR en los adipocitos es el gen que codifica a la proteína aP2, que es ligante de ácidos grasos (64).

Los ligandos de PPAR γ incluyen ácidos grasos, ácidos eicosanoides y las tiazolidinedionas (TZDs), que son utilizadas como antidiabéticos y que también mejoran la sensibilidad a la insulina tanto en humanos como en animales (68). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descubierto ningún compuesto que pueda denominarse “ligando natural” de PPAR γ (53).

2. Antecedentes

Drake, McPherson, et al., 2012, descubrieron que los índices de metilación de genes clave del crecimiento fetal y la acción glucocorticoidea presentan asociaciones con variables antropométricas en la edad temprana y adulta, en la descendencia de mujeres con dietas desbalanceadas durante el embarazo. Este estudio se realizó sobre 34 individuos de 40 años de edad, cuyas madres pertenecieron a la cohorte de Motherwell, en el cual las madres ingirieron una dieta desbalanceada durante el embarazo. En estudios anteriores, ya se había vinculado este factor, con la elevación de los niveles de presión arterial y cortisol. Se determinaron los índices de metilación de: 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 [HSD2], Receptor glucocorticoide [GR] y factor de crecimiento insulínico tipo 2 [IGF2]; por pirosecuenciación de ADN de leucocitos. Las variables antropométricas neonatales, se correlacionaron con la metilación de CpGs específicos en el promotor de HSD2 y en la región H19 ICR del IGF2. También se encontró una asociación positiva entre el incremento de la adiposidad y la presión sanguínea en la edad adulta, con la metilación de CpGs en el interior de HSD2, GR y H19 ICR. Finalmente, se encontró que a un mayor desbalance de la dieta durante el embarazo, corresponde a una mayor metilación en el exon 1F del GR. La información obtenida indica que la dieta materna durante el embarazo, así como el crecimiento fetal vinculados persistentemente de forma epigenética con diversos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en humanos.

Grados Valderrama, Cabrera Epiqueñ y Díaz Herrera, 2003, determinaron que el peso del recién nacido, se puede relacionar de forma lineal a las variables de IMC pregestacional y ganancia de peso durante el embarazo. Este fue un estudio retrospectivo, llevado a cabo en mujeres cuyos partos fueron atendidos en el Hospital Nacional Cayetano Heredia en Lima, Perú. Se seleccionaron 1,016 mujeres, que fueron separadas en 4 grupos según su IMC (infrapeso, normopeso, sobrepeso y obesidad). Realizaron un modelo de regresión, incluyendo las variables de IMC pregestacional, ganancia de peso durante el embarazo, edad de la madre y paridad, encontrando que el mejor ajuste se obtiene al considerar sólo el IMC pregestacional y la ganancia de peso de la madre.

Jill A. McKay, Alexandra Groom, Catherine Potter y colaboradores 2012 explican como la variación de los patrones de metilación entre individuos al nacer puede ser explicada por factores ambientales, genéticos y estocásticos. Este estudio investiga algunas causas genéticas y no genéticas de la variación de la metilación de ADN en infantes humanos. Este estudio se enfoca en aspectos relacionados al metabolismo de folatos, debido a su importancia como donador de grupos metilo para la metilación. Se cuantificó la metilación global (LUMA) y específica (en los genes: IGF2, ZNT5 e IGFBP3), por pirosecuenciación en 430 infantes. Se analizaron 7 polimorfismos de 6 genes (MTHFR, MTRR, FOLH1, C[beta] S, RFC1 y SHMT), involucrados en la absorción y metabolismo de folatos, para madres e infantes. Se midieron las concentraciones de folato en hemoglobina y vitamina B12 en suero, como indicativos del estatus de vitaminas. Se relacionaron los patrones de metilación con las covariantes de: sexo, duración de la gestación, folato en hemoglobina para la madre y el infante, Vitamina B12 en suero de la madre y el infante, edad de la madre, madre fumadora y genotipo. La duración del embarazo se correlacionó positivamente con la metilación del IGF2 e inversamente con la metilación del ZNT5. La metilación del locus IGFBP3 se correlaciono inversamente con la concentración de vitamina B12 en suero del infante, mientras que la metilación global de ADN se correlaciona inversamente con la concentración de vitamina B12 de la madre. El análisis de las variantes genéticas más comunes de los genes de la ruta de folato resalto varias asociaciones, incluyendo: MTRR 66G en el infante para el genotipo A con la metilación global y el MTHFR 677C para el genotipo T con la metilación del IGF2. Esta información apoya la hipótesis de que los factores ambientales y genéticos involucrados en el metabolismo de un carbono (folatos) influyen sobre la metilación del ADN en infantes. Estos descubrimientos resaltan la importancia del estatus de la vitamina B12, el genotipo de MTRR en los infantes y el genotipo de MTHFR las madres, como factores influyentes en el suministro de donadores de grupo metilo para la metilación del ADN. La duración gestacional también se presenta como un factor importante para los patrones de metilación del ADN de los infantes.

Gemma, Sookoian, et al., 2009, estudiaron la metilación de los promotores de los genes: PPAR γ , coactivador 1 α de PPAR γ (PPARGC1A) y el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam), en dos grupos de mujeres embarazadas y sus neonatos, de acuerdo a dos categorías de crecimiento fetal anormal (pequeños y grandes, en relación a su edad gestacional). Posteriormente se descubrió una asociación entre la variante rs9930506 del gen FTO y los patrones de metilación de los genes antes mencionados.

El promotor de PPAR γ presentó índices de metilación cercanos al 100% en todas las muestras. No se encontró asociación entre la metilación del promotor de los genes y las características del neonato. De los promotores estudiados, sólo el de PPARGC1A tuvo una correlación positiva con el IMC materno (r de Pearson = 0.41, $P = 0.0007$). Dado lo anterior este estudio sugiere que el promotor de PPARGC1A desempeña un papel aun no descubierto en la metilación de la programación metabólica.

3. Justificación

La obesidad es reconocida como un problema de salud mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2012). En México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el 2006 (69,70), se encontró que el 51% de las mujeres mexicanas en edad reproductiva tienen sobrepeso u obesidad y existe una justificada preocupación por la obesidad antes y después del embarazo y de cómo se alteran los mecanismos de regulación de peso corporal en el feto o el bebé, causando la amplificación transgeneracional de la prevalencia de la obesidad. El peso corporal de la madre se correlaciona con el peso corporal de su descendencia, por lo que se ha hipotetizado que una madre obesa antes y durante el embarazo provoca adaptaciones en los mecanismos epigenéticos en el desarrollo que promueven la obesidad en sus hijos (1).

El impacto del entorno durante la etapa temprana postnatal determina los procesos fundamentales de la vida. La dieta juega un papel muy importante en el desarrollo de las complicaciones durante el embarazo, ya que desequilibrios cualitativos y cuantitativos de los nutrientes y sus metabolitos pueden propiciar un desarrollo estructural y funcional defectuoso.

Se planteó la pregunta de si algunas variables antropométricas y bioquímicas clínicas de la madre se podrían asociar con cambios en la metilación del promotor PPAR γ y si estos cambios en la metilación predominan en caso de presentarse complicaciones gestacionales.

4. Hipótesis

La metilación en el promotor PPAR γ será menor en gestantes con sobrepeso que en gestantes con normopeso.

5. Objetivos

General

Evaluar las diferencias en el índice de metilación del promotor de PPAR γ en mujeres gestantes y sus neonatos de acuerdo a su IMC, atendidas en el Hospital Materno Perinatal “Mónica Pretelini” (HMPMP), en la ciudad de Toluca, México.

Específicos

1. Determinar el índice de metilación en el promotor de PPAR γ por medio del EZ DNA MethylationDirect™ Kit en muestras sanguíneas de las mujeres participantes.
2. Establecer la relación entre los cambios epigenéticos del promotor de PPAR γ y las variables medidas durante el seguimiento de las mujeres en los grupos de estudio.
3. Analizar si el índice de metilación del promotor de PPAR γ se puede asociar con complicaciones gestacionales.

6. Metodología

Tipo de estudio: cohorte pareado.

6.1. Aspectos éticos

En este proyecto no se atribuyó ningún riesgo a las mujeres gestantes ni a sus neonatos, de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, y se apega a las normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a la Declaración de Helsinki vigente, que incluye carta de consentimiento informado para las pacientes (anexo 1).

6.2. Selección de los grupos de estudio

Se integraron los siguientes grupos (Tabla 2):

Grupo	Descripción	No. individuos
1'	Mujeres gestantes con normopeso (NP)	20
	Neonatos de mujeres gestantes con normopeso	20
2'	Mujeres gestantes con sobrepeso (SP)	20
	Neonatos de mujeres gestantes con sobrepeso	20
	Total	80

Tabla 2 Integración de grupos.

Se formaron dos grupos, uno de pacientes con Normopeso (NP) y otro de pacientes con sobrepeso (SP). Ambos con sus respectivos neonatos.

Criterios de inclusión

- Mujeres embarazadas que fueron atendidas en el HMPMP.
- Que firmaron la carta de consentimiento informado (anexo 2).

Criterios de no inclusión

No se aceptaron en el estudio a aquéllas mujeres con:

- cardiopatías congénitas.
- enfermedades discapacitantes.
- enfermedades infecciosas.
- enfermedades autoinmunes.

Criterios de exclusión

- a) que rechazaron pertenecer al grupo de estudio.
- b) cuyo seguimiento clínico se perdió.
- c) que en el puerperio tuvieron que ser atendidas en la unidad de cuidados intensivos obstétricos.

6.3. Captación de pacientes

Se realizó una campaña de captación de pacientes en el HMPMP, en la cuál a las pacientes que se encontraban cursando el primer trimestre de embarazo se les invitó a participar en el estudio, explicándoles en qué consistía, en caso de estar interesadas, firmaban la carta de consentimiento.

Seguimiento del embarazo

El seguimiento del embarazo se realizó mediante una visita de control por trimestre (Trimestres 1, 2 y 3) y una visita del neonato.

En la primera visita se les realizó una exploración física completa para determinar su estado de salud y se generó una hoja de datos en la cual se incluyeron: No. de expediente interno, nombre, peso, talla, IMC pregestacional (PPG), semanas de gestación en base a su última fecha de menstruación (FUM), escolaridad, nivel de estudios, ocupación (anexo 2).

Las visitas trimestrales consistían de tres fases: toma de muestra sanguínea, mediciones antropométricas de las pacientes y valoración de la calidad nutricional.

Las muestras sanguíneas estaban conformadas por tres tubos de sangre periférica, de los cuales, uno se utilizó para análisis de química sanguínea (glucosa, perfil de lípidos), y los otros dos para extracción de ADN de linfocitos.

Las mediciones antropométricas realizadas fueron: peso, talla y presión arterial (sistólica y diastólica).

La evaluación de la calidad nutricional se realizó mediante un cuestionario

En la visita del neonato, Al término del embarazo al neonato se le tomaron de 1 a 2 ml de muestra sanguínea para el análisis de metilación.

Determinaciones antropométricas

Durante cada trimestre del embarazo, a las gestantes se les realizaron mediciones de peso, talla y presión arterial sistólica y diastólica. A los neonatos se les realizaron mediciones de peso y talla al nacimiento.

6.4. Orientación nutricional de acuerdo a las características de las participantes

Los procedimientos de trabajo del HMPMP, todas las madres que presentaron sobrepeso u obesidad fueron canalizadas al departamento de nutrición donde recibieron por escrito una orientación nutricional dependiendo de las características de cada paciente, como son: edad, peso pregestacional, peso actual e IMC; y de acuerdo a sus requerimientos calóricos diarios, se realizaron cambios en las raciones de alimentos, adecuadas a sus necesidades (anexo 3). Para esta investigación, el grupo de las pacientes con normopeso tuvo la misma atención. Se tuvieron de cuatro a ocho visitas control en el transcurso de la gestación y se ajustaron las dietas a las necesidades de cada paciente. De forma general se les recomendó incluir en su alimentación alimentos ricos en metionina (frijol, huevo, pescado, lentejas, cebolla, ajo, soya), así como alimentos que contuvieron ácido fólico y vitamina B12 (levaduras, granos enteros, hígado de res, cereales, etc.); en cantidades adecuadas a su caso particular.

6.5. Valoración de la eficiencia de la orientación nutricional

El nutriólogo especialista valoró la eficiencia de la orientación nutricional de acuerdo al índice de alimentación saludable (*Healthy Eating Index*, HEI), en el cual se asignó una calificación de cero a cien según la calidad nutricional de los alimentos consumidos; dicha información se obtuvo de cuestionarios de los alimentos consumidos en las 24 hrs previas al mismo (recordatorio de 24 h).

Se consideró apego a dieta un porcentaje superior a 80% de cumplimiento de las calorías indicadas, en al menos cuatro consultas.

6.6. Extracción de leucocitos

De las muestras de sangre se obtuvieron los leucocitos de acuerdo al protocolo de ACK-lysing buffer con el catalogo 10-548E de LONZA, donde de manera general a la muestra de sangre periférica se colocó en tubos con EDTA se centrifugo a 2500 rpm, durante 10 min. Se observaron dos fases, en la primera se encontró el plasma, y en la otra los glóbulos rojos (eritrocitos) y en medio de estas dos se encontraron los leucocitos. Estos se extrajeron, colocando 1 ml del buffer ACK-lysing (buffer de extracción de leucocitos), se reposó la muestra durante cinco minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y se esperó encontrar un botón blanco que muestre la presencia de los leucocitos, este último paso se repitió hasta eliminar completamente los eritrocitos. A final se agrega PBS y se centrifugo a 2000 rpm durante 5 min. Se guardó el botón blanco a -70° C, hasta su análisis posterior.

6.7. Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo ADN de la muestra de leucocitos previamente guardada a -70° C en una cantidad de 4000 a 10,000 células, esto de forma automatizada con el equipo MagnaPure de Roche (Figura 11), utilizando el kit MagNaPure LC DNA Isolation Kit 1, Ref.: 03003 990 00, con el buffer de lisis de extracción externa. Al finalizar la extracción se cuantificó el ADN utilizando el equipo Nanophotometer (Implen), versión 7122, mostrando la concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y pureza (absorbancia 260/280) (anexo 4).



Figura 11 Muestra equipo Magna Pure, Roche

6.8. Modificación del ADN con Bisulfito de sodio

Se tomó una alícuota de aproximadamente 5-20 µl de ADN genómico purificado, de acuerdo a la concentración de la muestra para procesar una cantidad óptima de ADN, acuerdo al kit (ver anexo 5). La modificación se realizó mediante el sistema EZ DNA Methylation-Direct Kit (ZymoResearch), Catálogo D5020 (anexo 5).

Breve descripción: Se trató el ADN extraído con bisulfito de sodio; este tratamiento convierte las citosinas no metiladas en uracilos, dejando a las citosinas metiladas sin cambio. Se realizó una amplificación por PCR, durante la cual se transforman los uracilos en timinas, lo que genera diferencias en la secuencia de ADN metilado y no metilado. Posteriormente el ADN modificado fue medido mediante nanofotómetro implem, del cual se obtuvo la concentración (µg/ ml) y pureza (absorbancia 260/280) y además se verificó la integridad del mismo mediante la gráfica. Las muestras se almacenaron a -70 °C para su análisis posterior. Se realizó el mismo tratamiento a dos controles de ADN humano purificado metilado y no metilado (catalogo D5014, D5014-1, y D5012-2 de ZYMO RESEARCH).

6.9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR- RT)

Se realizó un PCR en tiempo real (PCR-RT) específica para metilación utilizando el ADN modificado con bisulfito de sodio (anexo 9.6). Se analizó la región M3 del promotor PPAR γ , con oligos propuestos por Pancione *et al* (71), se verificó la región “Chromosome 3, NC_000003.11 (12329349..12475855)” en el GenBank. Se utilizaron dos tipos de oligos, para esta región para los casos: metilado (M3) y no metilado (U3).

Como agente intercalante se utilizó SYBR® greenAdvantage® de acuerdo al catálogo No. 639676 para el análisis de los productos de metilación. Para cada primer se estableció una Tm adecuado de pruebas de Melting curve. Se determinó el sitio del transcrito, así como su tamaño de producto presentado en la tabla 2 y se establecieron el número de ciclos de acuerdo a Ct (fase crítica) y la fase PLATEAU o efecto meseta, término que se utiliza para describir la atenuación de la tasa de acumulación exponencial normalmente producto en la PCR.

Gen	Primer sentido 5'-3'	Primer antisentido 5'-3'	Tamaño bp	Posición	Tm (C°)
PPAR γ M3	AAGACGGTTTGGTCGATC	CGAAAAAAAAATCCGAAATTTAA	124	-594	53
PPAR γ U3	GGGAAGATGGTTTGGTTGATT	TTCCAAAAAAAAATCCAAAATTTAA	127	-597	53

Tabla 3 Primers sentido y anti-sentido de las regiones m1-m4 del promotor del gen PPAR γ .

Montaje de PCR-RT

El PCR kit SYBR green contiene un optimizado listo para usarse, contiene SYBR Green I, que es el tinte fluorescente, una combinación equilibrada de K⁺ y NH₄⁺ iones en el buffer de PCR que promueve los primers específicos, además de la Taq polimerasa que facilita la transcripción porque funciona a temperaturas elevadas evitando la formación de productos no específicos y dNTPs. Se colocó en el siguiente orden (Tabla 4):

Master mix	Cantidad μ l por muestra
SYBER Green buffer	10 μ l
Primer FW (M, U)	0.4
Primer Rw (M),U)	0.4
Muestra	(0.2-4 μ l) 10ng/ μ l
H ₂ O	7.2

Tabla 4 Orden de los reactivos de la Master Mix

Se colocaron 10.8 μ l de la master mix y 0.2-4 μ l aproximadamente de cada muestra de ADN tratada con bisulfito mezclando en tubos para PCR para posteriormente transferir a capilares de PCR-RT (Tabla 6). Los capilares se centrifugaron a 3000 rpm y se programaron las siguientes condiciones al equipo LightCycler 2.0 Roche (Tabla 5); en cada corrida se incluyeron muestras de control positivo, negativo y un blanco.

Programa	No.de ciclos	Categoría del ciclo
Programa inicial	1	None
Amplificación	30	Cuantificación
Melting Curve	1	Melting Curve
Enfriamiento	1	None

Tabla 5 Programación maestra para el PCR-RT

Programa de Amplificación		
Temperatura	Tiempo	Detección (on/off)
95°C	5 s	Off
53°C	20 s	Off
72°C	30 s	Off (eliminación de dímeros)
76°C	30 s	On (eliminación de dímeros)

	ADN	MIX	Total
Metilado M	2µl	18µl	20µl
No metilado U	2µl	18µl	20µl
Blanco	0	20µl	20µl

Tabla 6 Cantidad de reactivos para el montaje de la PCR en tiempo real

Se cerraron los capilares y se colocaron las muestras en el termociclador con los siguientes programas:

Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Programa de iniciación	
95	60
Amplificación (32 ciclos)	
95	5
52	20
72	30
76	30
Melting curve	

Tabla 7 Condiciones de PCR-RT

Electroforesis

Se prepararon geles de agarosa al 2%.

Se preparó el buffer de cargar con colorantes y glicerol.

Se colocaron 2 μ l de buffer de carga, y se adicionaron 4 μ l de muestra sobre parafilm, y posteriormente se mezclaron.

Se le fijó un voltaje de 100 Volts a 48 miliamperes.

Se colocó un marcador de peso molecular.

De la mezcla anterior se carga en la cámara de electroforesis y se corre de 15 a 20 min. Las muestras corrieron hasta las $\frac{3}{4}$ partes entre pozo y pozo.

Definición de las variables de estudio

Variable	Definición	Tipo	Unidad de medida
Dieta	Aporte calórico de acuerdo a edad gestacional	Dicotómica	1: apego 2: no apego
Índice de Masa Corporal (IMC)	Peso (Kg) entre la talla al cuadrado (m ²). Normal 18.5 - 24.9 Sobrepeso 25 - 29.9 Obesidad I 30.0 - 34.9 Obesidad II 35.0 - 39.9 Obesidad III \geq 40.0	Cuantitativa Continua	Kg/m ²
Mujer embarazada	Mujer embarazada entre 15 y 40 años que sea atendida en el Hospital Materno Perinatal del Estado de México	Categórica	1: normopeso 2: sobrepeso
Perfil de lípidos y	Niveles séricos determinados por técnica fotométrica con kits	Cuantitativa Continua	

glucosa	comercial de: Colesterol total (CT) Colesterol HDL (HDLc) Colesterol LDL (LDLc) Triglicéridos (Tg) Glucosa		mg/dL mg/dL mg/dL mg/dL mg/dL
Peso del neonato		Cuantitativa continua	Kg
Talla del neonato		Cuantitativa continua	m
Grado de metilación	Detección de metilación en linfocitos en sangre periférica	Dicotómica	Metilado No metilado

Tabla 8 Definición de variables

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS versión 19. La estimación del número de muestra se realizó de acuerdo a la cantidad de casos expuestos. Se les hicieron las respectivas pruebas de normalidad encontrándose como datos no paramétricos. Se realizaron análisis descriptivos y posteriormente se estimaron las diferencias a través del tiempo para cada grupo mediante la prueba de Wilcoxon. Y se compararon los grupos mediante la prueba de U de Mann Whitney. Se considerará diferencia significativa a una $p \leq 0.05$.

7. Acuse de artículo recibido

Forwarded Message -----

From: EJOGRB <euro@elsevier.com>

To: mezh_74@yahoo.com, elicasa_4@hotmail.com;

Sent: Monday, August 5, 2013 10:33 AM

Subject: Submission Confirmation for EJOBGRB

Dear Dr. Casamadrid,

Your submission, entitled "A supervised diet program in pregnancy prevents PPAR? methylation changes", has been received by the European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as AUTHOR. The URL for the website is: <http://ees.elsevier.com/euro/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. You will receive a notification with the manuscript number by e-mail.

Thank you for submitting your work to our journal.

With kind regards,

Editorial Office

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A supervised diet program in pregnancy prevents PPAR γ methylation changes

Ruth Elizabeth Casamadrid Vázquez¹

Araceli Amaya Chávez¹

Hugo Mendieta Zerón²

1. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan esq. Paseo Colón, Colonia: Residencial Colón, C. P. 50100

2. Molecular Biology Laboratory, Medical Research Center (CICMED), Autonomous University of the State of Mexico (UAEMex), Toluca, México.

Corresponding author:

Hugo Mendieta Zerón, PhD. Felipe Villanueva sur 1209 Col. Rancho Dolores. C.P. 50170.

Toluca, México. Tel: 722-2194122 ext 157. Mail: mezh_74@yahoo.com

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Condensation

The lack of methylation differences in the PPAR γ promoter region (-351 to -260), under a supervised diet program in pregnancy, suggests that methionine, folic acid and B12 vitamin rich foods prevent epigenetic changes.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Obesity in pregnancy has deleterious effects on maternal health, increasing the risk of pregnancy-induced hypertension [1,2]. Moreover, the mother's increased adiposity has been suggested to influence the programming of metabolic pathways in the fetus predisposed to cardiovascular disease and diabetes [3].

There are several scales to assess diet in the gestational period, such as the Diet Quality Index-International (DQII) [4], the Healthy Eating Index for Pregnancy (HEI) [5] and [6], and the Food Frequency Questionnaire (FFQ) [7]. Some authors classify net weight gain (immediate postdelivery weight minus prepregnancy weight) as poor (0 to 6.8 kg), low-normal (7.25 to 11.33 kg), high-normal (11.79 to 15.87 kg), and excessive (16.32 kg or more) [8].

A body mass index (BMI) greater than 30 units increases the risk for cardiac malformations [9]. Obese pregnant women are at increased risk of cardiovascular disease, type 2 diabetes, osteoarthritis and some cancers, gestational diabetes, thromboembolic disease, abortion, stillbirth, macrosomia, baby's shoulder dystocia, spina bifida, anencephaly, and childhood obesity [10], [11] and [12].

Fetal programming is recognized as a key determinant for the phenotype and adult disease [13]. In this regard, epigenetic mechanisms are flexible genetic alterations that can change the genome function because of external influences and provide a mechanism that allows the stable propagation of genetic alterations from one cell generation to the next. Epigenetic information can be transmitted into two main ways: DNA methylation and structural changes in chromatin proteins, generally in the form of histone tail modifications [14].

During embryonic development, the genome is subjected to a wide demethylation followed by remethylation, and the appropriate DNA methylation state should be maintained during the cycles of rapid steps of cell proliferation [15]. Unbalanced donations of methyl groups

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

caused by nutritional deficiency during embryonic development may irreversibly affect DNA methylation [16].

The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the hormonal nuclear receptor superfamily [17] with four known isoforms; three of them encode the same protein, and the PPAR γ 2 isoform differs from the others by 30 additional amino acids [18]. PPAR γ 1 and γ 2 are expressed predominantly in adipocytes [19]. PPAR γ 1 is additionally expressed in breast, colon, vascular cells, and in small amounts, in the heart and the liver [20]. PPAR γ 3 and PPAR γ 4 have been identified in macrophages, and PPAR γ 3 has been found in colon [18].

PPAR γ is a master regulator of adipogenesis [21], [22], [23]. The ligands of PPAR γ include fatty acids, eicosanoid acids, and thiazolidinediones (TZDs) [24] and [25]. Nevertheless, to date, no "natural" ligand for PPAR γ has been found [17].

PPAR γ 1 promoter extends up to 3 Kb before the initiation site of transcription, whereas PPAR γ 2 promoter extends only 1 Kb from the same site [26]. The PPAR γ 2 gene expression is controlled by methylation of its promoter region [27]. The relation among maternal variables and the methylation status of PPAR γ coactivator 1 (PPARGC1A) and PPAR γ (PPARG) genes has already been studied [28].

The main objective of this study was to assess whether clinical, anthropometric, and biochemical variables of the mother were associated with changes in the methylation of the PPAR γ promoter.

Materials and methods

Study design

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

This was a matched cohort study with two groups: a) normal weight (NW) pregnant women (n = 21) and their offspring, and b) overweight (OW) pregnant women (n = 20) and their offspring.

Patients

We conducted a recruitment campaign at the Maternal-Perinatal Hospital "Mónica Pretelini" (HMPMP), enrolling women in the first trimester of pregnancy. Women with congenital heart and disabling or autoimmune diseases were not included. Those whose clinical follow-up were lost or, if in the postpartum period, who had to be attended in the obstetric intensive care unit were eliminated from the study.

Pregnancy monitoring

A clinical visit per month and a medical exploration of the neonate were established. Each visit consisted of anthropometric and blood pressure measurements, blood sampling, and nutritional quality assessment.

Anthropometric measurements

Body weight and height were measured in an overnight fasting status using an adult scale (Seca, Hamburg, Germany). Prepregnancy BMI was calculated as weight in kg divided by height in meters squared based on the prenatal chart or on the self-reported weight of women with no prenatal chart.

Blood pressure

Blood pressure was recorded at each visit using a standard sphygmomanometer (Riester Big Ben® Square, Germany) and appropriately sized cuff. Preeclampsia was diagnosed and classified according to the American College of Obstetricians and Gynecologists

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(ACOG) and the National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy.

Biochemical assessment

Fasting blood samples (10 ml) were taken at the HMPMP laboratory in an early morning after an overnight fasting. Serum samples were analyzed for glucose and lipid profile (Dimension Rx L Max, Dade Behring, USA). At the end of pregnancy, 1 to 2 ml of neonatal peripheral blood sample for leukocyte DNA extraction was taken.

Nutritional guidance

Dietetic treatment was calculated according to height, weeks of gestation, and weight, considering an energy intake of 30 kcal/kg of ideal weight and a macronutrient distribution of: 55-65% carbohydrates, 10-20% fat, and the remainder as proteins. On each nutritional visit, the HEI was evaluated, and all women were recommended to include methionine-rich foods (beans, eggs, fish, garlic, lentils, onion, and soy) and those containing folic acid and vitamin B12 (beef liver, cereals, whole grains, yeast, etc.) in adequate quantities in their diet. The information was complemented with the FFQ, and the diet adherence was considered adequate with 80% compliance to the indicated calories, at least in four visits.

PPAR γ methylation

Leukocytes were obtained according to the ACK-lysing buffer (LONZA) protocol. Briefly, a peripheral blood sample was placed in EDTA tube and then centrifuged at 2500 rpm for 10 min. All samples were kept at -80°C until further analysis.

DNA was extracted from leukocytes (4000-10,000 cells) in the MagnaPure (Roche) using the MagNAPure LC DNA Isolation Kit 1 (Roche, Germany). After the extraction, DNA was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

quantified using a NanoPhotometer (Implen), reporting the concentration ($\mu\text{g/ml}$) and purity (260/280 absorbance).

The treatment of DNA (2 μg) was performed with sodium bisulfite (EZ DNA Methylation-Direct Kit, ZymoResearch). For the control group, we used purified human methylated and unmethylated DNA (Zymo Research) with specific oligonucleotides. Lymphocyte DNA from healthy donors was used as negative control, and methylated DNA "in vitro" with Sss I enzyme (New England Biolabs) was used as positive control for methylation.

The methylated (M3) and unmethylated (U3) primers used were those proposed by Pancione et al [29]. Those primers comprise the same region, -359 to -260 with respect to the transcription site, but differ in sequence with respect to the cytosines of CpG islands. M3 primer set is specific to the case where CpG cytosines are methylated and thus not modified during the bisulfite treatment, whereas U3 primer set is specific for the opposite case in which all cytosines are modified during bisulfite treatment.

The primer functionality was verified using the following methods: first, by analyzing the primer sequences, based on the *in silico* change of the gene sequence obtained from PubMed, and second, by obtaining theoretical products and running primer tests of specificity in the methBLAST program.

Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed in a Roche LightCycler 2.0 using the SYBR® Advantage® qPCR Premix Kit (Clontech). The steps were as follows: denaturation, alignment, and elongation. The primers used for PPARG M3 were forward: 5'-aagacggttgatc-3', reverse: 5'-cgaaaaaaatccgaaatttaa-3'; and those for PPARG U3 were forward: 5'-gggaagatggttggtgatt-3' and reverse: 5'-ttcaaaaaaaaaatccaaaatttaa-3'. cDNA integrity and methylation status were visualized in 2% agarose gels. Finally, qPCR products were sequenced and read with Chromas software v. 2.33 (Instituto de

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Neurobiología, National Autonomous University of Mexico, UNAM), to verify the correct amplification of the primers.

Ethical

This project had no risk to pregnant women and their infants, according to the regulations of the General Health Research Law of Mexico. We followed the Declaration of Helsinki, and all patients were asked to sign the written informed consent. The protocol was approved by the Research Committee of the HMPMP (code: 05-06-2009).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 19. First, descriptive analyses were performed; then, we estimated the differences between the study groups using Mann Whitney U test and also compared if the same group presented differences through time using Wilcoxon test. Difference was considered significant at $p \leq 0.05$.

Results

Anthropometry

The anthropometric variables are listed in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

. The weight of newborns was 2999 ± 381 g and 2958 ± 616 g for NW and OW women, respectively, and their height was 49.55 ± 2.13 and 49.32 ± 3.06 for NW and OW women, respectively.

Analyzing all data, we found no statistical differences in age, pregnancy duration, or net weight gain, but significant differences were found in all the other BMI-related variables between groups.

In blood pressure, no statistical differences could be established with the Friedman test, except for the third trimester for the OW group. We also performed a similar analysis between trimesters, comparing both groups and obtaining the same unique exception. Only one confirmed case of preeclampsia occurred within the OW group. This patient showed outstanding cholesterol and triglycerides values.

Table 2 summarizes the intragroup statistical results compared by trimester, showing four cases: a) variables that evolution presents no statistical differences (this is the case of glucose in the OW group and high-density lipoprotein (HDL) in both groups); b) variables with an increase from the first to the second trimester, followed by stagnation (cholesterol in the OW group and low-density lipoproteins (LDL) in both groups); c) variables that increased continuously (cholesterol in NW group and triglycerides and weight gain in both groups); and d) variables that decrease initially and arrive at stagnation (glucose in the NW group). From these data, we can see that most of the variables follow the same trend regardless of the group, except glucose and cholesterol. As for the intergroup analysis, we found no statistical differences, except for weight gain during the 1st trimestral visit (Table 3).

Nutritional supervision

Taking into account the recommendations of 11.5 to 16 kg for normal weight and 7 to 11.5 kg for the overweight case [30], the percentage of pregnant women who maintained an

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ideal weight was 36% in the WW and 42% in the OW group. According to HEI, there was adequate adherence to nutritional counseling in 38% for the NW group and 25% for the OW group.

Methylation

All samples were found to be unmethylated in both groups. Also, the newborn samples exhibited the same trend. These results were verified by both the amplification of the qPCR with the unmethylation-specific primer and the absence of amplification in the presence of the methylation-specific primer (Figure 1).

Comment

The compared groups differed only in BMI, having essentially no statistical differences for all other variables; this is an appreciable characteristic as it limits any other difference besides the BMI effects. Beyond the desired statistical differences in BMI, both groups had differences in postpartum weight. When recalculating BMI after delivery, the initial NW group was found to be within the classification of overweight, and the initial OW group was in the range of obesity grade I. The NW group was noted to have a higher net weight gain as the recommendations are wider in these women.

Surprisingly, when comparing the biochemical variables between groups among the trimesters, no statistical difference was found among them, although it must be clarified that the cohort groups followed different trends. In such behavior, pregnant women who followed the nutritional guidance showed a slight decrease in weight gain, probably because of the influence of the diet orientation. In analyzing the adherence of nutritional guidance, this action apparently contributed to the moderate weight gain.

Regarding weeks of gestation and childbirth weight and height, no differences were found. Whereas Valderrama et al.[31] found a positive correlation between newborn's weight and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the mother's BMI and weight gain, we found no correlation, probably because of the reduced study group.

In pregnancy, it is normal to have hyperlipidemia [32] and [33]. The increase in cholesterol is necessary because it is the precursor of vitamin D [34] and corticosteroid hormones, both critical for a healthy pregnancy [35]. In this study, we observed an increase of cholesterol in both groups that was higher in the third quarter of pregnancy. High cholesterol levels in pregnancy was believed to actually cause fetal programming to atherogenesis [36]. Caren Solomon [37] found that pregnant women who had high cholesterol levels and elevated insulin levels were more likely to develop pregnancy-induced hypertension or preeclampsia.

In our study, although cholesterol and triglycerides increased in both groups, the increase was more noticeable in triglycerides. As has been published previously, triglyceride levels increase up to three times as long as the pregnancy progresses through the third quarter [14]; similar results were obtained in this study, suggesting changes in lipid metabolism, which may be accompanied by functional and morphological changes in adipocytes.

Unexpectedly, we found no different methylation index in any case; all samples were found to be unmethylated. Nevertheless, it is interesting to compare these results with those obtained by Gemma et al [28]. This last group attempted to assess differences in the methylation status of various genes, such as PPAR γ , from samples of pregnant women grouped according to BMI and umbilical cord blood samples of their offspring and obtained a methylation status of 100%. Although our results differ in terms of methylation status, they share the same characteristic of nondifferentiation between groups. Regarding the status difference, a handful of factors may contribute to these marked disparities; it must be noticed that the analyzed promoter region of Gemma et al [28] was a farther upstream region (-681) than the one we studied (-351 to -260). The diet program should also be considered because the strict diet supervision guaranteed adequate portions of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

methionine, folic acid, and vitamin B12 with known role in preventing methylation alterations.

Although further work is required to define the PPAR γ epigenetic changes, the literature has successfully associated the methylation status of the PPAR γ C1a with maternal programming of metabolic syndrome-related phenotypes [28] and [38].

Despite the large efforts in explaining some possible factors that predispose to obesity genetically and epigenetically, a single loci has not been identified yet as entirely responsible for this pathology. The current trend, given the advances in molecular biology presented in the last few years, is to search for genome-wide associations (GWAs), which can provide a better understanding of the obesity pathology and transgenerational health consequences [39].

Conclusions

Under a diet supervision program, there was no case of M3 methylated region of the PPAR γ gene, suggesting that a supervised diet program in pregnancy prevents epigenetic changes in the PPAR γ promoter region (-351 to -260) or that this region is not easily suitable for epigenetic changes.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgements

Authors thank Adriana Garduño Alanís for the guidance in the nutritional advice for the patients. This study was partially financed by the Asociación Científica Latina A.C. (ASCILA).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legend

Agarose gel with the next explanation: M: methylated, U3: unmethylated, S: sample, +C: positive control, -C: negative control.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Luke B, Brown MB. Elevated risks of pregnancy complications and adverse outcomes with increasing maternal age. *Hum Reprod* 2007;22:1264–72.
2. Saffery R, Ellis J, Morley R. A convergent model for placental dysfunction encompassing combined sub-optimal one-carbon donor and vitamin D bioavailability. *Med Hypotheses* 2009;73:1023–8.
3. Kajantie E, Eriksson JG, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Preeclampsia associated with increased risk of stroke in the adult offspring: the Helsinki birth cohort study. *Stroke* 2009;40:1176–80.
4. Bodnar LM, Siega-Riz AM, Simhan HN, Himes KP, Abrams B. Severe obesity, gestational weight gain, and adverse birth outcomes. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1642–8.
5. Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Oken E, Gillman MW. Dietary quality during pregnancy varies by maternal characteristics in Project Viva: a US cohort. *J Am Diet Assoc* 2009;109:1004–11.
6. Rodríguez-Bernal CL, Rebagliato M, Iñiguez C, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Murcia M, et al. Diet quality in early pregnancy and its effects on fetal growth outcomes: the Infancia y MedioAmbiente (Childhood and Environment) Mother and Child Cohort Study in Spain. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1659–66.
7. Barclay AW, Flood VM, Brand-Miller JC, Mitchell P. Validity of carbohydrate, glycaemic index and glycaemic load data obtained using a semi-quantitative food-frequency questionnaire. *Public Health Nutr* 2008;11:573–80.
8. Kiel DW, Dodson EA, Artal R, Boehmer TK, Leet TL. Gestational weight gain and pregnancy outcomes in obese women: how much is enough? *Obstet Gynecol* 2007;110:752–8.
9. Mills JL, Troendle J, Conley MR, Carter T, Druschel CM. Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1543–9.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

10. Lau DC. Synopsis of the 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children. *CMAJ* 2007;176:1103–6.

11. Davies GA, Maxwell C, McLeod L, Gagnon R, Basso M, Bos H, et al. Obesity in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2010;32:165–73.

12. Rasmussen SA, Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Lau J. Maternal obesity and risk of neural tube defects: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:611–9.

13. Li CC ying, Maloney CA, Cropley JE, Suter CM. Epigenetic programming by maternal nutrition: shaping future generations. *Epigenomics* 2010;2:539–49.

14. Rodríguez-Dorantes M, Tellez-Ascencio N, Cerbon MA, López M, Cervantes A. [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Rev Invest Clin* 2004;56:56–71.

15. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007;447:425–32.

16. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 2009;587(Pt 4):905–15.

17. Mitchell A L. PPAR γ , 10 years later. *Biochimie* 2005;87:9–13.

18. Arck P, Toth B, Pestka A, Jeschke U. Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials. *Biol Reprod* 2010;83:168–76.

19. Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:1–9.

20. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jiménez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:2416–22.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

21. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 1999;99:239–42.

22. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9856–60.

23. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 2002;16:22–6.

24. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994;8:1224–34.

25. Olefsky JM, Saltiel AR. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance et]. In: *Trends Endocrinol Metab. United States: 2000. p. 362–8.*

26. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779–89.

27. Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC biology* 2009;7:38.

28. Gemma C, Sookoian S, Alvariñas J, García SI, Quintana L, Kanevsky D, et al. Maternal pregestational BMI is associated with methylation of the PPARGC1A promoter in newborns. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 2009;17:1032–9.

29. Pancione M, Sabatino L, Fucci A, Carafa V, Nebbioso A, Forte N, et al. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor γ is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome. *PloS one.* 2010;5(12):e14229.

30. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines; Rasmussen KM, Yaktine AL, editors.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32813/>

31. Grados Valderrama FM, Cabrera Epiquen R; Díaz Herrera J. Estado nutricional pregestacional y ganancia de peso materno durante la gestación y su relación con el peso del recién nacido. *Rev Med Hered* 2003;14:128–33.

32. Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14:66–71.

33. Mendieta Zerón H, Huerta Coyote O. Dyslipidemia is a persistent problem in puerperium with or without preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2013;40(2):229–232.

34. Bartels A, O'Donoghue K. Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns. *Obstet Med* 2011;4:147–51.

35. Kuzawa CW, Adair LS. Lipid profiles in adolescent Filipinos: relation to birth weight and maternal energy status during pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2003;77:960–6.

36. Palinski W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J* 2002;16:1348–60.

37. Solomon CG, Carroll JS, Okamura K, Graves SW, Seely EW. Higher cholesterol and insulin levels in pregnancy are associated with increased risk for pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1999;12:276–82.

38. Burgueño AL, Cabrerizo R, Gonzales Mansilla N, Sookoian S, Pirola CJ. Maternal high-fat intake during pregnancy programs metabolic-syndrome-related phenotypes through liver mitochondrial DNA copy number and transcriptional activity of liver PPARGC1A. *J Nutr Biochem* 2013;24:6–13.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

39. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* 2011;69:41–9.

Table

Table 1. Anthropometric variables by group

Variable	Group		P
	Normal weight Mean (SD)	Overweight Mean (SD)	
Age (years)	23.9 (5.4)	25.9 (6.9)	
PGW (Kg)	54.5 (6.7)	68.1 (10)	≤ 0.001
Height (cm)	158.5 (6.8)	154.7 (3.9)	
BMI (Kg/m ²) ^a	21.6 (1.9)	28.5 (3.8)	≤ 0.001
PPW (Kg)	62.4 (6.4)	70.7 (9.9)	≤ 0.001
BMI (Kg/m ²) ^b	24.8 (2.1)	29.5 (3)	≤ 0.001
Weight gain (Kg)	11.1 (3.2)	9.0 (6.2)	

BMI: Body Mass Index, PGW: pre-gestational weight, PPW: post-partum weight. a: pre-pregnancy, b: post-delivery.

Table 2

Table 2. Biochemical variables grouped by trimester

Variable	Group					
	NW Trimester			OW Trimester		
	1	2	3	1	2	3
Glucose (mg/dL)	85.48 _a	78.86 _{a,b}	76.95 _b	81.35 _a	77.50 _a	78.40 _a
Cholesterol (mg/dL)	172.71 _a	217.10 _b	248.52 _b	176.05 _a	218.85 _b	234.10 _b
Triglycerides (mg/dL)	136.19 _a	201.52 _b	247.76 _b	146.85 _a	214.20 _b	254.75 _b
HDL (mg/dL)	62.76 _a	64.95 _a	62.43 _a	52.30 _a	60.65 _a	55.25 _a
LDL (mg/dL)	101.14 _a	131.00 _{a,b}	146.00 _b	103.15 _a	130.85 _b	146.25 _b
Weight gain (Kg)	2.22 _a	3.93 _{a,b}	4.92 _b	-.12 _a	3.60 _b	5.52 _b

HDL: high-density lipoproteins, LDL: low-density lipoproteins, NW=Normal weight group, OW=Overweight group. Values with the same subscript (a, b) have no statistical differences.

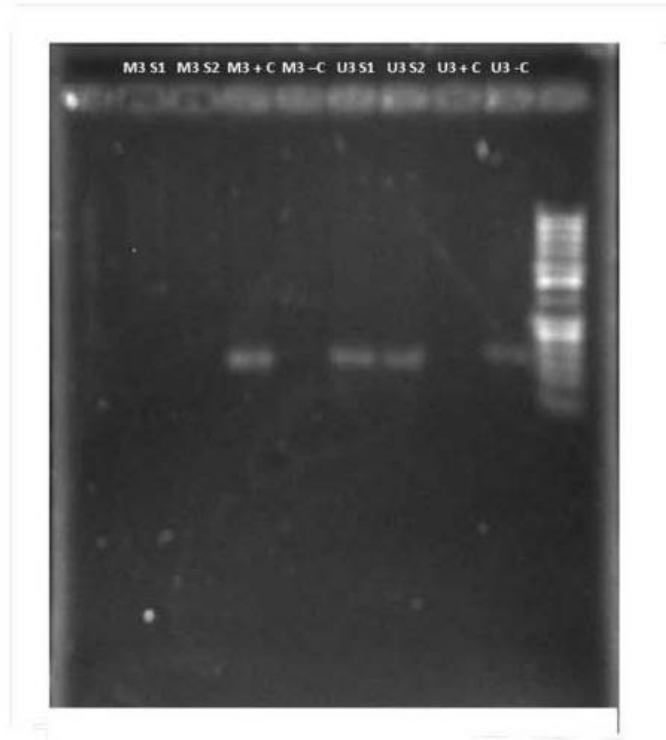
Table 3

Table 3. Biochemical variables for each trimester, compared by groups

Variable	Trimester					
	1 Group		2 Group		3 Group	
	NW	OW	NW	OW	NW	OW
Glucose (mg/dL)	85.48 _a	81.35 _a	78.86 _a	77.50 _a	76.95 _a	78.40 _a
Cholesterol (mg/dL)	172.71 _a	176.05 _a	217.10 _a	218.85 _a	248.52 _a	234.10 _a
Triglycerides (mg/dL)	136.19 _a	146.85 _a	201.52 _a	214.20 _a	247.76 _a	254.75 _a
HDL (mg/dL)	62.76 _a	52.30 _a	64.95 _a	60.65 _a	62.43 _a	55.25 _a
LDL (mg/dL)	101.14 _a	103.15 _a	131.00 _a	130.85 _a	146.00 _a	146.25 _a
Weight gain (Kg)	2.22 _a	-.12 _b	3.93 _a	3.60 _a	4.92 _a	5.52 _a

HDL: high-density lipoproteins, LDL: low-density lipoproteins, NW=Normal weight group, OW=Overweight group. Values with the same subscript (a, b) have no statistical differences.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)



8. Bibliografía

1. Luke B, Brown MB. Elevated risks of pregnancy complications and adverse outcomes with increasing maternal age. *Hum Reprod* [Internet]. 2007/02/10 ed. 2007;22(5):1264–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289684?dopt=Citation>
2. Saffery R, Ellis J, Morley R. A convergent model for placental dysfunction encompassing combined sub-optimal one-carbon donor and vitamin D bioavailability. *Med. Hypotheses* [Internet]. 2009;73(6):1023–8. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70450225239&partnerID=40&md5=92142d73702001a44d77b078bd0f4670>
3. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2013 Nov 12];71(5):1344S–1352. Available from: <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/71/5/1344S>
4. Bloomgarden ZT. Gestational diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Care* [Internet]. 2010/04/30 ed. 2010;33(5):e60–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427674?dopt=Citation>
5. Rasmussen KM YAL. *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Natl. Acad. Press. 2010/07/30 ed. 2009;
6. Bodnar LM, Siega-Riz AM, Simhan HN, Himes KP, Abrams B. Severe obesity, gestational weight gain, and adverse birth outcomes. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2010/04/02 ed. 2010;91(6):1642–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357043?dopt=Citation>
7. Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Oken E, Gillman MW. Dietary quality during pregnancy varies by maternal characteristics in Project Viva: a US cohort. *J Am Diet Assoc*. 2009/05/26 ed. 2009;109(6):1004–11.
8. Rodriguez-Bernal CL, Rebagliato M, Iniguez C, Vioque J, Navarrete-Munoz EM, Murcia M, et al. Diet quality in early pregnancy and its effects on fetal growth outcomes: the Infancia y Medio Ambiente (Childhood and Environment) Mother and Child Cohort Study in Spain. *Am J Clin Nutr*. 2010/04/23 ed. 2010;91(6):1659–66.
9. Barclay AW, Flood VM, Brand-Miller JC, Mitchell P. Validity of carbohydrate, glycaemic index and glycaemic load data obtained using a semi-quantitative food-frequency questionnaire. *Public Heal. Nutr* [Internet]. 2007/10/25 ed. 2008;11(6):573–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956640?dopt=Citation>

-
10. Kiel DW, Dodson EA, Artal R, Boehmer TK, Leet TL. Gestational weight gain and pregnancy outcomes in obese women: how much is enough? *Obs. Gynecol* [Internet]. 2007/10/02 ed. 2007;110(4):752–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906005?dopt=Citation>
 11. Mills JL, Troendle J, Conley MR, Carter T, Druschel CM. Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2010/04/09 ed. 2010;91(6):1543–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375192?dopt=Citation>
 12. Lau DC. Synopsis of the 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children. *CMAJ* [Internet]. 2007/04/11 ed. 2007;176(8):1103–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420493?dopt=Citation>
 13. White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2009/02/27 ed. 2009;296(5):R1464–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244583?dopt=Citation>
 14. Davies GA, Maxwell C, McLeod L, Gagnon R, Basso M, Bos H, et al. Obesity in pregnancy. *J Obs. Gynaecol Can* [Internet]. 2010/02/26 ed. 2010;32(2):165–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181319?dopt=Citation>
 15. Rasmussen SA, Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Lau J. Maternal obesity and risk of neural tube defects: a metaanalysis. *Am J Obs. Gynecol*. 2008/06/10 ed. 2008;198(6):611–9.
 16. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* [Internet]. 2009/02/13 ed. 2009;301(6):636–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211471?dopt=Citation>
 17. Li CC ying, Maloney CA, Cropley JE, Suter CM. Epigenetic programming by maternal nutrition: shaping future generations. *Epigenomics* [Internet]. 2010;2:539–49. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/fm/epi/2010/00000002/00000004/art00008>
 18. H MZ. Influencia de la alimentación neonatal, dietas con diferente contenido graso y cirugía bariátrica en la homeostasis energética. España: Universidad de Santiago de Compostela; 2008.
 19. Painter RC, Osmond C, Gluckman P, Hanson M, Phillips DIW, Roseboom TJ. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on

neonatal adiposity and health in later life - Painter - 2008 - BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology - Wiley Online Library [Internet]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.2008.01822.x/abstract>

20. Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, Simmers TA, Osmond C, Barker DJ, et al. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006/08/10 ed. 2006;84(2):322–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895878?dopt=Citation>
21. Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2008/12/10 ed. 2008;88(6):1648–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064527?dopt=Citation>
22. De Rooij SR, Painter RC, Roseboom TJ, Phillips DI, Osmond C, Barker DJ, et al. Glucose tolerance at age 58 and the decline of glucose tolerance in comparison with age 50 in people prenatally exposed to the Dutch famine. *Diabetologia* [Internet]. 2006/02/14 ed. 2006;49(4):637–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470406?dopt=Citation>
23. Kwong WY, Miller DJ, Wilkins AP, Dear MS, Wright JN, Osmond C, et al. Maternal low protein diet restricted to the preimplantation period induces a gender-specific change on hepatic gene expression in rat fetuses. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2006/08/31 ed. 2007;74(1):48–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16941667?dopt=Citation>
24. Bellido ML, Radpour R, Lapaire O, De Bie I, Hösli I, Bitzer J, et al. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biol. Reprod.* [Internet]. 2010;82(4):745–50. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77953849706&partnerID=40&md5=3e2bd42bb7f91a47710f477afaf75488>
25. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2010/07/16 ed. 2010;299(3):R711–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631295?dopt=Citation>
26. Huang JS, Lee TA, Lu MC. Prenatal programming of childhood overweight and obesity. *Matern Child Heal. J* [Internet]. 2006/09/29 ed. 2007;11(5):461–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17006770?dopt=Citation>

-
27. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* [Internet]. 2009;587(Pt 4):905–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103681?dopt=Citation>
 28. Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* [Internet]. 2010/04/15 ed. 2010;427(3):333–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388123?dopt=Citation>
 29. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* [Internet]. 2007/05/25 ed. 2007;447(7143):433–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522677?dopt=Citation>
 30. Waddington CH. The epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* [Internet]. 2012 Feb [cited 2012 Mar 19];41(1):10–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186258>
 31. Wolffe AP, Guschin D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* [Internet]. United States; 2000. p. 102–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806063?dopt=Citation>
 32. Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)*. [Internet]. England; 2010. p. 105–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179736?dopt=Citation>
 33. Rodriguez-Dorantes M, Tellez-Ascencio N, Cerbon MA, Lopez M, Cervantes A. [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Rev Invest Clin* [Internet]. 2004/05/18 ed. 2004;56(1):56–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144044?dopt=Citation>
 34. Liutkeviciute Z, Lukinavicius G, Masevicius V, Daujotyte D, Klimasauskas S. Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat. Chem. Biol.* [Internet]. 2009;5(6):400–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430486>
 35. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 2005/12/13 ed. 2005;10(4):631–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341272?dopt=Citation>
 36. Jeltsch A. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. Edited by Trygve Tollefsbol. *ChemBioChem*. 2011 Apr 11;12(6):970–970.

-
37. Zeisel SH. Importance of methyl donors during reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* [Internet]. 2009 Feb [cited 2012 Mar 20];89(2):673S–7S. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2628952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 38. Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* [Internet]. 2000 Apr [cited 2012 Mar 20];32(4):391–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762064>
 39. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* [Internet]. England; 1987. p. 261–82. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3656447?dopt=Citation>
 40. Irizarry RA, Wu H, Feinberg AP. A species-generalized probabilistic model-based definition of CpG islands. *Mamm Genome* [Internet]. 2009/09/25 ed. 2009;20(9-10):674–80. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19777308?dopt=Citation>
 41. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* [Internet]. United States; 2009. p. 3927–37. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509173?dopt=Citation>
 42. Bogdanovic O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* [Internet]. 2009/06/10 ed. 2009;118(5):549–65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19506892?dopt=Citation>
 43. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* [Internet]. 2005 Apr 15 [cited 2012 Mar 2];14 Spec No(suppl_1):R47–58. Available from:
http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/14/suppl_1/R47
 44. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007/05/25 ed. 2007;447(7143):425–32.
 45. Waterland RA. Is epigenetics an important link between early life events and adult disease? *Horm Res*. 2009/01/30 ed. 2009;71 Suppl 1:13–6.
 46. Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis*. 2006/07/27 ed. 2006;44(9):401–6.
 47. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some

-
- aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2010/01/09 ed. 2009;60 Suppl 3:17–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996479?dopt=Citation>
48. Patel MS, Srinivasan M, Laychock SG. Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J Inherit Metab Dis*. 2008/12/20 ed. 2009;32(2):218–28.
 49. Bruce DG, Van Minnen K, Davis WA, Mudhar J, Perret M, Subawickrama DP, et al. Maternal family history of diabetes is associated with a reduced risk of cardiovascular disease in women with type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care* [Internet]. 2010/04/07 ed. 2010;33(7):1477–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368412?dopt=Citation>
 50. Pinney SE, Simmons RA. Metabolic programming, epigenetics, and gestational diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.* [Internet]. 2012 Feb [cited 2012 Mar 16];12(1):67–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127642>
 51. Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br. J. Nutr.* [Internet]. 2008 Aug [cited 2012 Mar 17];100(2):278–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2564112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 52. Fournier T, Therond P, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D. PPARgamma and early human placental development. *Curr Med Chem* [Internet]. 2008/12/17 ed. 2008;15(28):3011–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075649?dopt=Citation>
 53. Mitchell A L. PPAR γ , 10 years later. *Biochimie* [Internet]. 2005;87(1):9–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908404002007>
 54. Arck P, Toth B, Pestka A, Jeschke U. Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials. *Biol. Reprod.* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2012 Apr 6];83(2):168–76. Available from: <http://www.biolreprod.org/cgi/content/abstract/83/2/168>
 55. Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin. Cancer Res.* [Internet]. 2003 Jan [cited 2012 Apr 5];9(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538445>

-
56. Kota BP, Huang TH-W, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol. Res.* [Internet]. 2005 Feb [cited 2012 Apr 4];51(2):85–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2004.07.012>
 57. Vidal-Puig AJ, Considine R V, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* [Internet]. 1997 May 15 [cited 2012 Mar 19];99(10):2416–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508081&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
 58. Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. Netherlands; 2007. p. 952–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560826?dopt=Citation>
 59. Sandoval AG, Manzur J. F, Gómez D, Gómez A. C. Nuclear receptors and lipid metabolism: cardiovascular implications. *Rev. colomb. cardiol* [Internet]. 2009 [cited 2012 Apr 5];16(1):29–34. Available from: <http://www.scc.org.co/REVISTASCC/v16/v16n1/body/v16n1a5.htm>
 60. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 1997 Jul 25 [cited 2012 Mar 11];272(30):18779–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228052>
 61. Lowell BB. PPAR γ : an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* [Internet]. 1999 Oct 29 [cited 2012 Apr 6];99(3):239–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555139>
 62. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* [Internet]. 1994;79(7):1147–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749490006X>
 63. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 1995;92(21):9856–60. Available from: <http://www.pnas.org/content/92/21/9856.abstract>
 64. Shao D, Lazar MA. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , CCAAT/Enhancer-binding Protein α , and Cell Cycle Status Regulate the Commitment

to Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 1997;272(34):21473–8. Available from: <http://www.jbc.org/content/272/34/21473.abstract>

65. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* [Internet]. 2002/01/10 ed. 2002;16(1):22–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782441?dopt=Citation>
66. Valet P, Tavernier G, Castan-Laurell I, Saulnier-Blache JS, Langin D. Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J. Lipid Res.* [Internet]. 2002 Jun [cited 2012 Apr 5];43(6):835–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032159>
67. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* [Internet]. 1994/05/15 ed. 1994;8(10):1224–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926726?dopt=Citation>
68. Olefsky JM, Saltiel AR. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. United States; 2000. p. 362–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042466?dopt=Citation>
69. Base de datos 2002-2008 [Internet]. Sistema Nacional de Información y salud; 2010. Available from: <http://sinais.salud.gob.mx/basesdedatos/>
70. Olaiz, Fernández O, Rivera, T DJSL, Rojas R, Villalpando. Hernández S, Ávila M et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca Méx.: Instituto Nacional de Salud Pública. 2006: 12 – 4.
71. Pancione M, Sabatino L, Fucci A, Carafa V, Nebbioso A, Forte N, et al. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor γ is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Mar 15];5(12):e14229. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2997072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

9. Anexos

9.1. Anexo 1. Carta de Consentimiento informado

Toluca, México a ___ de _____ de _____

Por medio de este conducto declaro que acepto participar en el proyecto “Metilación en el promotor PPAR γ en el binomio madre-hija en casos de sobrepeso gestacional”, que será coordinado en el Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), y que tiene como finalidad disminuir la morbi-mortalidad materna.

Manifiesto que se me ha explicado claramente el proyecto y las medidas de intervención, así como los beneficios que tendría, diciéndome que no lleva ningún riesgo agregado para mi embarazo.

Atte.:



9.2.Anexo 2

Datos de adquiridos en la captación

No. Paciente	expediente	Nombre de la paciente	Edad	PPG	Talla	Peso actual	IMC	FUM	Escolaridad	Ocupación	SDG	Fecha de laboratorios
1	04832	Lopez Cortez Ma de Jesus	22	52	1.60	53	20.31	05/05/11	secundaria	hogar	5	06/05/11

de pacientes

Jugo de naranja	½ taza
-----------------	--------

9.3. Anexo 3

Programa gestacional

Hospital Materno Perinatal "Mónica Pretelini" ISEM

Raciones de alimentos para hacer tu menú.

Escoje los quieras para hacer tu menú, combínalos y cuida tus raciones. Una ración equivale:

Cereales y Tubérculos

15g de hidratos de carbono = 1 ración

	Ración
Arroz cocido	1/3 taza
Avena cocida	½ taza
Barritas all bran	1 barrita
Coillito integral	1/3 pieza
Cereal integral	1/3 Taza
Galletas habaeras integrales	3 piezas
Galletas kraker bran	3 piezas
Galletas marías	5 piezas
Galletas saladas naturales	3 piezas
Palomitas	2 1/2 tazas
Pan integral	1 reb
Pan multigrano	1 reb
Pasta (espeghetti fideo)	½ taza
Tortilla de harina	½ pieza
Tortilla de maiz	1 pieza

Verduras
Tienen una cantidad mínima de hidrato de carbono (puedes consumir las cantidades que quieras).

Verduras crudas	Ración
Verduras cocidas	1 taza
Evitar papa, elote, chicharo y canote	½ taza

Frutas

30-40 g de hidratos de carbono = 1 ración

Cirueta roja	Ración
Cirueta pasa	3 piezas
Cerezas	20 piezas
Durazno pequeño	2 piezas
Fresa	1 taza
Guayaba	2 piezas
Kiwi	1 ½ piezas
Limon real	3 piezas
Mandarina	2 piezas
Manzana	1 pieza
Melón	1 taza
Naranja	2 piezas
Papaya	2/3 taza
Pera	½ pieza
Tuna	2 piezas
Toronja	1 pieza
Uva	20 piezas

No tienen hidratos de Carbono

Atún en agua	Ración
Carne de res (filete, chambarete, falda o molida sin grasa)	¼ lata 30 g
Claras de huevo	2 piezas
Huevo entero	1 pieza
Jamón de pavo	2 reb
Marriscos	30 g
Pollo (pierna o muslo)	1/3 pieza
Pescado	30 g
Queso (Oaxaca, requesón o panela)	40 g
Queso cottagge	3 cdas
Salchicha de pavo	1 pieza
Pechuga de pavo	30g

Leche

15g de hidratos de carbono = 1 ración

Leche descremada	Ración
Leche descremada en polvo	1 taza
Leche descremada en polvo	3 cucharadas
Yogurt descremado sin azúcar	1 taza
Jocoque	¼ taza

Leguminosas

15g de hidratos de carbono = 1 ración

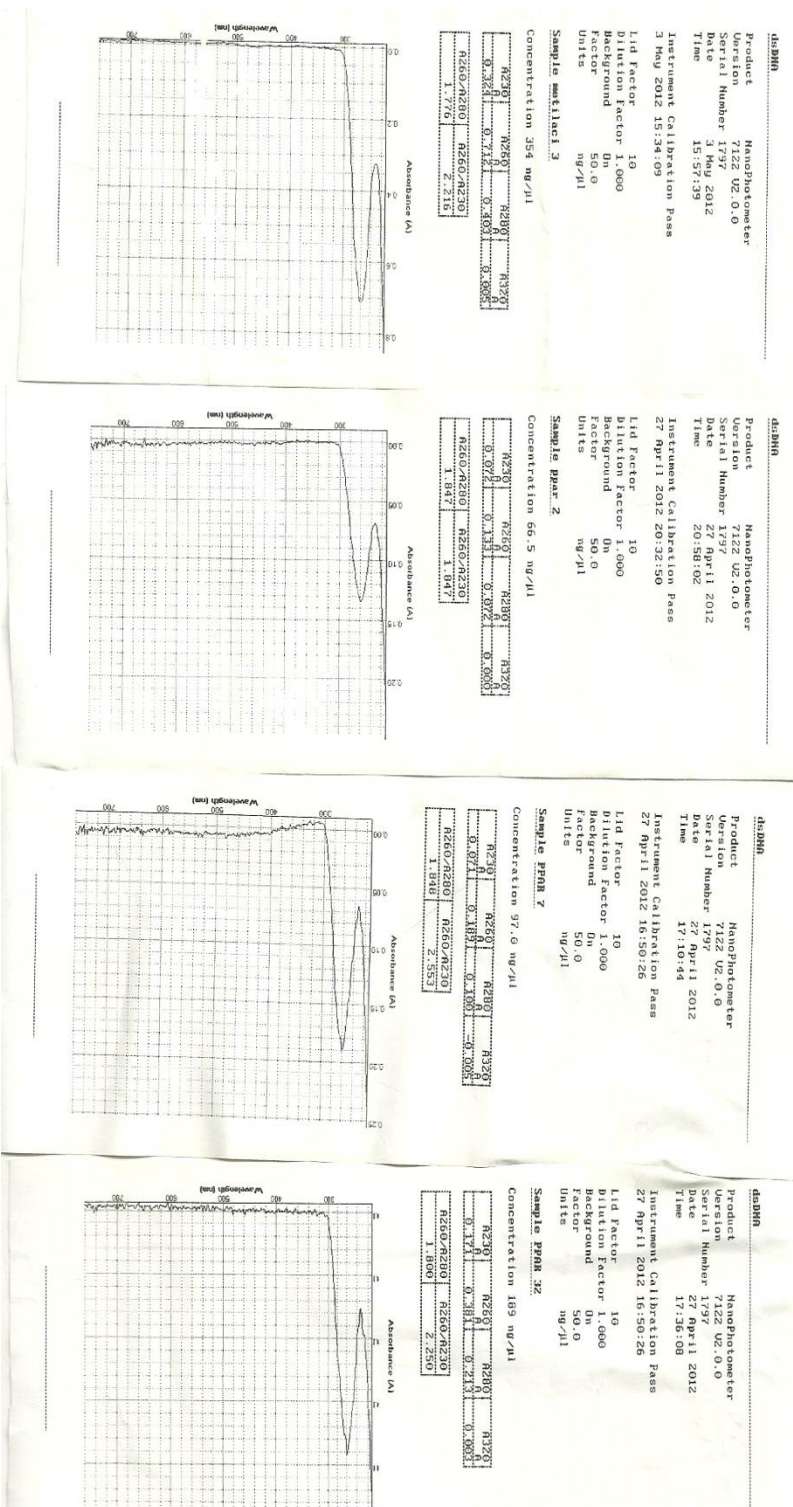
Alubia	Ración
Frijoles	½ taza
Garbanzo	½ taza
Haba	½ taza
Lenteja	½ taza

Grasas

No tienen hidratos de carbono

Acetite de oliva	Ración
Acetunas	1 cdita
Aguacate	6 piezas
Almendras	1/3 pieza
Cacahuates	1 ½ cda
Guacamole	1 ½ cda
Pepitas	2 cdas
Pistaches	1 ½ cda
Nuez	1 ½ cda
Semillas de girasol	1 ½ cda
Vinagreta	½ cdita

9.4. Anexo 4 Cuantificación de ADN (espectro)



9.5. Anexo 5

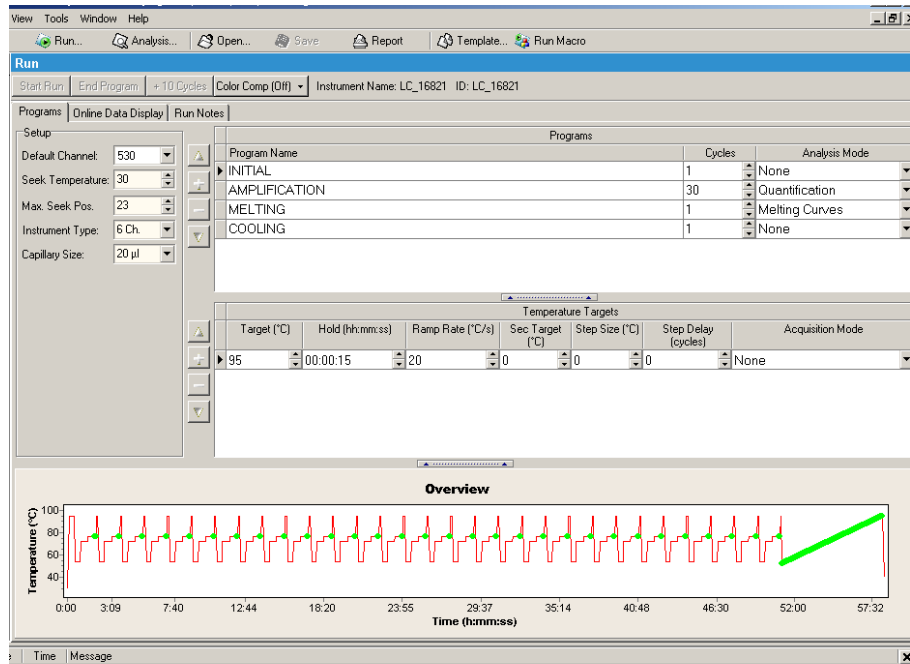
Conversión del ADN con bisulfito

- Se le agregó 20 µl de muestra de ADN a 130 µl de agente de conversión de CT en un tubo de PCR. Si se agregó el ADN purificado directamente en el volumen si era menor a 20 µl se compensó con agua inyectable.
- Se colocó el tubo de PCR en un termociclador programando los ciclos siguientes :
 - 98°C por 8 min
 - 64°C por 4.5 horas.
 - 4°C guardándolo por 20 horas con papel aluminio
- Se agregaron 600 µl de buffer M- de unión en una columna Zymo-spin y se colocó la columna en un tubo de recolección.
- Se agregó la muestra del paso dos en la columna Zymo-spin (que contiene el buffer M- unión). Se cerró la tapa mezclando e invirtiendo la columna hasta cinco veces y esperando por 2 minutos.
- Se centrifugó a velocidad máxima (10,000 rpm aproximadamente) por 30 segundos. Se desechó el fluido.
- Se adicionó 100 µl del buffer M-Wash a la columna y se centrifugó a velocidad máxima por 30 s.
- Se adicionó 200 µl de buffer M-Desulfonación a la columna y se dejó a temperatura ambiente (20-30 °C) por 18 min. Después de la incubación se centrifugó a velocidad máxima por 30 s.
- Se agregó 200 µl de buffer de lavado a la columna. Se centrifugó a velocidad máxima por 30 s. Adicionar otros 200 µl del buffer de lavado y se centrifugó por otros 30 s. a velocidad máxima.
- Se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 µl. Se adicionó 16 µl de buffer M-elution directamente a la matriz de la columna, centrifugando a 30 s a velocidad máxima para eluir el DNA.

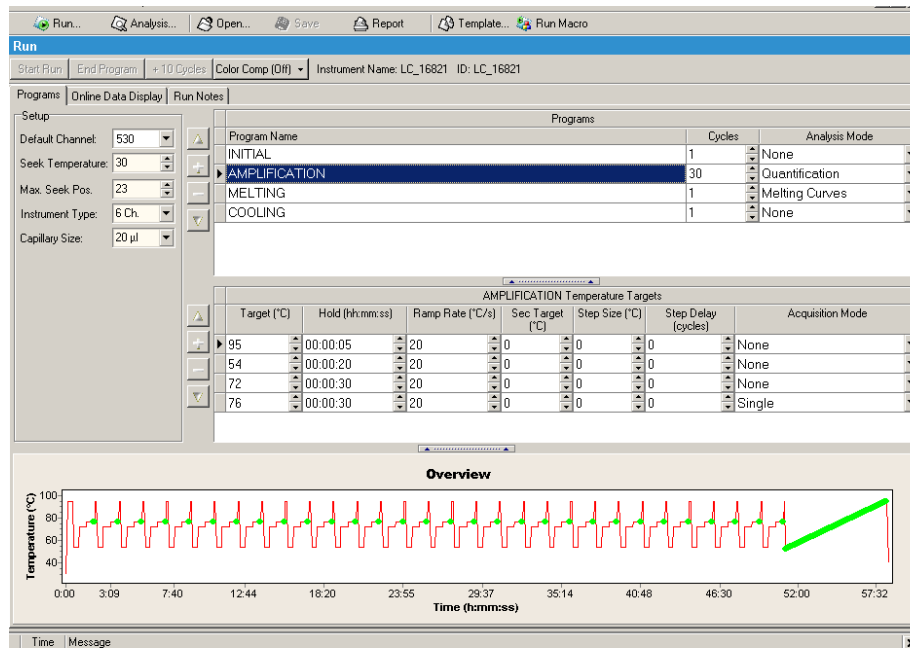
El ADN estuvo listo para su análisis inmediato o se almacena a -20°C para su posterior análisis. Para almacenar a largo plazo guardarlo a -70°C.

9.6 Anexo 6

Condiciones de PCR en tiempo real



11/PAC/10... PPARM3CONT181012
 alExor3 as System Admin Traceable



11/PAC/10... PPARM3CONT181012
 alExor3 as System Admin Traceable

Run

Start Run | End Program | +10 Cycles | Color Comp [Off] | Instrument Name: LC_16821 ID: LC_16821

Programs | Online Data Display | Run Notes

Setup

Default Channel: 530
 Seek Temperature: 30
 Max. Seek Pos.: 23
 Instrument Type: 6 Ch.
 Capillary Size: 20 µl

Program Name	Cycles	Analysis Mode
INITIAL	1	None
AMPLIFICATION	30	Quantification
MELTING	1	Melting Curves
COOLING	1	None

MELTING Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
52	00:00:00	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0.1	0	0	0	Continuous

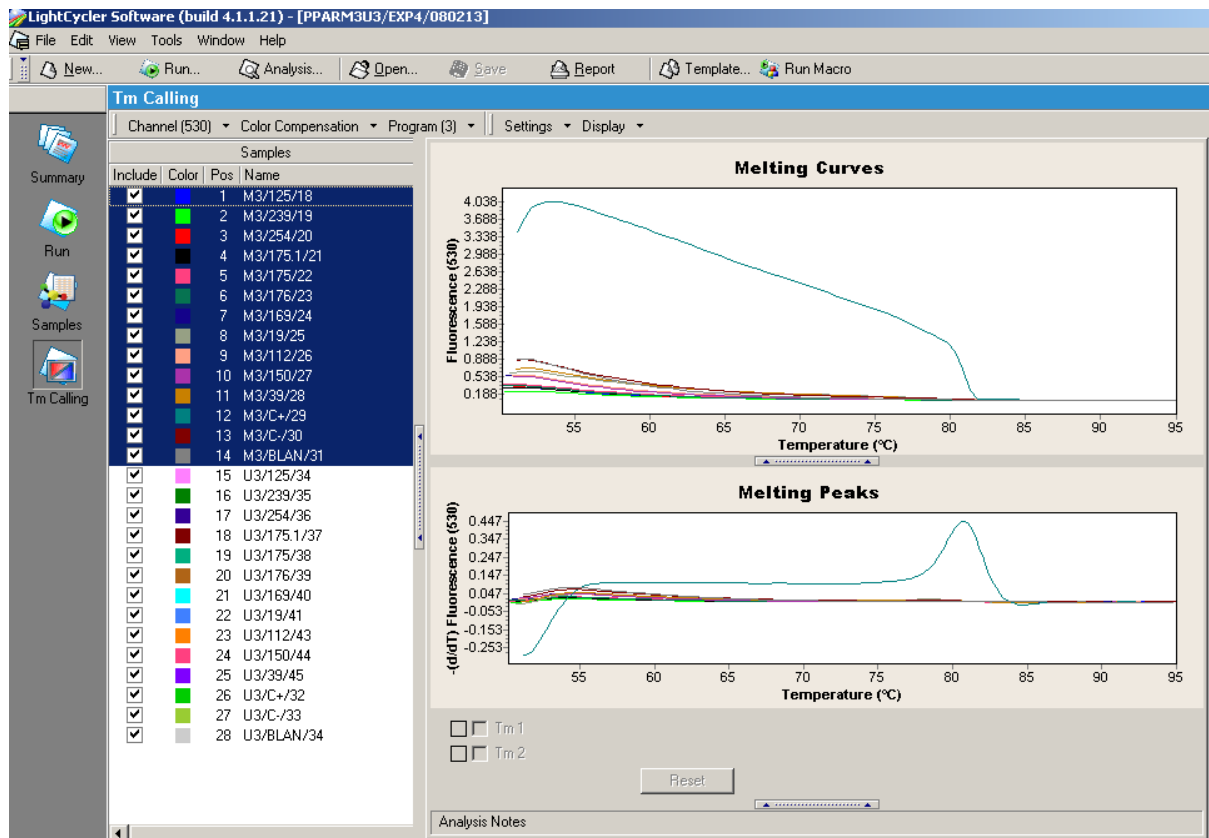
Overview

Time Message

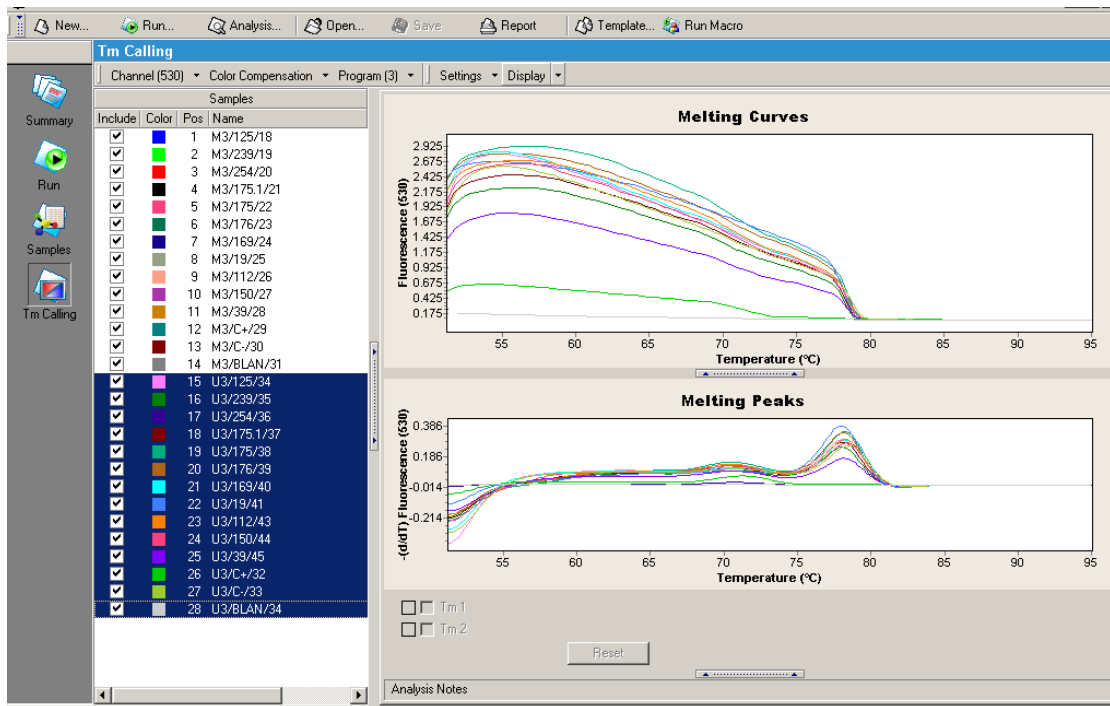
11/PAC/10... PPARM3CONT181012
 alExor3 as System Admin | Traceable

9.7 Anexo 7

Análisis realizado en PCR en tiempo real.



En esta imagen se observan las “melting curves” de 11 muestras de ADN de leucocitos, tratadas con bisulfito de sodio, de algunas participantes del estudio sometidas a PCR en tiempo real con los primers específicos para muestras metiladas. La gráfica superior indica el nivel de fluorescencia de las muestra durante una rampa de aumento de temperatura. La gráfica inferior muestra las derivadas de fluorescencia respecto a la temperatura; los picos de esta gráfica corresponden a la presencia de productos. Se incluyeron controles positivo y negativo, así como un blanco. Se observa que solo el control positivo generó un producto de amplificación.



En esta otra imagen se observan las mismas 11 muestras sometidas al tratamiento con bisulfito y amplificadas por PCR en tiempo real con los primers específicos para muestras no-metiladas; al igual que en la imagen anterior se manejaron controles positivo, negativo y blanco. Aquí se observa que todas las muestras amplifican excepto el control positivo y el blanco. En la gráfica de derivadas (abajo) se observan picos que amplificaron a menos de 70°C indicando la presencia de dímeros.