

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES DURANTE  
EL EMBARAZO, SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, LA FUNCION VASCULAR Y  
MODIFICACIONES EPIGENETICAS**

Clinical Trial Registration [NCT00872365]

**Jose Guillermo Ortega Avila**  
Bacteriólogo y Laboratorista Clínico  
Universidad del Valle

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Directora:  
**Ana Cecilia Aguilar de Plata, MSc**  
Facultad de Salud-Escuela de Ciencias Básicas  
Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia

Codirector:  
**Andres Orlando Castillo Giraldo PhD**  
Facultad de Salud-Escuela de Ciencias Básicas  
Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia

**Universidad del Valle**  
**Facultad de Salud**  
**Escuela de Ciencias Básicas-Facultad de Salud**  
**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**2014**

## RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue posible gracias a la financiación de COLCIENCIAS, la FES División Salud y la UNIVERSIDAD DEL VALLE y la ejecución del Grupo de Nutrición de la UNIVERSIDAD DEL VALLE

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las gestantes participantes del proyecto y a las instituciones de salud de la ESE Ladera de Santiago de Cali.

Agradezco a profesores, estudiantes (compañeros y amigos), personal auxiliar técnico y administrativo miembros del Grupo de Nutrición y del Laboratorio de Proteínas y Enzimas, a quienes siempre reservare un especial aprecio y agradecimiento.

También agradezco el apoyo de la Dra. Victoria Lunyak quien me acogió en su laboratorio durante mi pasantía en el “Buck Institute for Research on Aging” (Novato, California) y me ayudo a complementar mi trabajo tesis y formación doctoral

A la Facultad de Salud de la Pontificia Universidad Javeriana-Cali, por otorgarme el tiempo para poder realizar mi pasantía y culminar mi tesis doctoral.

Agradezco a los profesores Mildrey Mosquera por la coordinación técnico-administrativa y Andres Castillo por su labor como co-tutor y asesor del trabajo científico.

A la Dra Cecilia de Plata mi tutora, maestra y ejemplo, quien me tuvo paciencia y confianza durante los momentos difíciles de este trabajo.

## DEDICATORIA

A mi familia, hermanos, a Maria Fernanda, a quienes me acompañaron en este largo camino y en especial a mi madre, quien hoy no puede acompañarme, pero siempre tuvo confianza en que podía culminar este trabajo.

## Reconocimientos

Los resultados presentados en esta memoria de Tesis recibieron reconocimientos académicos en los siguientes eventos científicos:

1. Primer Lugar. Modalidad comunicación oral. Premio Institucional a la Excelencia Científica Categoría Grupos de Investigación. XXIII Congreso Colombiano de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Cartagena. 2010.
2. Primer Lugar. Modalidad comunicación oral. XXVIII Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología, Cali. 2010.
3. Tercer Lugar. Modalidad comunicación oral. Concurso “José Félix Patiño” XXIV. Congreso Anual Avances en Metabolismo y Soporte Nutricional, Cali. 2010.

## PUBLICACIONES

**Jose Guillermo Ortega Ávila**, Isabella Echeverri, Cecilia Aguilar de Plata, Andrés Castillo  
Impact of oxidative stress during pregnancy on fetal epigenetic patterns and early origin of vascular diseases Nutrition Reviews. 2015,73(1)12-21;DOI: 10.1093/nutrit/nuu001.

“No se puede motivar a nadie para hacer un buen trabajo si no tiene un buen trabajo para hacer”  
(Frederick Herzberg)

## TABLA DE CONTENIDIO

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN .....                                                                          | 15 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....                                        | 17 |
| HIPOTESIS.....                                                                         | 19 |
| OBJETIVOS GENERALES .....                                                              | 20 |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS.....                                                             | 21 |
| MARCO TEÓRICO .....                                                                    | 22 |
| Funcion endotelial y adipoquinas durante el embarazo.....                              | 25 |
| Estrés oxidativo durante el embarazo .....                                             | 27 |
| Micronutrientes antioxidantes durante la gestación.....                                | 29 |
| Estrés oxidativo y patrones epigenéticos <i>in útero</i> . .....                       | 31 |
| Programacion intrauterina y ARNs largos no codificantes.....                           | 37 |
| Racionalidad en el desarrollo de un suplemento con micronutrientes antioxidantes ..... | 39 |
| DISEÑO METODOLOGICO.....                                                               | 43 |
| Población y muestra:.....                                                              | 43 |
| Tipo de estudio.....                                                                   | 43 |
| Tamaño de muestra .....                                                                | 44 |
| Diseño del estudio.....                                                                | 44 |
| Consideraciones Éticas .....                                                           | 44 |
| Diseño y estabilidad del suplemento con antioxidantes .....                            | 45 |
| Proceso de captación de las participantes .....                                        | 45 |
| Criterios de inclusión.....                                                            | 45 |
| Criterios de exclusión .....                                                           | 46 |
| Aleatorización y enmascaramiento de las primigestantes .....                           | 47 |
| Grupos del estudio .....                                                               | 47 |
| Seguimiento de las gestantes.....                                                      | 48 |
| Toma de muestras.....                                                                  | 48 |

|                                                                                                                           |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Variables resultado (Independientes) .....                                                                                | 48     |
| Covariables: .....                                                                                                        | 49     |
| Evaluación nutricional y medidas antropométricas maternas.....                                                            | 49     |
| Antropometría neonatal .....                                                                                              | 50     |
| Toma de tensión arterial.....                                                                                             | 50     |
| Muestras de sangre.....                                                                                                   | 50     |
| Muestra de cordón umbilical .....                                                                                         | 50     |
| Evaluación de la función endotelial materna.....                                                                          | 50     |
| Determinación por HPLC concentración de malondialdehído en plasma .....                                                   | 51     |
| Proteína C reactiva de alta sensibilidad .....                                                                            | 53     |
| Determinación de los niveles de adiponectina y leptina plasmática. ....                                                   | 53     |
| Extracción de células endoteliales de vena de cordón umbilical.....                                                       | 54     |
| Cultivo de las células endoteliales .....                                                                                 | 55     |
| Determinación de óxido nítrico (NO <sup>•</sup> ) en cultivo .....                                                        | 55     |
| Cuantificación de proteínas en células endoteliales.....                                                                  | 56     |
| Nivel de expresión de eNOS y ARG2 .....                                                                                   | 56     |
| Inmunofluorescencia para Nrf2, PGC1A y CD31.....                                                                          | 57     |
| Determinación de anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....                                                     | 58     |
| Extracción del ADN de placenta .....                                                                                      | 60     |
| Determinación de la metilación en ADN placentario.....                                                                    | 60     |
| Extracción ARN de placenta .....                                                                                          | 64     |
| Diseño de primers para RT-PCR .....                                                                                       | 64     |
| RT-PCR para ARNs largos no codificantes (lncRNAs).....                                                                    | 65     |
| Análisis estadístico .....                                                                                                | 66     |
| <br>CAPÍTULO 1. ANALISIS DE LA ALEATORIZACION, DESERCIÓN EXPERIMENTAL Y<br>ADHERENCIA AL TRATAMIENTO .....                | <br>67 |
| Análisis de la Aleatorización.....                                                                                        | 67     |
| Análisis de la deserción experimental.....                                                                                | 70     |
| Análisis de la adherencia al tratamiento.....                                                                             | 70     |
| <br>CAPITULO 2. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES<br>SOBRE LA FUNCION ENDOTELIAL MATERNA..... | <br>73 |

|                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA LOS NIVELES DE MALONDIALDEHIDO EN PLASMA MATERNO .....                                                                          | 80  |
| CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA LOS NIVELES DE LEPTINA, ADIPONECTINA .....                                                                                      | 85  |
| CAPITULO 5. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA FUNCION ENDOTELIAL NEONATAL .....                                                                                               | 92  |
| Expresión proteica de eNOS y ARG2 .....                                                                                                                                                                            | 93  |
| Determinación del anión superoxido .....                                                                                                                                                                           | 94  |
| Expresión proteica de PGC1A y Nrf2 .....                                                                                                                                                                           | 96  |
| CAPÍTULO 6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA EXPRESION DE ARNs LARGOS NO CODIFICANTES Y LA METILACION DE REGIONES PROMOTORAS RELACIONADAS CON ANGIOGENESIS EN PLACENTA ..... | 99  |
| Expresión de ARNs largos no codificantes .....                                                                                                                                                                     | 99  |
| Metilación de genes relacionados con angiogénesis en placenta. ....                                                                                                                                                | 103 |
| CAPÍTULO 7. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y MEDICIONES ANTROPOMETRICAS NEONATALES .....                                                                  | 107 |
| FORTALEZAS Y DEBILIDADES DEL ESTUDIO.....                                                                                                                                                                          | 112 |
| CONCLUSIONES .....                                                                                                                                                                                                 | 114 |
| PERSPECTIVAS.....                                                                                                                                                                                                  | 115 |
| REFERENCIAS .....                                                                                                                                                                                                  | 117 |
| ANEXOS.....                                                                                                                                                                                                        | 148 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Gradiente de concentración de la fase móvil para la separación y detección de la 2-OH-E+.....                                                                                    | 59  |
| <b>Tabla 2.</b> Listado de genes evaluados mediante el EpiTect Methyl II PCR System.....                                                                                                         | 61  |
| <b>Tabla 3.</b> Volúmenes para digestión del ADN con las enzimas de restricción . .....                                                                                                          | 61  |
| <b>Tabla 4.</b> Cebadores para RT-PCR. ....                                                                                                                                                      | 65  |
| <b>Tabla 5.</b> Parámetros antropométricos y hemodinámicos basales de las primigestantes.....                                                                                                    | 67  |
| <b>Tabla 6.</b> Consumo de nutrientes de las embarazadas al inicio del estudio. ....                                                                                                             | 69  |
| <b>Tabla 7.</b> Análisis de la adherencia al tratamiento .....                                                                                                                                   | 71  |
| <b>Tabla 8.</b> Adherencia al tratamiento por percentiles .....                                                                                                                                  | 71  |
| <b>Tabla 9.</b> Análisis por intención de tratamiento de la VMF .....                                                                                                                            | 74  |
| <b>Tabla 10.</b> Parámetros antropométricos y hemodinámicos maternos post intervención.....                                                                                                      | 75  |
| <b>Tabla 11.</b> Tertiles de adherencia de la media y el Intervalo de confianza (IC) para el % $\Delta$ VMF y la VMFn post-intervención.....                                                     | 77  |
| <b>Tabla 12.</b> Concentración de MDA en plasma materno. ....                                                                                                                                    | 82  |
| <b>Tabla 13.</b> Correlaciones del MDA materno basal y post-intervención por grupos con otras variables maternas.....                                                                            | 84  |
| <b>Tabla 14.</b> Concentración de adiponectina total, leptina y CRP en plasma materno en el grupo control y grupo suplementado con antioxidantes.....                                            | 85  |
| <b>Tabla 15.</b> Correlación de la adiponectina con variables antropométricas, de función endotelial y bioquímicas maternas en el grupo control y el grupo suplementado con antioxidantes. ....  | 87  |
| <b>Tabla 16.</b> Correlación de la concentración de Leptina basal (ng/mL) y post-intervención semanas (28-32) con variables antropométricas, de función endotelial y bioquímicas maternas . .... | 90  |
| <b>Tabla 17.</b> Porcentaje de metilación en regiones promotoras en placenta. ....                                                                                                               | 103 |

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 19.</b> Correlaciones de MDA en cordón umbilical con variables antropométricas neonatales y placentarias. .... | 109 |
| <b>Tabla 20.</b> Indicadores de antropometría fetal por grupos. ....                                                    | 109 |
| <b>Tabla 21.</b> Indicadores de antropometría fetal por grupos y sexo del recién nacido. ....                           | 110 |

## LISTADO DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Biomarcadores de estrés oxidativo durante el embarazo y el post-parto normal. ....                                                                  | 28  |
| <b>Figura 2.</b> Modelo de efecto global de los RLO sobre la metilación <i>de novo</i> y el mantenimiento de los patrones de metilación establecidos en el ADN. .... | 33  |
| <b>Figura 3.</b> Influencia del estrés oxidativo sobre la vías de síntesis de la SAM. ....                                                                           | 35  |
| <b>Figura 4.</b> Mapa de las comunas de la ciudad de Santiago de Cali. ....                                                                                          | 43  |
| <b>Figura 5.</b> Formación del naftodiazepinium a pH ácido. ....                                                                                                     | 51  |
| <b>Figura 8.</b> Esquema de placa del PCR array. ....                                                                                                                | 62  |
| <b>Figura 9.</b> Diagrama de progresión del ensayo clínico. ....                                                                                                     | 67  |
| <b>Figura 10.</b> Comparación intra e intergrupos de la VMF antes y después de las intervenciones. ....                                                              | 76  |
| <b>Figura 11.</b> Cuantificación del MDA total en plasma materno por HPLC. ....                                                                                      | 81  |
| <b>Figura 12.</b> Niveles plasmáticos de MDA materno, antes (basal) y después de (10-12 semanas) de la intervención con antioxidantes. ....                          | 82  |
| <b>Figura 13.</b> Niveles plasmáticos de adipocinas en plasma materno. ....                                                                                          | 86  |
| <b>Figura 14.</b> Determinación de NO <sup>•</sup> en células endoteliales por HPLC. ....                                                                            | 93  |
| <b>Figura 15.</b> Expresión de proteína de eNOS y ARG2. ....                                                                                                         | 94  |
| <b>Figura 16.</b> Determinación de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> en células endoteliales por HPLC. ....                                                               | 95  |
| <b>Figura 17.</b> Expresión proteica de PGC1A y Nrf2 por inmunofluorescencia. ....                                                                                   | 96  |
| <b>Figura 18.</b> Expresión de lncRNAs relacionados con imprinting en placenta. ....                                                                                 | 100 |

|                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 19.</b> Esquema del locus DLK1-DIO3 en el cromosoma 14 humano. ....        | 101 |
| <b>Figura 20.</b> Loci del gen de leptina. ....                                      | 104 |
| <b>Figura 21.</b> Concentración de MDA en plasma de sangre de cordón umbilical ..... | 107 |

## ANEXOS

|                                                                                                                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Anexo 1.</b> Registro del ensayo clínico en clinical trials.....                                                                                            | 148  |
| <b>Anexo 2.</b> Acta del comité de ética humana.....                                                                                                           | 149  |
| <b>Anexo 3.</b> Consentimiento informado para mayores de edad .....                                                                                            | 151  |
| <b>Anexo 4.</b> Analisis de estabilidad del suplemento .....                                                                                                   | 154  |
| <b>Anexo 5.</b> Formato de captacion participantes.....                                                                                                        | 155  |
| <b>Anexo 6.</b> Formato de valoración ginecológica .....                                                                                                       | 156  |
| <b>Anexo 7.</b> Formato de asistencia a las pruebas del estudio.....                                                                                           | 157  |
| <b>Anexo 8.</b> Bloques de aleatorización.....                                                                                                                 | 158  |
| <b>Anexo 9.</b> Formato de seguimiento consumo del suplemento.....                                                                                             | 160  |
| <b>Anexo 10.</b> Formato de registro datos VMF .....                                                                                                           | 161  |
| <b>Anexo 11.</b> Consumo de nutrientes de las embarazadas al inicio del estudio.....                                                                           | 162  |
| <b>Anexo 12.</b> Correlaciones entre el $\% \Delta \text{VMF}$ y el EFE por grupos .....                                                                       | 1623 |
| <b>Anexo 13.</b> Imágenes cultivo de las células endoteliales .....                                                                                            | 164  |
| <b>Anexo 14.</b> Mapas génicos de lncRNAs evaluados por RT-PCR en placenta.....                                                                                | 165  |
| <b>Anexo 15.</b> Metilación en placenta de las regiones promotoras de genes relacionados con angiogenesis y biodisponibilidad del NO .....                     | 167  |
| <b>Anexo 16.</b> Tabla de correlaciones del malondialdehído plasmático de sangre de cordón umbilical con variables maternas en primer y tercer trimestre ..... | 168  |
| <b>Anexo 17.</b> Tabla análisis de las variables morfométricas de la placenta .....                                                                            | 169  |

## SIGLAS

ARE: Elemento de Respuesta Antioxidante  
ARG2: Arginasa-2  
CPR: Proteína C reactiva (siglas en ingles)  
DABB: Diámetro de la Arteria Braquial Basal  
DAN: Diaminonaftaleno  
DMR: Región diferencialmente metilada  
DNMT: DNA Metil transferasa  
ECNT: Enfermedades Crónicas No transmisibles  
ECV: Enfermedad Cardiovascular  
eNOS: Óxido Nítrico Sintasa endotelial  
EO: Estrés oxidativo.  
GNAS-AS1: RNA antisentido GNAS  
GSH: Glutatión reducido  
HE: Hidroetidina  
HMT: Histona Metil Transferasa  
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.  
HUVEC: Células endoteliales de la vena de cordón umbilical.  
IMC: Índice de masa corporal  
IPW: *"imprinting"* gen del Síndrome de Prader Willi  
KCNQ10T1: KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1  
lncRNA: ARN largos no codificantes.  
MAGI2-AS3: RNA antisentido 3 MAGI2  
MDA: Malondialdehído  
MEG3: Gen maternalmente expresado 3  
MEG8: Gen maternalmente expresado 8  
ncRNA: ARN no codificantes  
NO<sup>•</sup>: Óxido Nítrico  
Nrf2: Factor 2 relacionado con el factor 2 derivado del factor nuclear eritroide.  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PGC1A: Coactivador del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas  
RCIU: Retardo en el crecimiento intrauterino.  
RLO: Radicales libres de Oxígeno.  
SAM: S-adenosil Metionina  
VMF: Vasodilatación Mediada por Flujo

## RESUMEN

**Introducción:** La función vascular materna es considerada un factor crítico para el apropiado desarrollo del embarazo y el feto, esta función puede ser modificada por el desarrollo de estados de estrés oxidativo que pueden cambiar el funcionamiento del endotelio. Estudios observacionales durante embarazos normales han reportado un incremento fisiológico de varios biomarcadores de estrés oxidativo, sin embargo el exceso de radicales libres de oxígeno también ha sido relacionado con disfunción endotelial materna, disminución de la actividad del Óxido Nítrico (NO<sup>•</sup>) y alteraciones en el desarrollo fetal. Estudios recientes han mostrado que el desarrollo durante el embarazo de condiciones asociadas con estrés oxidativo intrauterino puede aumentar el riesgo para presentar enfermedades crónicas como las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) durante la etapa adulta. Dentro de los mecanismos propuestos para explicar este hallazgo, se ha sugerido que adaptaciones epigénéticas intrauterinas como la metilación de citosinas y/o cambios en la expresión de ARNs largos no codificantes podrían estar involucrados. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del consumo de un suplemento con micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre la función vascular materna y neonatal, así como estudiar su efecto sobre cambios epigénéticos en la metilación de promotores y expresión de ARNs largos no codificantes en placenta.

**Metodología:** Ensayo clínico controlado aleatorizado enmascarado. Se reclutaron 203 primigestantes entre las semanas 16-20 de gestación que fueron asignadas de forma aleatoria a un grupo control (n=101) que recibió un placebo y un grupo suplementado con antioxidantes (n=102). El día de la aleatorización y post- intervención (32-36 semanas de gestación) la función vascular se midió a través de la Vasodilatación Mediada por Flujo (VMF). También se tomaron medidas antropométricas maternas (peso, talla, pliegues cutáneos) y muestras de sangre para determinar los niveles de malondialdeído (MDA), leptina, adiponectina y proteína C reactiva. En el parto se tomaron medidas antropométricas (peso, talla, índice ponderal, perímetro abdominal y cefálico) y de salud neonatal (APGAR). En sangre de cordón umbilical se midió la concentración de MDA. La función endotelial neonatal se determinó en cultivo de células endoteliales a través de la producción de NO<sup>•</sup>, anión superóxido, la expresión proteica de la eNOS, ARG2, PGC1A y Nrf2. En placenta se cuantificó la expresión de ocho ARNs largos no codificantes que se expresan de alelos

maternos y también se midió la metilación de 22 regiones promotoras de genes relacionados con la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup> y procesos angiogénicos.

**Resultados principales :** Después de  $\approx$  12 semanas de intervención el % $\Delta$ VMF y la VMF normalizada (VMFn) fueron significativamente menores en el grupo suplementado con antioxidantes ( $p=0,022$  y  $p=0,066$  respectivamente), este resultado fue independiente del tercil de adherencia al tratamiento. Los niveles de MDA post-intervención entre los grupos no fueron diferentes ( $p=0,602$ ). La intervención no mostró efectos sobre los niveles de leptina, adiponectina, y proteína C ( $p>0,05$ ). En placenta se encontró una menor expresión de los ARNs largos no codificantes MEG3 y MEG8 ( $p=0,027$  y  $p=0,001$  respectivamente) y aumento en la metilación del promotor de leptina en el grupo tratado con antioxidantes ( $p= 0,041$ ). Las células endoteliales del grupo suplementado mostraron una mayor producción de NO<sup>•</sup> ( $p=0,003$ ) y una mayor expresión proteica de PGC1A y Nrf2 ( $p=0,003$  y  $p=0,00001$  respectivamente). En la antropometría fetal se encontró un mayor índice ponderal en recién nacidos en el grupo suplementado ( $p=0,019$ ) asociado principalmente con el sexo masculino de los neonatos ( $p= 0,029$ ). No se presentaron diferencias significativas por efectos adversos entre grupos durante el embarazo.

**Conclusiones:** El presente estudio contrario a lo esperado encontró que el tratamiento con micronutrientes antioxidantes se asocia con una reducción de la VMF materna en el tercer trimestre de gestación. Esto puede indicar que un consumo elevado de antioxidantes durante este período en gestantes sanas probablemente incremente el riesgo de desarrollar disfunción vascular. A nivel placentario, la suplementación se asoció con cambios epigenéticos como una menor expresión del gen MEG3, el cual ha sido asociado con la regulación de procesos angiogénicos y de proliferación celular. El perfil observado en las células endoteliales puede estar asociado con una mayor biodisponibilidad de NO<sup>•</sup> y un mejor control del estrés oxidativo celular, aunque hay que tener cautela por el número de muestras analizadas. El incremento del índice ponderal observado en el grupo suplementado posiblemente se relacione con un mejoramiento en la nutrición fetal dado el bajo porcentaje de adecuación de micronutrientes en las gestantes, aunque no se puede descartar un efecto sobre el estrés oxidativo fetal.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de morbi-mortalidad en el mundo<sup>1,2</sup>. Se proyecta que las muertes por causa de las ECV continúen aumentando en los próximos años, y esta tendencia se observa en todos los países sin importar su grado de desarrollo económico. Por esta razón, el impacto social y económico de las ECV es alto y las acciones encaminadas a su prevención son una prioridad dentro de las políticas de salud pública.

Desde hace aproximadamente 30 años se conoce que el ambiente intrauterino del feto puede influenciar el desarrollo de las Enfermedades Crónicas No Trasmisibles (ECNT) en la etapa adulta<sup>3</sup>. Esto ha llevado a proponer que durante el desarrollo fetal se “programa” el funcionamiento y/o la respuesta de tejidos y órganos a diferentes estímulos ambientales, y que esta programación puede aumentar el riesgo de desarrollar una enfermedad en la vida postnatal.

Aun cuando todavía no se conocen exactamente los mecanismos que llevan a la programación de ECV *in utero*, estudios experimentales sugieren que mecanismos epigenéticos están implicados. Se ha propuesto, que el establecimiento de la impronta epigenética durante la etapa fetal es susceptible de ser modificada durante la vida intrauterina (reprogramación) por factores ambientales, permitiéndole a los tejidos del feto responder y adaptarse de manera dinámica. Sin embargo, los cambios a nivel epigenético no solo se establecen durante períodos críticos de la gestación sino también en la etapa postnatal temprana<sup>4</sup>. Es posible que alteraciones en procesos epigenéticos en células somáticas y/o células madres durante el desarrollo fetal, un período de alta proliferación celular pueda alterar la expresión y función de ciertos genes de forma permanente y convertirse en un factor de riesgo para ciertas enfermedades en la vida adulta como las ECV.

En este orden de ideas, se ha propuesto que el estrés oxidativo puede estar involucrado de manera directa e indirecta en el establecimiento de los patrones epigenéticos *in utero*. El estrés oxidativo se produce como resultado del aumento en la producción de Radicales Libres de Oxígeno (RLO) y/o por una insuficiente capacidad antioxidante celular para neutralizar estos radicales. Los RLO son especies químicas usualmente producidas a bajas concentraciones en diferentes procesos metabólicos que se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados altamente reactivos que pueden modificar diferentes tipos de moléculas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Los RLO de forma directa y en períodos críticos del desarrollo fetal, pueden modificar bases nitrogenadas como la guanina, llevando a la pérdida de sitios de metilación dentro del ADN generando epimutaciones. Por otro lado, de forma indirecta los RLO pueden inducir cambios

epigenéticos específicos mediante el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina a ciertas regiones del genoma. El estrés oxidativo indirectamente también puede inducir cambios epigenéticos globales en la metilación de Histonas y del ADN al reducir la disponibilidad de sustratos necesarios para el mantenimiento del proceso de metilación del genoma. Lo anterior, debido a que tanto las vías metabólicas encargadas de sintetizar moléculas antioxidantes (Ej. el glutatión) en respuesta al estrés oxidativo, como también de proveer donantes de grupos metilo para la metilación comparten sustratos como la S-adenosil metionina.<sup>5</sup>

Una característica común de las ECV es el desarrollo de disfunción endotelial la cual se presenta incluso antes de la manifestación clínica de la enfermedad y como tal se considera un marcador de riesgo para el desarrollo de enfermedades vasculares. En condiciones fisiológicas saludables, el endotelio produce moléculas vasodilatadoras, antiinflamatorias, antitrombóticas y antiproliferativas. Entre las sustancias vasodilatadoras más importantes producidas por las células endoteliales están: el óxido nítrico (NO<sup>•</sup> : siglas en inglés) un gas producido por la Sintasa de Óxido Nítrico endotelial (eNOS: Siglas en inglés) y considerado como el principal mediador de la homeostasis vascular. Cuando el endotelio pierde estas propiedades, se habla de disfunción endotelial.

Modelos de restricción nutricional que generan estados de estrés oxidativo durante la gestación en mamíferos, han mostrado que las crías presentan disfunción endotelial temprana<sup>6</sup>. En humanos se conoce que la disfunción endotelial puede ser programada e iniciada *in útero*, aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares en la etapa adulta. Sin embargo, se desconocen cuáles son los mecanismos moleculares que favorecen su desarrollo.

Este trabajo se propuso estudiar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre el estrés oxidativo, la función vascular materna y neonatal así como su relación con otros mediadores del estrés oxidativo y función vascular. También se propuso estudiar, si la intervención con antioxidantes puede modificar la expresión de ARNs largos no codificantes y la metilación de citosinas en regiones promotoras de genes relacionados con la función endotelial y angiogénesis en placenta.

## **HIPOTESIS**

1. La función vascular y el estrés oxidativo materno y neonatal pueden ser modulados positivamente por el consumo de micronutrientes antioxidantes durante la gestación.
2. La suplementación con micronutrientes antioxidantes durante el embarazo altera el grado de metilación de regiones promotoras en genes relacionados con biodisponibilidad del NO<sup>•</sup> y angiogénesis en placenta y la expresión de ARNs largos no codificantes.

## **OBJETIVOS GENERALES**

1. Evaluar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre la función endotelial y el estrés oxidativo materno y neonatal.
2. Evaluar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación, sobre modificaciones epigénéticas de genes relacionados con angiogénesis y la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup>.

Estos objetivos están enmarcados dentro de la línea de investigación del Grupo de Nutrición de la Universidad del Valle que pretende esclarecer los mecanismos biológicos asociados a la programación fetal de ECNT.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre la función endotelial y el estrés oxidativo materno y neonatal.
2. Evaluar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre la metilación en regiones promotoras de genes relacionados con la angiogénesis y la biodisponibilidad del óxido nítrico en placenta.
3. Determinar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre la expresión de ARNs largos no codificantes en genes *"imprinting"* en tejido placentario.
4. Establecer el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre biodisponibilidad del óxido nítrico y la expresión proteica de los genes eNOS, ARG2, PGC1A y NFR2 en células endoteliales.
5. Evaluar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre covariables maternas y neonatales (vía del parto, edad gestacional antropometría materna y neonatal, sexo del neonato) con la función endotelial.

## MARCO TEÓRICO

### PROGRAMACIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL *in útero* y DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La alta prevalencia a nivel mundial de las ECV y su curso prolongado, imponen un alto costo tanto económico como social para la población. Una característica común de las ECV es el desarrollo de disfunción endotelial, incluso antes de que se presenten las manifestaciones clínicas, y se considera como un marcador de riesgo independiente para ECV y de eventos cardiovasculares adversos<sup>7,8</sup>. El endotelio al parecer, tiene una mayor susceptibilidad a las alteraciones metabólicas y por lo tanto la disfunción endotelial es uno de las primeras alteraciones que se detectan.<sup>9</sup>

Durante la gestación ocurren adaptaciones vasculares maternas que permiten suplir las demandas fetales de oxígeno y de nutrientes, por lo cual el desarrollo fetal parece estar estrechamente condicionado por la función vascular materna. Varios de los cambios fisiológicos inducidos por el embarazo en el sistema vascular, como la disminución de la presión sanguínea y la resistencia vascular periférica, son mediados por un aumento en vasodilatación dependiente del endotelio, así como por el incremento en la producción de NO<sup>\*</sup> por este tejido<sup>10,11</sup>. Khan F *et al*<sup>12</sup>, reportaron una correlación inversa, entre la resistencia microvascular materna en el segundo trimestre del embarazo (semana 22) con los centiles de peso al nacer. De otra parte, Elvan *et al*<sup>13</sup>, hallaron en mujeres normotensas, asociación entre la rigidez vascular materna en el tercer trimestre del embarazo con el peso al nacer. Veas *et al*<sup>14</sup>, encontraron una correlación negativa entre los niveles de marcadores de activación endotelial (sVCAM-1, sE-selectina, sFlt-1) en suero materno, con el peso al nacer y la producción de NO<sup>\*</sup> en células endoteliales de cordón umbilical. Estos reportes indican que el crecimiento y desarrollo fetal pueden estar influenciados directamente por la función vascular materna.

También, diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que alteraciones en el crecimiento *in útero* se asocian con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y también con el desarrollo de disfunción endotelial en personas aparentemente sanas. Por ejemplo, en niños y adultos jóvenes con antecedente de bajo peso al nacer, se ha encontrado disminución en la vasodilatación dependiente del endotelio<sup>15,16,17,18,19</sup>. Sin embargo, los mecanismos subyacentes al desarrollo de la disfunción endotelial aún se desconocen. Ligi *et al*<sup>20</sup>, encontraron una correlación directa entre el peso al nacer con la capacidad de proliferación y angiogénesis de células progenitoras endoteliales

extraídas de sangre de cordón umbilical. También, existe evidencia de que durante el embarazo tanto la desnutrición calórica o proteica<sup>21,22</sup> así como la hipoxia<sup>23,24</sup>, el tabaquismo<sup>25</sup> y los glucocorticoides<sup>26</sup> pueden alterar la función endotelial en la vida postnatal. Este efecto parece estar mediado en parte por la disminución en la producción y/o actividad del NO<sup>•</sup><sup>27,28</sup> y por el desarrollo de un estado de estrés oxidativo<sup>29,30</sup>,

La disfunción endotelial y la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup>, en diferentes modelos biológicos ha sido relacionada con alteraciones en la actividad de proteínas como la Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), la Arginasa 2 (ARG2), el Coactivador del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas (PGC-1 $\alpha$ ) y el Factor Nuclear Eritroide-2- Relacionado Con El Factor 2 (Nrf2).

La eNOS es una enzima que se expresa constitutivamente en las células endoteliales del sistema vascular y contribuye en el mantenimiento de la homeostasis y la regulación del tono vasomotor a través de la producción de NO<sup>•</sup> a partir de la L-arginina. En células endoteliales procedentes de vena de cordón umbilical de individuos con RCIU, se ha encontrado disminución en la expresión y actividad de eNOS, lo cual se ha asociado a una menor síntesis de NO<sup>•</sup><sup>31,32</sup>. En un modelo murino de restricción nutricional isocalórica durante la gestación, se encontró que las crías presentaban disfunción endotelial asociada al aumento en la producción de RLO y a la expresión de la eNOS en arterias mesentéricas.<sup>33</sup>

La arginasa 2 (ARG2) es una de las dos isoenzimas que se expresan en el endotelio y catalizan la conversión de la L-arginina en L-ornitina y urea. El aumento de la actividad de esta enzima ha sido relacionado con patologías vasculares asociadas con disminución en la producción de NO<sup>•</sup> como: hipertensión<sup>34</sup>, diabetes<sup>35</sup> y aterosclerosis<sup>36</sup>. La sobre-expresión de la ARG2 en modelos de mamíferos y cultivos celulares llevan a la disminución de la producción de NO<sup>•</sup> y al desacoplamiento de la eNOS, con el subsiguiente aumento en la producción de RLO<sup>37</sup>. En células endoteliales de cordón umbilical se ha encontrado, que bajo condiciones de hipoxia, la expresión de la arginasa II se incrementa, lo cual se asocia a disminución de la expresión de la eNOS y producción de NO<sup>•</sup><sup>38</sup>. En células endoteliales extraídas de mujeres que desarrollaron preeclampsia, se ha reportado incremento en la expresión de la ARG2 junto con aumento en la producción de RLO.<sup>39</sup>

El Nrf2 es un factor de transcripción nuclear sensible al estado de óxido-reducción celular que tiene como sitios de reconocimiento secuencias de ADN en regiones promotoras denominadas Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE: siglas en ingles). Su unión a estos sitios induce la activación y/o de la expresión de genes que regulan la respuesta al estrés oxidativo en una amplia variedad de células, incluyendo las células endoteliales.<sup>40</sup> Ratones con disminución en la expresión del gen Nrf2 presentan deficiencia en la inducción de la expresión basal de genes antioxidantes, lo cual se asocia a un incremento del estrés oxidativo<sup>41</sup>. La activación del Nrf2 ha mostrado que revierte la disfunción endotelial inducida por la hiperglucemia prolongada<sup>42</sup> y es considerado un factor muy importante en la protección del endotelio frente a los ROS inducido por el estrés de fricción de la sangre<sup>43</sup>.

El PGC1 $\alpha$  es una proteína que actúa como un regulador maestro de diferentes señales intracelulares que regulan su transcripción, estabilidad y actividad biológica. Aunque en su estructura no posee dominios de reconocimiento para el ADN, sí posee la capacidad de unirse y activar distintos factores de transcripción para la regulación de diferentes regiones promotoras en la cromatina. En las células endoteliales la activación del PGC-1 $\alpha$  mediada por el NO<sup>\*</sup>, ha sido relacionada con la expresión y activación del sistema antioxidante mitocondrial.<sup>44</sup> Además, la activación del PGC-1 $\alpha$  induce la expresión de la Hemooxigenasa, una proteína de respuesta al estrés oxidativo<sup>45</sup>.

## **FUNCION ENDOTELIAL Y ADIPOQUINAS DURANTE EL EMBARAZO**

Algunos estudios han mostrado que la función endotelial puede ser regulada por proteínas plasmáticas derivadas del tejido adiposo a las que se les designa como adipoquinas. En humanos durante la gestación la desregulación de dos de estas proteínas, la adiponectina y la leptina han sido relacionadas con frecuencia con diferentes patologías vasculares. Los niveles de estas adipoquinas también han sido relacionados con diferentes biomarcadores de estrés oxidativo en otros grupos poblacionales, pero aún no se sabe si existe una relación causa efecto, adicionalmente se desconoce, si la suplementación con antioxidantes puede influenciar los niveles de estas adipoquinas durante el embarazo.

### **Adiponectina**

La adiponectina es la adipoquina secretada en mayor abundancia por el tejido adiposo a la sangre, representa alrededor del 0,001% de las proteínas plasmáticas con una concentración que oscila entre 3 a 30 ug/mL<sup>46</sup>. En su forma monomérica presenta 244 aminoácidos (30KDa), pero usualmente es secretada a circulación en forma de trímeros de bajo peso molecular (67KDa), hexámeros de peso molecular medio (136KDa) u oligómeros de alto peso (12-18 protómeros, 330KDa), cada una de estas formas ha mostrado actividades biológicas diferentes relacionadas aparentemente con su diversidad estructural<sup>47</sup>. Fisiológicamente la adiponectina es una hormona pleotrópica, relacionada principalmente con el incremento de la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa. Algunos estudios han encontrado que la hipoadiponectinemia puede ser un predictor de la disfunción endotelial en arterias periféricas y coronaria, independiente de la sensibilidad a la insulina, el IMC y las dislipidemias<sup>48,49</sup>. Adicionalmente ha mostrado tener un efecto anti-inflamatorio en el endotelio al reducir la expresión de moléculas de adhesión celular como la E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 e inhibir la producción de la proteína C reactiva tras la estimulación con TNF- $\alpha$ <sup>50,51</sup>. También se ha observado que puede incrementar la producción y biodisponibilidad del NO $\cdot$ . Hattori *et al*<sup>52</sup>, encontraron que la estimulación de células endoteliales con adiponectina globular aumenta la expresión génica y la activación de la eNOS. En células HUVEC ha mostrado atenuar el estrés oxidativo inducido por moléculas como la LDL-oxidada o la hiperglucemia, e incrementa la capacidad de los sistemas antioxidantes endoteliales<sup>53,54</sup>. Motoshima *et al*<sup>55</sup>, también observaron en células HUVEC que la adiponectina reduce la producción de O $_2^{\cdot-}$  y aumenta la

actividad de la eNOS. Por lo tanto, mantener un nivel en sangre adecuado de esta hormona puede ser considerado como estado protector de la función vascular.

## **Leptina**

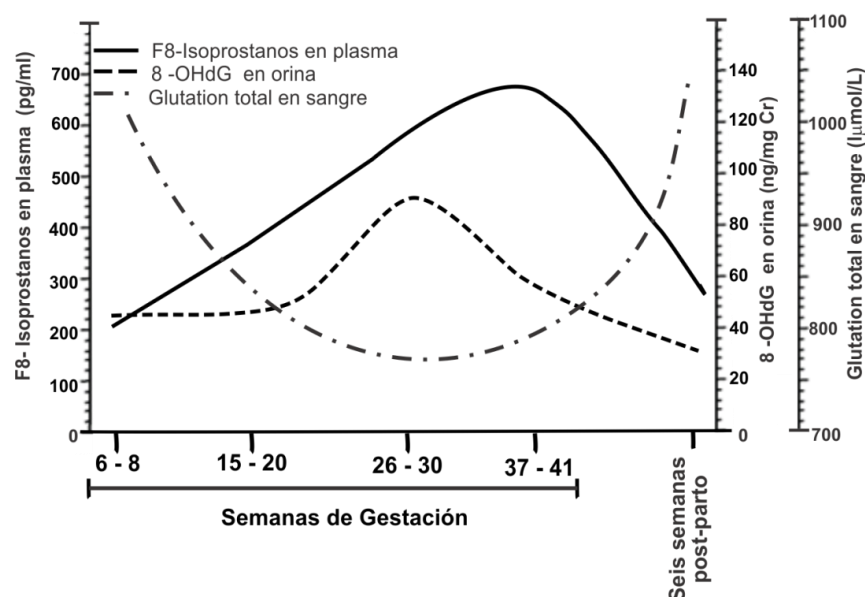
Leptina es una proteína de 167 aminoácidos (17 KDa) con efectos fisiológicos pleotrópicos, que ha sido relacionada con el desarrollo de diferentes condiciones patológicas durante el embarazo. Aunque es sintetizada fundamentalmente por el tejido adiposo blanco, hay evidencia en humanos de que el gen también es expresado durante la gestación en la placenta<sup>56</sup> y que este tejido podría explicar una parte de la hiperleptinemia fisiológica (>10 ng/mL) que se desarrolla progresivamente a través del embarazo<sup>57</sup>. La sobreexpresión de leptina placentaria ha sido relacionada con el desarrollo de enfermedades vasculares como preclampsia severa<sup>58</sup>. El receptor para esta hormona ya ha sido identificado en la superficie de células endoteliales humanas<sup>59</sup>. A nivel vascular, la infusión aguda de leptina incrementa los niveles plasmáticos de metabolitos del NO<sup>•</sup> en una manera dependiente de la dosis<sup>60</sup>. También se ha reportado que puede inducir vasodilatación dependiente del endotelio mediada por incremento del NO<sup>•</sup> en humanos<sup>61,62</sup> aunque este efecto vasodilatador en arterias coronarias es independiente del NO<sup>•</sup> y podría estar mediado por el EDHF<sup>63,64</sup>. Kimura *et al*<sup>65</sup>, observaron que el estímulo vasodilatador de la leptina es atenuado completamente tras el suministro del L-NAME un inhibidor de la sintasa de NO<sup>•</sup>. Por otro lado, Vecchione *et al*<sup>66</sup> demostraron en células endoteliales humanas que leptina puede inducir la activación de la eNOS por medio de la fosforilación del residuo de Ser<sup>1177</sup> de la enzima. En un estudio con embarazadas Chappell *et al*<sup>67</sup>, reportaron que la suplementación con vitamina C y E se relacionó con una disminución en la concentración de leptina en un 9% respecto al grupo placebo, aunque este hallazgo no alcanzó a ser significativo. Este estudio sugiere que el uso de antioxidantes podría modular los niveles de leptina durante el embarazo.

## ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE EL EMBARAZO

El embarazo normal se caracteriza por el aumento moderado y progresivo en los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo<sup>68,69,70</sup> (**Figura 1**) como los F2-Isoprostanos (el marcador más sensible de estrés oxidativo)<sup>71</sup>, y por disminución de moléculas antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol<sup>72</sup>. Sin embargo, niveles altos de marcadores de estrés oxidativo han sido frecuentemente asociados con algunas complicaciones del embarazo, como son: preclampsia<sup>73,74,75</sup>, la diabetes gestacional<sup>76,77</sup>, el retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU)<sup>78,79</sup> y la obesidad<sup>80</sup>. Incluso, se ha reportado en embarazos sin complicaciones una correlación entre el estrés oxidativo materno y disminución del peso al nacer en el neonato<sup>81,82</sup>. Min *et al*<sup>83</sup> reportaron asociación entre niveles altos de marcadores para estrés oxidativo materno a la mitad de la gestación, con un mayor riesgo de baja talla y bajo peso al nacer. Adicionalmente, la excesiva producción de RLO puede inducir disfunción vascular en la placenta<sup>84</sup>. Sin embargo, aún no son claros los mecanismos que conducen a incrementar la producción de RLO durante el embarazo y menos aún sus consecuencias a largo plazo en la gestante y su descendencia. Recientemente, Hong *et al*<sup>85</sup>, reportaron asociación entre estados de estrés oxidativo en embarazos normales con una menor tasa de crecimiento postnatal en el primer año de vida. Lee *et al*<sup>86</sup> hallaron mayor peso y talla en neonatos de embarazadas con mayores concentraciones de vitaminas antioxidantes como ácido ascórbico y tocoferol en el segundo trimestre de embarazo. Un estudio en neonatos con RCIU reportó un aumento de la peroxidación lipídica y disminución en la actividad y niveles de enzimas antioxidantes en sangre<sup>87</sup>. Saker *et al*<sup>88</sup>, hallaron correlación positiva entre biomarcadores para estrés oxidativo en sangre materna y cordón umbilical con RCIU. Otros estudios han mostrado una alta correlación de niveles de sustancias antioxidantes con marcadores de estrés oxidativo entre la sangre materna y fetal<sup>89,90</sup>, lo cual sugiere que el estrés oxidativo materno podría afectar el desarrollo del feto. Adicionalmente, se ha observado que crías de mamíferos sometidas a condiciones pro-oxidantes, durante el período gestacional, como: hipoxia, desnutrición o malnutrición materna desarrollaron resistencia a la insulina<sup>91</sup>, hipertensión<sup>92,93</sup>, y obesidad en la etapa adulta<sup>94</sup>.

Por otro lado, intervenciones con terapias antioxidantes en mamíferos, dirigidas a reducir el estrés oxidativo durante el embarazo, y en presencia de los mismos factores ya mencionados, han mostrado que estas intervenciones contrarrestan la programación de ECV<sup>95,96</sup>. También en modelos

murinos con RCIU, inducido por desnutrición materna, se ha encontrado que el tratamiento con antioxidantes previene la disfunción endotelial de la crías en la etapa adulta<sup>97,98</sup>.



**Figura 1.** Biomarcadores de estrés oxidativo durante el embarazo y el post-parto normal. Durante la gestación, los niveles de marcadores de peroxidación lipídica como los F8-Isoprostanos se incrementan desde el primer trimestre y alcanzan un nivel máximo a finalizar el embarazo. De otra parte, la 8-hidroxiguanosina (OHG) marcador de daño oxidativo del ADN alcanza su máxima concentración en orina al inicio del tercer trimestre seguida de una reducción gradual hasta el parto. También se puede observar que los niveles de glutación sanguíneo disminuyen su concentración desde el inicio del embarazo y se recuperan hasta después del parto. Adaptado de las referencias 71 y 72.

Todos estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo puede ser un elemento central en la programación de ECV durante la gestación. Por lo tanto, la implementación de tratamientos con vitaminas y oligoelementos antioxidantes, podría prevenir y/o controlar el estrés oxidativo y así reducir el riesgo de programación de ECV asociadas.

## MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES DURANTE LA GESTACIÓN

Diferentes estudios en embarazadas han utilizado micronutrientes antioxidantes durante la gestación, con el propósito principal de evaluar su potencial para prevenir el desarrollo de enfermedades vasculares del embarazo como preeclampsia. Sin embargo hasta ahora los hallazgos reportados son contradictorios con respecto a su efectividad. Chappell *et al*<sup>99</sup> en 1999, fueron los primeros en reportar una reducción significativa de la preeclampsia en mujeres con alto riesgo para la enfermedad, después de ser suplementadas con vitaminas C y E. Sin embargo, estos resultados no han sido corroborados por estudios posteriores. Por el contrario, se han reportado efectos adversos como aumento de la incidencia de hipertensión, embarazo pretermino y bajo peso al nacer<sup>100,101</sup>. Una característica común en estos estudios ha sido el uso de dosis elevadas de combinaciones de vitamina C (1000mg/día) y Vitamina E en forma de  $\alpha$ -tocoferol (400mg/día). Estas dosis representan entre 8-10 veces las dosis recomendadas para estos micronutrientes durante el embarazo. Milczarek *et al*,<sup>102</sup> mostraron *in vitro* que la inhibición de la peroxidación lipídica por RLO en mitocondrias de placenta, es posible con combinaciones de ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol a concentraciones bajas.

Estudios *in vitro* en citotrofoblastos extraídos de placentas humanas han mostrado que concentraciones elevadas de Vitamina E (50uM en forma de  $\alpha$ -Tocoferol) y Vitamina C (50-100uM de ácido ascórbico) aumentan tanto la apoptosis como la autofagia celular bajo condiciones de hipoxia-reoxigenación<sup>103</sup> y que además, incrementan la producción de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y disminuyen la secreción de la gonadotropina coriónica humana<sup>104</sup>. Chara *et al*<sup>105</sup>, encontraron en células JEG-3 de coriocarcinoma de placenta humana, que altas concentraciones de estas vitaminas inhiben la proliferación y aumentan la muerte celular.

Adicionalmente, el consumo crónico de estas vitaminas antioxidante en dosis muy altas ha mostrado tener efectos pro-oxidantes. Así por ejemplo, la suplementación con altas concentraciones de vitamina C se ha asociado con el incremento del daño oxidativo del ADN por RLO<sup>106</sup>. Chen *et al*<sup>107</sup>., demostraron que intervenciones agudas con dosis farmacológicas de vitamina C, producen aumentos significativos en la producción de peróxido de hidrogeno en el líquido extracelular, sin que sea detectado en sangre El consumo de dosis elevadas de Vitamina E en

humanos y animales se ha relacionado con aumento de la peroxidación lipídica, y una desregulación negativa de enzimas antioxidantes con niveles elevados de esta vitamina en sangre<sup>108,109</sup>. Adicionalmente, la suplementación crónica con Tocoferol (500mg/día) en adultos ha mostrado incremento de los marcadores de estrés oxidativo en plasma<sup>110</sup>. Todos estos hallazgos sugieren que el uso crónico de estas vitaminas a dosis suprafisiológicas durante el embarazo no necesariamente reduce el estrés oxidativo, sino que por el contrario podrían alterar la función placentaria como se mencionó anteriormente. Igualmente se ha reportado que un nivel bajo de estos micronutrientes puede generar disfunción placentaria<sup>111</sup>

Una alternativa para controlar el estrés oxidativo durante la gestación sin necesidad de usar altas dosis de Vitamina C y E, puede ser el uso de múltiples micronutrientes en dosis moderadas con actividad antioxidante, dirigida no solamente a controlar la producción de RLO sino a incrementar el estado antioxidante. Otra ventaja de esta propuesta para disminuir la producción de RLO es que permite proteger varios compartimentos celulares simultáneamente frente al estrés oxidativo, ya algunos estudios han mostrado que la suplementación con dosis moderadas de micronutrientes no solo incrementan sus niveles circulantes sino también que aumenta la capacidad antioxidante total<sup>112,113</sup>.

## **ESTRÉS OXIDATIVO Y PATRONES EPIGENÉTICOS *in útero*.**

Los mecanismos epigenéticos, a nivel cromosómico, permiten establecer la regulación de la expresión de ciertos sitios del genoma por medio de modificaciones epigenéticas que son particulares para cada tejido, sin implicar cambios en la secuencia del ADN, lo que se traduce en la producción o no de ARNs. El control epigenético está mediado básicamente por cuatro mecanismos: 1) Metilación de citosinas que usualmente ocurre en el contexto de dinucleótidos CpG. 2) Modificación post-traducciona l de Histonas (incluye metilación, acetilación, fosforilación ubiquitinación) usualmente en el extremo N-terminal de ciertas Histonas. 3) MicroARNs que controlan la expresión de otros ARNs a través del reconocimiento específico de ciertos transcritos. 4) ARNs largos no codificantes (lncRNAs: siglas en inglés) moléculas de  $\geq 200$  nucleótidos que pueden cumplir diferentes funciones reguladoras como se discutirá más adelante. Comparado con la metilación del ADN y la modificación de histonas, el efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de los microARNs y lncRNAs no ha sido muy estudiado. Sin embargo hay que tener en consideración que todos los mecanismos epigenéticos descritos pueden funcionar de manera cooperativa para regular la expresión de un genoma y pueden ser considerados actores de la programación fetal<sup>114</sup>.

En mamíferos, la metilación ocurre en aproximadamente el 5% de las citosinas del genoma y alrededor del 60% de los genes presentan islas CpG en su extremo 5'.<sup>115</sup> En general, se considera que la metilación de citosinas en islas CpG ubicadas en regiones promotoras, se relaciona con la represión de la transcripción genética por larga duración, mientras que las modificaciones en las histonas son reversibles y parecen ser más flexibles debido a la tasa de recambio de estas proteínas<sup>116,117</sup>.

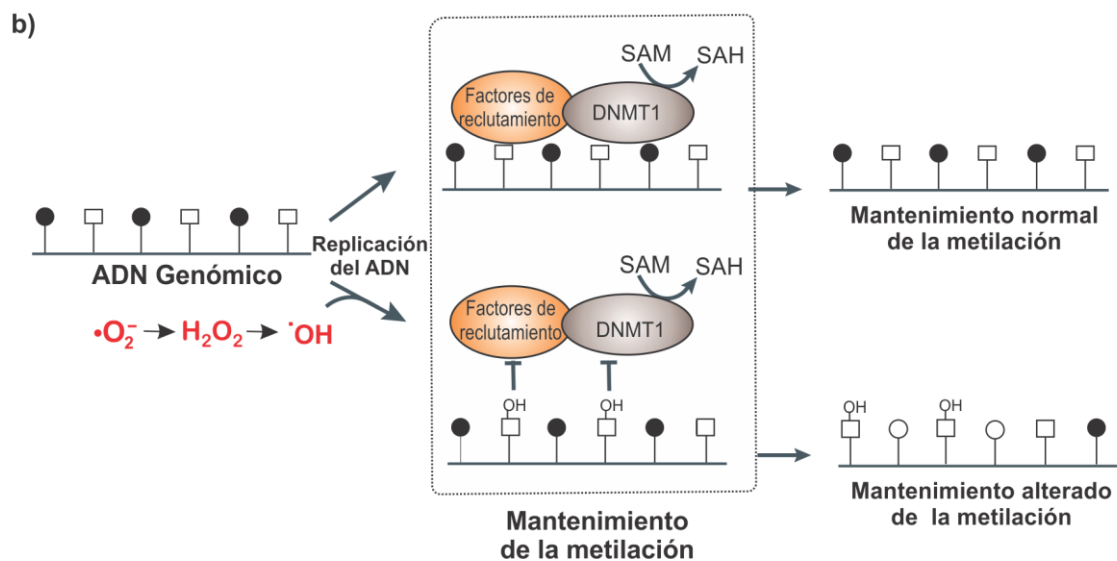
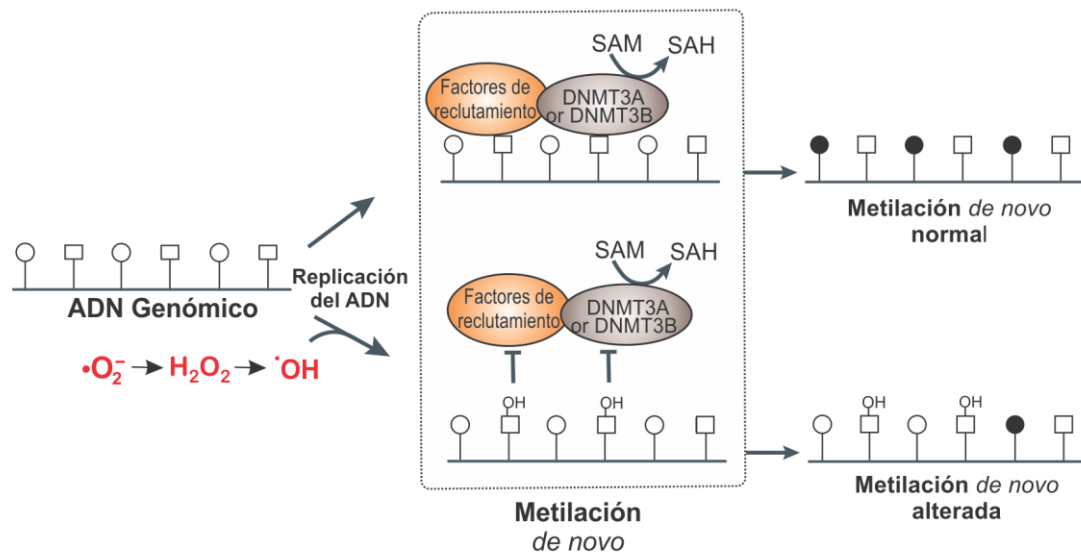
Durante la diferenciación y desarrollo de los tejidos fetales ocurren cambios epigenéticos globales, tanto en el ADN como en las histonas, cambios que permiten establecer un patrón de expresión genética en la gran mayoría de genes. Sin embargo, los mecanismos que regulan ese patrón durante esta etapa aún se desconocen. Un posible modulador de este proceso puede ser el estrés oxidativo. Los RLO tienen la capacidad de modificar, directa o indirectamente, el grado de metilación de citosinas en el ADN, ocasionando cambios en la transcripción de genes y expresión de proteínas.<sup>118,119</sup>

De forma directa, los RLO como el hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) pueden oxidar la guanosina en los dinucleótidos CpG y formar 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHG), una base modificada que puede inhibir la metilación de las citosinas adyacentes, proceso catalizado por las ADN-metiltransferasas (DNMTs, sigla en inglés) (**Figura 2**), familia de enzimas encargadas de establecer y mantener los patrones de metilación especialmente en regiones ricas en dinucleótidos CpG en el ADN<sup>120</sup>. Actualmente se considera que DNMT3a y DNMT3b son responsables de la metilación de *ново*, mientras la DNMT1 se encarga de mantener el patrón durante la fase S (replicación del ADN) del ciclo celular. En cultivos de melanocitos se ha reportado elevación de la expresión de la DNMT1 inducida por estrés oxidativo y asociada con cambios globales en la metilación en citosinas<sup>121</sup>.

Aunque la 8-OHG está presente en el genoma de diferentes tejidos a una baja frecuencia  $\sim 1 / 10^5$  guanosinas<sup>122</sup>, su distribución podría no ser aleatoria, Akatsuka *et al*<sup>123</sup>, observaron una alta frecuencia de 8-OHG en genes de tamaño pequeño y con alta expresión. Este reporte podría implicar la existencia de sitios frágiles en el genoma para el daño por RLO y que podrían ser susceptibles de sufrir alteraciones epigénéticas. Se necesitan nuevos estudios para establecer el porcentaje pérdida de la metilación de citosinas atribuible por la presencia de la 8-OHG en especial durante el desarrollo fetal.

Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado que un estado de estrés oxidativo crónico puede inducir cambios en la metilación en regiones promotoras de manera gen específica, un proceso guiado por la vías de señalización intracelular activadas por los RLO que conducen al reclutamiento de factores de transcripción y ADN metil-transferasas como la DNMT1 a regiones específicas del genoma que son posteriormente hipermetiladas<sup>124,125,126</sup> O'Hagan *et al*<sup>127</sup>, mostraron que la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células epiteliales de ratón, induce rápidamente la relocalización de la DNMT1 desde regiones del genoma pobres en CpG hacia regiones con alta densidad en CpG, asociado esto con un aumento de la metilación en estas regiones.

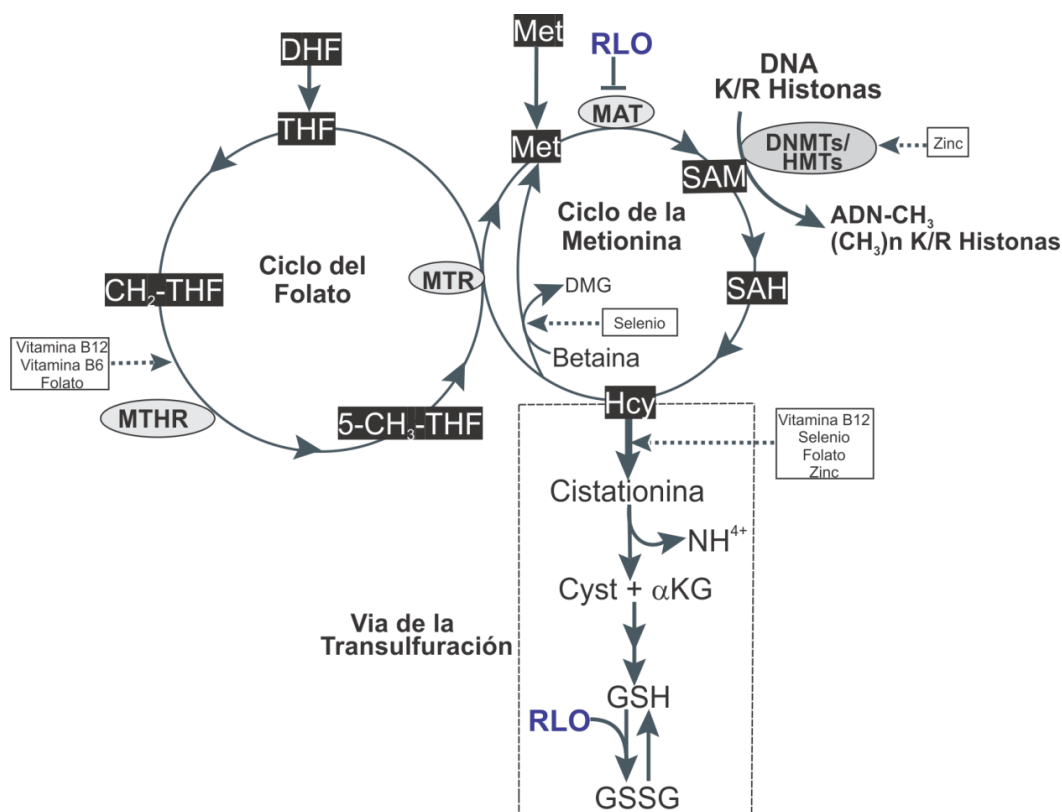
a) ● 5-Metilcitosina ○ Citosina desmetilada □ Guanina □<sup>OH</sup> 8-Hidroxi-guanina



**Figura 2.** Modelo de efecto global de los RLO sobre la metilación *de novo* y el mantenimiento de los patrones de metilación establecidos en el ADN. Las guaninas adyacentes a citosinas en el contexto de dinucleótidos CpG pueden ser modificadas por RLO como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) producen 8-hidroxi-guanosina una base modificada que puede interferir con la unión de las DNA metiltransferasas durante la fase de replicación del ADN. Dependiendo del momento, se puede producir: **A)** Alteraciones en el establecimiento de los patrones de metilación *de novo* mediado por la DNMT3A o DNMT3B. **B)** Alteración en los patrones de metilación por inhibición de la DNMT1 en regiones previamente metiladas.

El estrés oxidativo puede de manera indirecta provocar cambios epigenéticos persistentes a través de la inducción de rutas metabólicas celulares para reducir la concentración de RLO, llevando a la disminución de la disponibilidad de cofactores necesarios para el establecimiento de la impronta epigenética<sup>128</sup>. Establecer y mantener el patrón epigenético en los cromosomas requiere una síntesis adecuada de moléculas donantes de grupos metilo como la S-adenosilmetionina (SAM), cofactor de las DNMTs e HMTs entre otras enzimas, SAM es sintetizado en el ciclo de la metionina y su disponibilidad está relacionada con el metabolismo y el estado redox celular<sup>129</sup>. Intermediarios en la vía de síntesis de SAM, como la homocisteína, son igualmente sustratos para la síntesis de glutatión, potente molécula antioxidante cuya síntesis se incrementa en respuesta a la excesiva producción de RLO<sup>130</sup>. Lertratanangkoon *et al*<sup>131</sup>, mostraron que la depleción de glutatión disminuye significativamente los procesos de metilación en el ADN<sup>132</sup>. Adicionalmente, estados de estrés oxidativo pueden alterar la metilación del ADN al inhibir la actividad y la expresión de la Metionina Adenosil Transferasa (MAT)<sup>133, 134</sup> enzima encargada de la síntesis de SAM (**Figura 3**). En neonatos Fryer *et al*<sup>135</sup>, reportaron correlación entre los niveles de homocisteína en sangre de cordón umbilical con el grado de metilación en ciertos promotores de genes en leucocitos. Recientemente Rao *et al*<sup>136</sup> reportaron en modelo murino y cultivos *in vitro* que el grado de metilación del ADN en células endoteliales regula la función endotelial y la capacidad de angiogénesis a través de la producción del NO<sup>•</sup>.

También se ha reportado que los procesos de regulación epigenéticos pueden ser afectados dinámicamente por la dieta. La metilación global del genoma es susceptible al exceso o a la deficiencia de ciertos nutrientes de la dieta. La gran mayoría de estos elementos son micronutrientes como folato, colina, biotina, zinc, selenio, entre otros, que desempeñan funciones como antioxidantes y/o cofactores enzimáticos<sup>137</sup>. Un estudio del transcriptoma en ratas mostró que la dieta materna puede influenciar la expresión de ARN mensajeros en las crías, alterando la expresión de genes principalmente de aquellos relacionados con el transporte de iones, con el metabolismo de ácidos grasos, con la función mitocondrial y los de respuesta al estrés oxidativo<sup>138,139</sup>. Los autores proponen que gran parte de esas alteraciones en la expresión genética pueden estar relacionadas con modificaciones epigenéticas.



**Figura 3.** Influencia del estrés oxidativo sobre las vías de síntesis de la SAM. Para mantener un apropiado nivel de SAM, la Homocisteína (Hcy) producida después de las reacciones catalizadas por las DNMTs HMTs y otras enzimas debe estar disponible para ser metilada en el ciclo del folato por la metionina sintasa (MTR). El exceso de RLO incrementa la producción de Glutathión reducido (GSH) y desvía la homocisteína del ciclo de la metionina hacia la vía de la transulfuración para sintetizar GSH. Adicionalmente los RLO pueden inhibir la producción de SAM a través del bloqueo de la Metiladenosil transferasa (MAT). Nótese, que varias reacciones implicadas directa e indirectamente en la síntesis de SAM requieren micronutrientes como cofactores enzimáticos (líneas punteadas). Met: Metionina, Cys: Cisteína, αKG: alfa-Cetoglutarato, GSSG: Glutathión oxidado, DMG: di-Metilglicina, MTHR: Metileno-tetrahidrofolato, DHF: Dihidrofolato, THF: Tetrahidrofolato, CH<sub>2</sub>THF: Metileno tetrahidrofolato, 5-CH<sub>3</sub>THF: Metil tetrahidrofolato.

Tanto en modelos murinos bajo condiciones de hipoxia y de desnutrición intrauterina que se han asociado con el incremento en la producción de RLO como en modelos *in vitro*, se han encontrado alteraciones en la metilación del ADN<sup>140</sup>. En tejido cardíaco fetal de ratones hembra sometidas a estrés oxidativo inducido por la hipoxia durante la gestación, se encontró una disminución en la expresión del gen de la proteína quinasa C épsilon (PKCε). La represión del gen se relacionó con un incremento en la metilación de citosinas en su región promotora, el efecto fue atenuado por el suministro de antioxidantes durante la gestación, que mostró evitar la metilación del promotor tanto

*in vivo* como *ex vivo*<sup>141</sup>. Shahrzad *et al*<sup>142</sup> reportaron, en cultivos celulares y de tejidos, una relación inversa entre áreas hipóxicas y la metilación global del ADN. Por otra parte, Lane *et al*<sup>143</sup>, demostraron que la insuficiencia útero placentaria en ratas altera globalmente el patrón epigenético del ADN y de las histonas. Park *et al*<sup>144</sup>, en un modelo en ratas con diabetes tipo II inducida durante la gestación, encontraron modificaciones epigenéticas progresivas en histonas y en el ADN de la región promotora del gen *pdx1* (gen implicado en el desarrollo y diferenciación de las células beta del páncreas). Estas modificaciones epigenéticas produjeron un silenciamiento paulatino del gen *pdx1*, llevando finalmente al desarrollo de diabetes *mellitus* tipo II en la etapa adulta.

En humanos, existen pocos reportes que muestren la influencia del ambiente intrauterino sobre el patrón epigenético fetal. En sujetos expuestos a períodos de hambruna en la etapa prenatal durante la Segunda Guerra Mundial, se encontraron modificaciones epigenéticas persistentes en regiones promotoras del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), sin que se presentara relación con el peso al nacer<sup>145</sup>, lo cual sugiere que el peso al nacer es un indicador pobre de la programación fetal<sup>146</sup>. Tobi *et al*<sup>147</sup> encontraron diferencias en los perfiles de metilación en regiones promotoras de al menos 6 genes involucrados en el desarrollo de ECNT en neonatos expuestos a la hambruna, donde los cambios epigenéticos estaban relacionados con el período tiempo y duración de la exposición durante la gestación.

Khulan *et al*<sup>148</sup> encontraron que la suplementación periconcepcional con micronutrientes en mujeres puede inducir cambios en la metilación en ciertas regiones promotoras en genes de su progeñe, diferencias que son detectables en el momento de nacer y aparentemente estables durante la vida postnatal. En otro reporte de este grupo de recién nacidos, se encontró que la suplementación con micronutrientes puede alterar el “*imprinting*” genético, es decir la metilación de genes diferencialmente metilados dependiendo de su origen materno o paterno; este efecto mostró tener diferencias en los locus afectados según el sexo de los recién nacidos<sup>149</sup>. Sin embargo, aún se desconocen las implicaciones fisiológicas de estos hallazgos y mucho menos la influencia de estos factores sobre genes expresados preferencialmente en el endotelio vascular y relacionado con la función endotelial.

## PROGRAMACION INTRAUTERINA Y ARNs LARGOS NO CODIFICANTES

El proyecto ENCODE ha reportado en diferentes líneas celulares que aproximadamente dos tercios del genoma humano es transcrito pero <2% codifica para proteínas<sup>150</sup>, el resto son denominados ARNs no codificantes (siglas en inglés: ncRNAs). Una proporción importante de los ncRNAs se clasifican como ARNs Largos No Codificantes (Siglas en inglés: lncRNAs) caracterizados por presentar una longitud  $\geq 200$  nucleótidos, carecer de marcos de lectura abierta reconocibles y presentar usualmente poliadenilación<sup>151</sup>. Los lncRNAs tienen la propiedad de adoptar estructuras secundarias estables muy ordenadas que le permiten formar dominios de unión para proteínas, ARNs y el ADN<sup>152</sup>. Esta característica permite que los lncRNAs puedan integrar múltiples señales en un solo evento de regulación epigenético. El modo de acción estos ARNs puede ser en modo *cis*, regulando la expresión de genes cercanos a su sitio de transcripción o también pueden actuar en *trans*, mostrando regulación *loci* independiente. Los mecanismos epigenéticos descritos para estos ncRNAs incluyen la remodelación de la cromatina<sup>153</sup>, regulación del splicing alternativo, actuando como esponjas moleculares para microRNAs o ARNs anti-sentido naturales. Adicionalmente los lncRNAs identificados en diferentes tejidos y células, presentan perfiles de expresión más específicos que los genes codificantes, lo cual ha llevado a inferir que pueden estar implicados en el establecimiento de los programas de regulación que definen la identidad y la función celular<sup>154</sup>. Hay evidencia que modificaciones epigenéticas en histonas, la metilación del ADN, factores de transcripción así como la remodelación de la cromatina contribuyen a establecer el perfil de expresión específico para estos RNAs<sup>155,156,157</sup>.

Una subclase de lncRNAs son los asociados a regiones de “*imprinting*” genómico, mecanismo que permite en mamíferos la expresión monoalélica de genes dependiendo si el gen es de origen materno (“*imprinting*” materno) o paterno (“*imprinting*” paterno). Usualmente las regiones de “*imprinting*” contienen varios genes agrupados que incluyen al menos un lncRNAs que pueden desempeñar funciones de regulación en modo *cis* o *trans*. La mayoría de lncRNAs en las regiones de “*imprinting*” están regulados por la metilación de citosinas en dinucleótidos CpG en sitios denominados Regiones Diferencialmente Metiladas (DMR: siglas en inglés) que se pueden encontrar cercanos a la región promotora de estos lncRNAs o en regiones intergénicas. Actualmente se sabe que estos ARNs pueden participar en el silenciamiento de los genes “*imprinting*” por mecanismos que aún no han sido bien establecidos<sup>158,159</sup>. Usualmente los DMR son activos cuando están

desmetilados e inactivos cuando se encuentran metilados. Recientemente, Vidal *et al*<sup>160</sup> reportaron que la metilación de los DMRs en los lncRNAs puede ser alterada por la exposición a factores ambientales durante la gestación y ser transmitida a la descendencia.

En la placenta algunos genes “*imprinting*” han sido involucrados en el control del suministro de nutrientes<sup>161</sup> mientras que en el feto han sido relacionados con la regulación de la demanda de nutrientes a través del control de la tasa de crecimiento de los tejidos fetales<sup>162</sup>. En general, se considera que los genes “*imprinting*” expresados del alelo paterno incrementan el crecimiento mientras que aquellos expresados en los alelos maternos lo restringen<sup>163</sup>. En modelos animales la expresión alterada de este subtipo de ARNs durante la gestación ha mostrado que puede afectar el crecimiento *in utero*<sup>164</sup>.

Soubry *et al*<sup>165</sup>, reportaron en neonatos de padres obesos alteraciones en DMRs de genes “*imprinting*” como MEG3, MEST, PLGA1. Un estudio similar reportó una asociación entre la obesidad paterna con la hipometilación del DMRs del gen IGF-2, mientras que la obesidad materna fue relacionada con un incremento de la metilación del DMR en este gen y en el gen H19 (un ncRNA) en los recién nacidos<sup>166</sup>. Dunk *et al*<sup>167</sup>, encontraron disminución de la expresión del gen “*imprinting*” GNAS en células endoteliales extraídas de placentas de neonatos con RCIU. En modelos animales de ECVs como el infarto de miocardio, falla cardíaca y enfermedad coronaria se ha reportado que ciertos lncRNAs presenta una expresión aberrante<sup>168,169</sup>.

Esto puede implicar que los lncRNAs en el sistema vascular pueden participar de la fisiopatología de las ECVs y que su desregulación podría en un futuro ser considerada como un indicador de la alteración de la función vascular.

## RACIONALIDAD EN EL DESARROLLO DE UN SUPLEMENTO CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES

El estrés oxidativo y la disfunción endotelial se han relacionado con inadecuado consumo de micronutrientes. Según reporte de la OMS, alrededor de 2000 millones de personas presentan deficiencias de micronutrientes con consecuencias socioeconómicas incalculables<sup>170</sup>. Incluso, países desarrollados como EE.UU presentan un porcentaje alto de mujeres en edad reproductiva que consumen micronutrientes antioxidantes como el Zinc, Vitamina A y Ácido Fólico por debajo de las recomendaciones nutricionales<sup>171,172</sup>. La deficiencia de micronutrientes durante el embarazo en algunas poblaciones como India, Nepal y Gambia, ha demostrado ser una causa importante de bajo peso y talla al nacer<sup>173-174</sup>. Sin embargo, el efecto de la suplementación con micronutrientes durante la gestación sobre el peso al nacer ha mostrado resultados inconsistentes y posiblemente esto se deba a que el peso es un indicador muy grueso para medir el efecto de estas intervenciones, especialmente en deficiencias moderadas<sup>175,176</sup>.

El desbalance de micronutrientes durante la gestación puede ocasionar alteraciones estructurales y metabólicas tanto en la madre como en el feto, dado que participan en múltiples procesos biológicos como cofactores enzimáticos, activadores de factores de transcripción, en vías de señalización celular, durante la regulación del desarrollo y finalmente pueden alterar el metabolismo *in útero*<sup>177</sup>. Restricciones nutricionales de minerales o vitaminas en animales durante la gestación, se han asociado con aumento en el porcentaje de tejido graso visceral, disminución del tejido magro y aumento de marcadores de estrés oxidativo en el plasma de las crías<sup>178,179</sup>.

Algunos micronutrientes antioxidantes como zinc, selenio, nicotinamida (Vitamina B3), vitamina E, vitamina C y vitamina A, suministrados a bajas dosis han mostrado que pueden modular positivamente el estrés oxidativo y la función endotelial.

**Zinc:** es un elemento químico estructural presente en la Superóxido Dismutasa dependiente de zinc y cobre (SOD ZnCu), una de las principales enzimas encargadas de dismutar el anión súper oxido a peróxido de hidrogeno. Sin embargo, el zinc no reacciona directamente con los RLO, al parecer tiene una acción antioxidante indirecta al inducir la expresión de moléculas como la

metalotioneína, un quelante de iones metálicos que ha mostrado capacidad antioxidante *in vitro*. Además el zinc se une a los grupos sulfidrilos de las cisteínas en las proteínas, evitando su oxidación por RLO. Su deficiencia por privación crónica se encuentra ligada a estados de estrés oxidativo con incremento en el daño del ADN, lípidos y proteínas<sup>180,181</sup>. En animales las restricciones moderadas de Zinc durante la gestación generan hipertensión en la crías durante la etapa adulta, asociada con alteraciones de la función renal, aumento del estrés oxidativo y alteraciones en el sistema antioxidantes.<sup>182</sup> Adicionalmente, Tobit *et al*<sup>183</sup>; encontraron que la deficiencia de zinc durante la gestación disminuye la expresión y actividad de la eNOS en las arterias de las crías en la etapa adulta, a pesar del restablecimiento del micronutriente en la dieta. En células endoteliales, el zinc inhibe el estrés oxidativo y la disfunción endotelial inducida por el TNF- $\alpha$  y el ácido linoleico<sup>184,185</sup>. Recientemente Cortese *et al*<sup>186,187</sup> encontraron que el zinc intracelular liberado por la acción del NO $\cdot$ , actúa como un mensajero intracelular que activa la síntesis de glutatión, aumentando la resistencia de las células endoteliales a los RLO. Estos hallazgos señalan la importancia de mantener un adecuado nivel de zinc en el endotelio para la protección frente al estrés oxidativo y el desarrollo de disfunción endotelial.

**Nicotinamida (Vitamina B<sub>3</sub>):** forma parte de varias coenzimas esenciales en el metabolismo energético y participa en la defensa antioxidante. Su deficiencia *in vitro* se ha relacionado con daño por RLO en proteínas y ADN<sup>188</sup>. En cultivo de queratinocitos, la restricción de nicotinamida aumenta la generación de RLO y la expresión de la NADPH-oxidasa, enzima generadora de RLO<sup>189</sup>. En mitocondrias aisladas de neuronas se observó que la nicotinamida tiene una potente actividad antioxidante.<sup>190</sup> Esto probablemente este asociado con la prevención de la despolarización de la membrana interna mitocondrial por RLO.<sup>191</sup> Incluso en algunos modelos experimentales ha mostrado mayor capacidad para controlar el estrés oxidativo que el ácido ascórbico<sup>192</sup>. Estudios *in vitro* han reportado que la nicotinamida disminuye la peroxidación lipídica, aumenta los niveles de glutatión e induce la expresión de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa<sup>193,194</sup>. Las propiedades antioxidantes de la nicotinamida han sido relacionadas con su capacidad de activar la expresión de los ciertos factores de transcripción de la familia FOXO, que conducen a incrementar la expresión de enzimas antioxidantes<sup>195,196</sup>. Adicionalmente en células endoteliales ha mostrado inducir protección frente al estrés oxidativo y aumento la viabilidad

celular<sup>197</sup>. En explantes de placentas, la nicotinamida incrementa la expresión de enzimas antioxidantes, disminuye la producción de F2-isoprostanos e induce un estado anti-inflamatorio en respuesta al tratamiento con lipopolisacaridos<sup>198</sup>.

**Vitamina A:** Algunos retinoides como el retinol muestran actividad antioxidante. En modelo murino, la administración crónica de vitamina A disminuye los niveles de biomarcadores de peroxidación lipídica e incrementa la actividad de la SOD y los niveles de glutatión en el sistema vascular<sup>199</sup>. El ácido retinoico un derivado del retinol, ha mostrado efectos similares en cultivos de hipocampo de ratas<sup>200</sup>. En el sistema vascular, la deficiencia de vitamina A se asocia con disminución en la expresión de enzimas antioxidantes, aumento en la expresión de factores proinflamatorios (TNF $\alpha$ , VCAM), incremento en la expresión de enzimas productoras de radicales libres (NADPH oxidasa, y la sintasa de NO $^{\bullet}$  inducible: iNOS) y alteraciones en el metabolismo lipídico <sup>201,202</sup>. Durante la gestación la deficiencia de retinol en animales incrementa la producción de TNF- $\alpha$ , la infiltración y apoptosis en la placenta<sup>203</sup>. La disfunción placentaria en estos modelos puede estar relacionada con defectos en el crecimiento de diferentes órganos y tejidos en el feto.<sup>204</sup>

**Selenio:** Este micronutriente es un componente esencial de diferentes selenoproteínas, dentro de las cuales se encuentran enzimas antioxidantes como la Glutatión Peroxidasa (GPX, siglas en ingles), la Tiorredoxina Reductasa (TRX siglas en ingles) y Selenio-proteína P que neutralizan hidroperóxidos. Estudios *in vitro* han mostrado que el tratamiento con selenio protege las células endoteliales contra el estrés oxidativo y las LDL-oxidadas, a través del aumento en la expresión y actividad de la GPX y TRX.<sup>205,206</sup> Recientemente Tim *et al*<sup>207</sup>, encontraron una relación inversa entre la presión arterial y la concentración de selenio plasmático. Sin embargo también altos niveles de este micronutrientes se han relacionado con aumento de la presión arterial<sup>208</sup>.

La suplementación con selenio durante el embarazo en modelos animales de restricción calórica, ha mostrado incrementar el peso fetal y el contenido de ADN en tejido muscular<sup>209</sup>, posiblemente relacionado con una mejor función placentaria inducida por el selenio<sup>210</sup>. Durante el progreso del embarazo los niveles de selenio plasmático decrecen<sup>211</sup>. Se ha propuesto que esta disminución está relacionada con el aumento de los requerimientos por los tejidos para controlar el estrés oxidativo<sup>212</sup>.

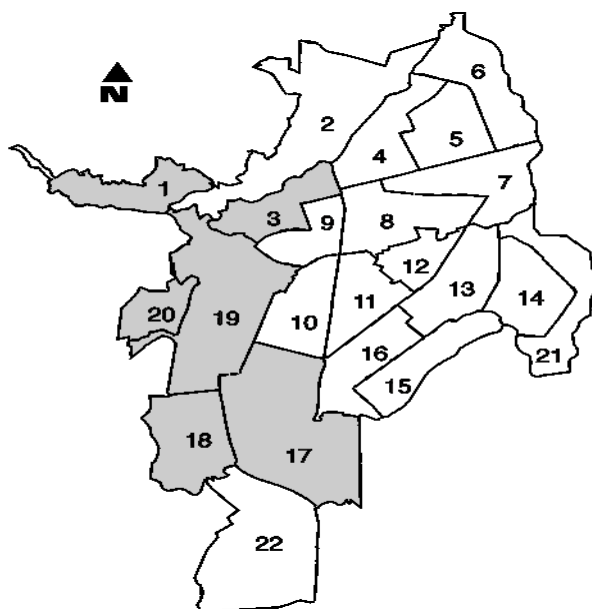
Rayman *et al*<sup>213</sup> reportaron una asociación entre bajos niveles plasmáticos de selenio al final del primer trimestre de gestación y el desarrollo de parto pre-termino. Hiten *et al*,<sup>214</sup> encontraron altos niveles de peroxidación lipídica en sangre materna de mujeres preclámpicas asociado con bajos niveles de selenio y actividad de la GPX con respecto a embarazos normales. Estos reportes sugieren que mantener un adecuado nivel de selenio durante la gestación ayudaría a tener un mejor control sobre la producción de RLO.

**Tocoferol y ácido ascórbico:** son consideradas las principales vitaminas antioxidantes de la dieta. El tocoferol es un antioxidante lipofílico que evita la peroxidación lipídica previniendo el daño en membranas. El ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble con capacidad para neutralizar diversos tipos de RLO en compartimentos hidrosolubles. Las intervenciones con tocoferol y ácido ascórbico han mostrado mejorar la función endotelial, un efecto que se ha asociado con la disminución de los marcadores de estrés oxidativo<sup>215,216,217</sup>. En ratas sometidas a desnutrición intrauterina la suplementación con estas vitaminas redujo el estrés oxidativo, la presión arterial y mejoró la función vascular. El efecto se asoció a la reducción del anión superóxido<sup>64</sup>. Rodríguez *et al*<sup>218</sup>, reportaron en animales que la suplementación combinada de Vitamina C y E previene la inhibición sobre la expresión de eNOS y disfunción endotelial inducida por la hipercolesterolemia.

## DISEÑO METODOLOGICO

### Población y muestra:

La población seleccionada para el estudio fueron gestantes de la ciudad de Santiago de Cali atendidas en centros de salud de la ESE LADERA, que presta el servicio de atención prenatal a embarazadas del régimen subsidiado de las comunas 1, 3, 17, 18, 19, 20 y área rural del occidente de la ciudad (Figura 4).



**Figura 4.** Mapa de las comunas de la ciudad de Santiago de Cali. En gris se resaltan las comunas de procedencia de las participantes del estudio cubiertas por las ESE Ladera.

### Tipo de estudio

Ensayo clínico aleatorizado enmascarado, formado por dos grupos de primigestantes: Un **Grupo control** al que se le suministró un placebo y un **Grupo experimental** que fue suplementado con micronutrientes antioxidantes. Estos grupos hacían parte de un proyecto mayor titulado: *“Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con Enfermedades Crónicas No Transmisibles”*. Este estudio fue financiado en el año 2009 por COLCIENCIAS y desarrollado por el Grupo de Nutrición de la Universidad del Valle y la División de Salud de la FES.

### **Tamaño de muestra**

Para cumplir el primer objetivo general que buscaba evaluar el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre la función endotelial y el estrés oxidativo materno, se tomó como variable resultado la Vasodilatación Mediada por flujo (VMF)<sup>219,220</sup>. Asumiendo una distribución normal de la variable, una varianza similar entre los grupos a comparar, una significancia ajustada  $p=0.05$ , un poder de 0.80, una diferencia esperada  $DE=4.5$ , una desviación estándar  $DS=10$  y una relación de un control por cada sujeto experimental, el tamaño de muestra estimado en cada grupo fue de 79 mujeres. Ajustando por un 20%  $n(1 / 1-R)$  de pérdidas durante el seguimiento, el número de participantes fue ajustado a 100 en cada grupo. El tamaño de muestra fue calculado con el programa *PS Power and Sample Size Calculations Version 3.0*<sup>221</sup>.

### **Diseño del estudio**

Se tomaron muestras de sangre materna, neonatal, células endoteliales de cordón umbilical y de tejido placentario. Las gestantes fueron captadas entre las semanas 16 y 20 de gestación, y asignadas de manera aleatoria al grupo control y al grupo suplementado con micronutrientes que recibió vitaminas y minerales adicionales a los utilizados en el programa de control prenatal usual por las guías de atención. El estudio fue inscrito en Clinical Trials con el código NCT00872365 (**Anexo 1**).

### **Consideraciones Éticas**

Este proyecto fue avalado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos (CIREH) de la Universidad del Valle (Acta No. 012-010, **Anexo 2**). Antes de ingresar al estudio, las participantes firmaron un consentimiento informado en el cual se solicitó permiso para utilizar las muestras de sangre y de cordón umbilical únicamente con fines investigativos y de carácter confidencial (**Anexo 3**). El protocolo del estudio fue radicado en el INVIMA (código 09058608). La utilización de las muestras de sangre y cordón umbilical se realizó acorde con las normas establecidas en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. Los desechos de las muestras procesadas en el laboratorio fueron eliminados según la norma vigente de manejo y filtro de residuos y siguieron la vía hospitalaria de residuos contaminados. Las participantes no incurrieron en ningún costo derivado del proyecto.

### **Diseño y estabilidad del suplemento con antioxidantes**

El suplemento con antioxidantes se diseñó para que cada cápsula aportara los siguientes micronutrientes: Zinc (como óxido de zinc) 20mg, Vitamina A (como acetato de Retinol) 1200 UI, Selenio (como  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ ) 70µg, Vitamina E (como acetato de  $\alpha$ -Tocoferol, 36 UI) 30mg, vitamina C 200mg y Nicotinamida 100mg. Estas dosis que suplen entre 1-3 veces la dosis diaria recomendada durante la gestación<sup>222</sup>, pero que han mostrado ser seguras durante este período<sup>223,224</sup>. Las cápsulas fueron fabricadas por la empresa farmacéutica FABRIFARMA S.A de la ciudad de Cali. La presentación final fueron cápsulas de color amarillo en gelatina dura en sobres de aluminio con 10 cápsulas / unidad. Los ensayos de estabilidad fueron realizados por la empresa farmacéutica a 41°C y 48°C durante tres meses, no mostraron pérdida de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas. El Ácido ascórbico el activo trazador seleccionado por ser el más lábil en el multivitamínico se reportó dentro de las especificaciones técnicas al cabo de los tres meses de análisis (**Anexo 4**).

### **Proceso de captación de las participantes**

Las gestantes fueron captadas en los centros de salud de la ESE LADERA del programa de Control Prenatal. Previa invitación a participar en el proyecto, se les explicaba de manera clara el propósito y los procedimientos que se les realizarían en caso de aceptar participar en el estudio. En esta primera cita se realizó una encuesta a la participante que se contrastó con lo consignado en la historia clínica de las participantes para valorar los principales criterios de inclusión y de exclusión (**Anexo 5**) que se enuncian a continuación:

#### **Criterios de inclusión**

- Primigestantes entre 16 a 30 años de edad.
- Con edad gestacional entre 16 a 20 semanas.
- Sin malformaciones severas detectables por ultrasonido.
- Que asista al control prenatal institucional según régimen subsidiado o contributivo.
- Que sean valoradas por médico gineco-obstetra del proyecto.
- Gestantes con la disposición de participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión**

Contraindicaciones obstétricas o médicas según los conceptos del American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2003<sup>225, 226</sup> que incluyen:

- Gestantes con cirugía o trauma mayor en el último año
- Hb < 10 gr/dl
- Ruptura de membranas
- Diagnóstico previo de diabetes o hipotiroidismo
- Diagnóstico de cáncer
- Diagnóstico de Incompetencia Cervical
- Antecedentes de 2 o más abortos espontáneos
- Embarazo Múltiple
- Hemorragia vaginal, Placenta previa o Amenaza de Aborto
- Diagnóstico de EPOC, Asma o Bronquitis
- Diagnóstico previo de HIV
- Antígeno de superficie de Hepatitis B positivo
- Antecedentes de enfermedades renales
- Enfermedad osteomuscular
- Enfermedad Cardiovascular o Cardiorrespiratoria
- Diagnóstico de Hipertensión arterial crónica y/o que consuma antihipertensivos
- Polihidramnios u Oligohidramnios

Las participantes que cumplían con todos los requisitos fueron programadas a una segunda cita en la cual eran valoradas por un ginecólogo para verificar la edad gestacional y el estado de salud del feto mediante ecografía (**Anexo 6**). Adicionalmente, se tomaban medidas antropométricas y se realizaba una valoración nutricional por una nutricionista-dietista, las pruebas que eran registradas y firmadas por las participantes (**Anexo 7**).

Para el proceso de captación de las embarazadas se consideraron criterios que no solo permitían captar gestantes que iban a recibir micronutrientes, sino también mujeres que podían ser intervenidas con un protocolo de ejercicio físico, por eso dentro de los criterios de inclusión o

exclusión se encuentran consideraciones que podrían afectar esta intervención, pero que no alteran la evaluación del efecto de la suplementación de micronutrientes antioxidantes.

### **Aleatorización y enmascaramiento de las primigestantes**

Las mujeres que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión eran programadas a una tercera cita en la que eran aleatorizadas. Cada mujer tuvo una probabilidad de 0.25 de ser asignada a cualquiera de los grupos de estudio. Esta asignación se hizo mediante bloques balanceados aleatorizados que permitieron la asignación equiprobabilística y aseguraba que cada grupo tuviera el mismo número de participantes (**Anexo 8**). El orden de asignación de cada bloque se escogió aleatoriamente.

Para asegurar el enmascaramiento, la presentación de las cápsulas con antioxidantes y el placebo tenía forma, tamaño y color similares. Adicionalmente los profesionales que aplicaban la aleatorización asignaban un código alfanumérico de dos letras y tres números a cada participante del estudio y que solamente era conocido por el coordinador de la captación de las participantes. Este código no fue revelado sino hasta la finalización de las intervenciones. Adicionalmente en esta cita se tomaron muestras de sangre y se midió la VMF.

### **Grupos del estudio**

Grupo Control (placebo): A este grupo se le entregó mensualmente una cápsula placebo que contenía maltodextrina con una presentación igual a la de cápsulas con micronutrientes antioxidantes. Adicionalmente sin ninguna atención diferente a la indicada en el programa de control prenatal y estipulada en la Norma Técnica de Atención Prenatal de la resolución 412 del año 2000 expedida por el Ministerio de Salud, se cumplía el que toda mujer gestante debe recibir diariamente los siguiente micronutrientes : Sulfato ferroso 60mg, Ácido fólico 1mg y Calcio 1200-1500mg.

Grupo suplementado con Micronutrientes Antioxidantes: a este grupo de mujeres se les suministraron cápsulas con micronutrientes antioxidantes, el esquema de administración sugerido fue de 1 cápsula diaria desde el inicio de la intervención (semana 16-20) hasta el parto .

### **Seguimiento de las gestantes**

Las participantes de los grupos de estudio recibieron 30 cápsulas /mes del suplemento o del placebo a partir de la semanas 16 a 20 de gestación hasta el momento del parto (semanas 36-40). Durante este período se dio educación psicoprofiláctica por auxiliares de enfermería, así como asesoramiento nutricional sin ningún costo.

Mensualmente se entregaron 30 cápsulas en “blísters” debidamente codificados y se aplicó el formato de seguimiento (**Anexo 9**) para registrar la adherencia al consumo de las tabletas, consumo de otros micronutrientes y posibles efectos adversos. Adicionalmente se realizó un seguimiento mensual de la salud de las participantes por historia clínica perinatal institucional y vía telefónica.

### **Toma de muestras**

Previo autorización institucional, se informó a las gestantes acerca del proyecto. Se suministró el documento de consentimiento informado, se resolvieron las preguntas y dudas que manifestaron sobre su participación en el proyecto y se procedió a firmar el mismo. Una vez cumplido este requisito se realizaron los siguientes procedimientos: Examen médico, Formato de Reporte de Caso (antecedentes médicos personales y familiares, historia gineco-obstétrica, factores psicosociales, estilo de vida, hábitos alimentarios), mediciones antropométricas (peso, talla, pliegues cutáneos) y dieta por nutricionista, prueba de esfuerzo, prueba de VMF y toma de muestra de sangre. Entre las semanas 32-36 de gestación se repitieron las siguientes pruebas: VMF, prueba de esfuerzo y toma de muestra de sangre. En el momento del parto se tomaron las muestras y sangre de cordón umbilical y después del alumbramiento se tomaron muestras de placenta. En ese momento se registraron las características del parto: vía y duración del parto así como características del neonato: edad gestacional al nacimiento, puntaje de APGAR, peso, talla, perímetro cefálico y perímetro abdominal en cm, y se calculó el índice ponderal <sup>227</sup>

### **Variables resultado (Independientes)**

- Vasodilatación Mediada por Flujo de la madre.
- Niveles plasmáticos de malondialdeído de la madre y del neonato
- Niveles plasmáticos de leptina y adiponectina materna.

- Nivel de expresión de las proteínas: eNOS, ARG12, Nfr2, PGC1 $\alpha$ , en células endoteliales de cordón umbilical y tejido placentario.
- Producción de óxido nítrico y anión superóxido en cultivo de células endoteliales de cordón.

#### **Covariables:**

- Edad materna.
- Antropometría materna peso, talla, pliegues cutáneos, porcentaje de grasa e IMC
- Tensión arterial sistólica y diastólica.
- Antropometría neonatal: Peso, talla, perímetro cefálico y abdominal e Índice ponderal
- Edad gestacional (según fecha de última menstruación y ecografía de primer trimestre).
- Sexo del neonato
- Vía del Parto y APGAR del neonato.
- Patologías como: preeclampsia, hipertensión inducida por el embarazo, diabetes gestacional.
- Enfermedades infecciosas durante la gestación.

#### **Evaluación nutricional y medidas antropométricas maternas**

Entre las semana 16-20 de gestación se les midió la talla en tallimetro calibrado y se pesaron en balanza de pie. Las mediciones se repitieron entre las semanas 32-36 de gestación. La evaluación nutricional se realizó en la primera cita, por medio de una encuesta nutricional recordatorio de 24 horas. La estimación de las porciones de alimentos consumidas fue realizada por nutricionistas con estandarización en la equivalencia de medidas caseras a gramaje. La información fue procesada en el programa CERES versión 1.02 de 1997. Para calcular los porcentajes de adecuación de macro y micronutrientes se utilizaron las Recomendaciones Dietéticas Diarias (RDA) para la población colombiana del ICBF 1988<sup>228</sup>.

Para determinar el porcentaje de grasa en las embarazadas, con un caliper se midieron en milímetros los pliegues cutáneos tricipital (T), subescapular (SE) y suprailíaco (SI). Estas medidas se utilizaron para calcular la densidad corporal (Dc) con la ecuación de Durnin y Wommersley<sup>229</sup> como se describe a continuación: **Dc** = c - ( m x Log(T + SE + SI) ).

Donde m (pendiente) y c (intercepto) representan coeficientes de regresión que fueron ajustados según la edad de cada embarazada según los coeficientes reportados por Durnin y Wommersley . Una vez calculada la Dc se utilizó la ecuación de Siri *et al*,<sup>230</sup> para calcular el porcentaje de grasa (PG) así: **PG** =  $\left( \frac{4.95}{Dc} - 4.5 \right) \times 100$ .

### **Antropometría neonatal**

Las medidas antropométricas neonatales fueron realizadas por auxiliares de enfermería entrenadas inmediatamente después del parto. La talla se midió con infantómetro y el peso en balanza pediátrica. El peso fue medido en báscula calibrada y se aproximó al 0.1 Kg más cercano. La talla, se aproximó al 0.1 cm más cercano. El índice ponderal (IP) neonatal se calculó con la fórmula:

$$IP = \frac{\text{Peso al nacer (gr)}}{\text{Talla}^3} \times 100.$$

### **Toma de tensión arterial**

La tensión arterial se midió siguiendo las recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón<sup>231</sup>, con un esfigmomanómetro en el brazo derecho en 2 ocasiones diferentes, separadas por un lapso de 5 minutos entre sí, con las participantes sentadas en una posición confortable y después de haber permanecido 10 minutos en reposo.

### **Muestras de sangre**

A las gestantes se les tomaron 20 mL de sangre en ayunas entre las semanas 16-20 de gestación y en una segunda oportunidad entre las semanas 32-36 semanas. En el momento del parto se extrajeron aproximadamente 10 mL de sangre del cordón umbilical. La sangre fue centrifugada a 3000 rpm durante 10min a 4°C. Luego se separó el suero y el plasma se distribuyó en alícuotas en tubos de 1.5 mL y se congelaron a -70°C hasta el momento de las determinaciones bioquímicas.

### **Muestra de cordón umbilical**

Se tomaron muestras entre 10-20 cm de longitud de cordón umbilical que fueron transportadas en frascos con PBS estéril pH=7.2, con penicilina-estreptomicina al 2% mantenido a 4°C. Los cordones umbilicales fueron procesados en el laboratorio para la extracción de células endoteliales venosas, dentro de las 18 horas posteriores al parto.

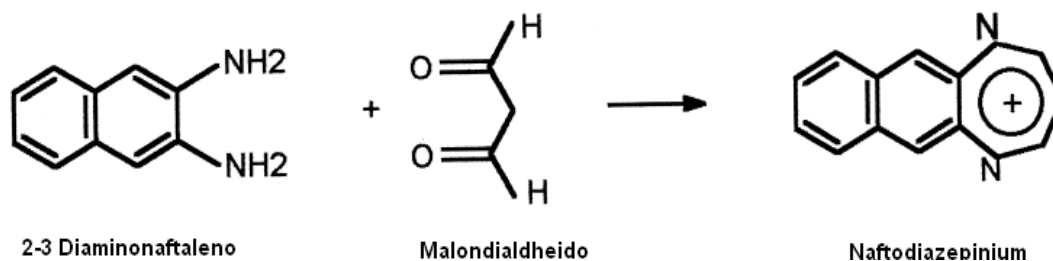
### **Evaluación de la función endotelial materna**

La función endotelial fue evaluada por medio de la Vasodilatación Mediada por Flujo (VMF) en un ecógrafo SIEMENS SG-60 de acuerdo con la técnica descrita por Celermajer *et al*<sup>232</sup> y el International Brachial Artery Reactivity Task Force<sup>233</sup>. Las gestantes fueron citadas en ayunas entre

las 7:00 y 9:00 am en el Laboratorio de Enzimas del Departamento de Ciencias Fisiológicas, Sección Bioquímica de la Universidad del Valle. Luego, en un cuarto acondicionado, sin estímulos sonoros o visuales nocivos y con temperatura controlada de aproximadamente 20 °C, se acostaron en posición supina en una camilla y se procedió a medir en el brazo derecho la tensión arterial y frecuencia cardiaca con un esfigomanómetro automático. Luego, en el extremo proximal del brazo izquierdo se colocó un brazalete de compresión y con un transductor de ultrasonido de 7.5 a 13 Hz se procedió a localizar la arteria braquial en el extremo distal del brazo y se midió el Diámetro Basal de la Arteria Braquial (**DABB**) en milímetros. Luego se procedió a ocluir la arteria (hiperemia) durante 5 minutos insuflando el brazalete hasta 200mm de Hg de presión, después se desinfló el brazalete y se midió en los primeros 15 segundos en el centro del vaso el pico sistólico de velocidad post hiperemia (**V<sub>m</sub>** en cm/seg) y a los 60 seg el Diámetro Pico Post Hiperemico (**DPPH**) en milímetros. Los datos de cada participante se registraron en formatos individuales de VMF (**Anexo 10**). Con los diámetros DABB y DPPH se calculó el porcentaje de cambio de la VMF ( $\Delta\text{VMF}\%$ ) usando la formula:  $\Delta\text{VMF}\% = \frac{\text{DPPH} - \text{DABB}}{\text{DABB}} \times 100$ . Con la V<sub>m</sub> y el DABB se caculo el Estrés de Fricción Endotelial (EFE), así:  $\text{EFE} = \frac{V_m}{\text{DABB}}$ . Luego se normalizó el  $\Delta\text{VMF}$  (VMFn) con la ecuación:  $\text{VMFn} = \frac{\Delta\text{VMF}}{\text{EFE}}$ .

### Determinación por HPLC concentración de malondialdehído en plasma

La concentración de malondialdehído plasmático total fue medido por HLPC según el método descrito por Steghens *et al*<sup>234</sup> con modificaciones. Este método se basa en la derivatización del malondialdehído en medio ácido a 37°C con el 2,3-Diaminonaftaleno (DAN) formando el naftodiazepinium molécula que puede ser detectada y cuantificada por HPLC a 311nm. (**Figura 5**).



**Figura 5.** Formación del naftodiazepinium a pH ácido.

El DAN se preparó a una concentración de 5.8 mM en HCl 2.4N, se mezcló en vortex 20 minutos y se almacenó toda la noche en nevera a 4°C. Al siguiente día, se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min, luego el sobrenadante fue almacenado en tubos de 1.5 mL a 4°C hasta su uso.

Para construir la curva de calibración se utilizó el Malondialdeído-bis-dimetilacetal (Sigma, 820756). Con el cual se preparó una solución stock 58uM, a partir de cinco diluciones seriadas del reactivo así: 1/10 etanol 100%, 1/10 etanol 100%, 1/10 etanol: agua 40:60, 1/10 NH<sub>4</sub>OH 90 uM y 1/10 en H<sub>2</sub>O. Para la curva de calibración se prepararon 4 soluciones patrón de 10 uM, 20 uM, 30uM y 40uM a partir de la solución de 58 uM y se procesaron de igual forma que las muestras del estudio como se describe a continuación.

Para el análisis de las muestras se utilizó el método de adición. Se tomaron 150uL de plasma que fueron dopados con 51.7 uL de la solución de MDA a 58uM, para una concentración final de MDA de 20uM. Luego 100 uL del plasma dopado fueron transferidos a viales de 1.5 mL y se mezclaron con 75 uL de NaCl 0,9% y 25 uL de DAN a 5.8Mm, la mezcla se incubó a 37 °C por 180 min en baño seco (Echotherm SC25). Posteriormente se precipitaron las proteínas plasmática con 100 uL de ácido metafosforico al 10% y se ultrafiltraron las muestras en tubos de Amicon Ultra-10K de 0,5 mL (Millipore, UFC5010BK) durante 20 minutos a 14000 g a 24°C. Se tomaron 150uL de la solución filtrada y se agregaron 52.5 uL de NaOH 0,5N y 97.5uL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mM pH=2.0. El factor de dilución final de la muestra fue 1,5.

La determinación del naftodiazepinium se realizó por HPLC (Bomba cuaternaria Agilent G13113; Inyector automatizado Agilent G13291B; Detector de diodos Agilent G1315C) en una columna C18 150 x 4.6mm, 5um (Zorbax, 883975-902 ) mantenida a 50°C y protegida por una pre-columna 4.6 x 12.5 mm, 5um (Zorbax, 820950-920). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo:acetato de amonio 10.5:89.5 v/v (Merk, 05432), filtradas a través de filtros de nylon 0.2um (Whatman, 7402-004). La solución de acetato de amonio se preparó a una concentración de 30mM ajustado a pH =2 con ácido fórmico. La tasa de flujo fue de 1mL/min. Se inyectaron a la columna 10 uL de cada muestra por duplicado. El cromatograma se registró a 311 nm durante 15 minutos. Después de cada inyección, la columna fue lavada con 15 mL de fase móvil. Para identificar el pico de interés durante la estandarización se utilizó un análisis espectral de 250 nm a 380 nm. El cuarto pico con tiempo de retención 8.5 min presentó el espectro de absorción reportado en la literatura para el naftodiazepinium. La integración del pico fue realizada con el programa EZChrom Elite 3.3.2. La

concentración de MDA en las soluciones patrón y las muestras se calculó a partir de las áreas de los picos. A las muestras se les restó el área del patrón de 20uM (Concentración adicionada durante el procesamiento) y se extrapolo la concentración a partir de la ecuación de la curva de calibración.

### **Proteína C reactiva de alta sensibilidad**

La proteína C reactiva de alta sensibilidad (CRP por sus siglas en inglés) se midió usando el Kit C-Reactive-Protein-hs (Biosystems, 31927). El método se basa en la aglutinación que se produce cuando la CRP plasmática reacciona con anticuerpos anti-proteína C reactiva que se encuentran unidos a micropartículas de látex. La aglutinación es proporcional a la concentración y puede ser medida por turbidimetría. Las soluciones de trabajo se prepararon mezclando 1 parte de reactivo B con 4 partes del reactivo A. A partir del estándar de calibración del kit se construyó una curva de calibración de 5 concentraciones: 13.3 mg/L, 10.6 mg/L, 8 mg/L, 5.3 mg/L, y 2.7 mg/L, usando solución salina como diluyente. Como controles de calidad se utilizaron los sueros Control Proteico I y II (Biosystem, 31211 y 31212) reconstituidos en agua destilada. Las mediciones se realizaron en el analizador automatizado de bioquímica clínica A15-Biosystems, el cual se programó para hacer reaccionar 3 uL de plasma con 300uL de reactivo de trabajo con lecturas de absorbancia a 535nm a los 10 segundos y 5 minutos a una temperatura de 37°C. La concentración se calculó a partir de la curva de calibración.

### **Determinación de los niveles de adiponectina y leptina plasmática.**

La adiponectina total en suero fue medida por ELISA utilizando el Kit HMW Adiponectin (Millipore, EZHMTA-64K). El principio de este kit se basa en la digestión previa de la adiponectina en la muestra de suero antes de ser medida por ELISA. De forma resumida el procedimiento que se realizó fue el siguiente: 20 uL de suero de las muestra y controles de digestión se diluyeron con 170uL de buffer de digestión en placas de 96 pozos y se incubaron durante 5 min a aproximadamente 700 rpm. Luego se agregaron 10uL de la solución de digestión y se agitaron las muestras otros 5 min a 700 rpm. Después se incubó la placa durante 2 horas a 37°C. En otra placa de 96 pozos se adicionaron 190 uL/pozo del buffer de dilución de las muestras y se mezclaron con 10 uL de muestra y controles digeridos en el primer paso. Se mezclaron durante 5 min a 700 rpm,

quedando listas las muestras y controles para los siguientes procedimientos. La placa de ELISA fue entonces sacada de la nevera y se agregaron 90ul de buffer de corrida a cada pozo. Luego se agregó 10 uL de las soluciones estándar (siete en total) por duplicado, preparadas por diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 a partir del estándar primario. Para el blanco, controles y muestras pretratadas se tomaron también 10ul por duplicado. La placa se incubó 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Después se decantó su contenido y se secó sobre toalla de papel. Luego, se lavaron 3 veces los pozos con 300uL del buffer de lavado en el lavador de microplacas (Thermo, 5165000).

Se adicionaron 100uL / pozo del anticuerpo de detección y se incubó 60 min a temperatura ambiente bajo agitación moderada. Se decantaron las placas y se lavó 3 veces con 300uL del buffer de lavado por pozo. Se agregaron 100 uL/pozo de la solución enzimática y se incubó bajo agitación moderada 30 min. Se removió el líquido de los pozos y se lavó otras 3 veces con 300uL/pozo del buffer de lavado. Entonces se adicionó 100uL de una solución con tetrametilbenzidina (sustrato enzimático) y se dejó reaccionar entre 5-20 min. Luego, se adicionó 100uL de la solución de parada y se agito la placa uno segundos para mezclar las soluciones por completo. Inmediatamente se realizó la lectura de la absorbancia a 450nm y 590nm en el lector de placas iMark (Biorad, 168-1130). La concentración de adiponectina en suero se calculó a partir de la ecuación de la curva de calibración que se multiplico por el factor de dilución de la muestra igual a 200.

### **Extracción de células endoteliales de vena de cordón umbilical**

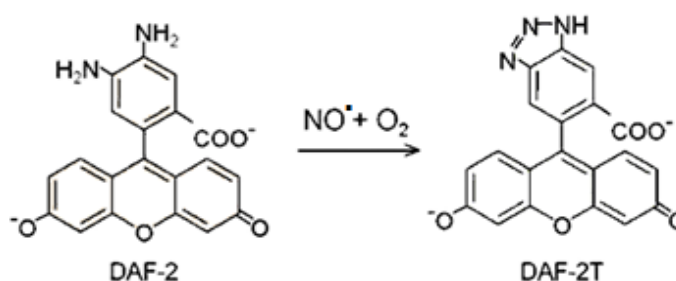
En cámara de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad, se extrajeron las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC, siglas en inglés) según la técnica descrita por Baudin *et al* <sup>235</sup>. La vena umbilical fue canalizada con una jeringa de 10mL que se utilizó para lavar la vena con 10mL de PBS estéril. Luego se perfundió la vena umbilical con una solución de collagenasa tipo IA con 449 UI/mL (Sigma 9891) y se pinzaron ambos extremos. El cordón se incubó con esta solución en un beaker con PBS estéril durante 15 min a 37 °C. Se perfundió la vena con una solución de PBS con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% y se recolectó el líquido en tubos plásticos estériles de 50mL que se centrifugaron a 200g durante 5 min. El “pellet” obtenido se resuspendió en 3mL de PBS de esta solución se tomaron 1.5mL fueron congelados. Los otros 1.5mL se utilizaron para establecer el cultivo primario en frascos T-25 como se describe a continuación.

### Cultivo de las células endoteliales

Las células endoteliales extraídas de la vena del cordón umbilical se cultivaron en el medio de cultivo EBM-2 (Lonza, 00190860,) suplementado con SFB al 10%, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue renovado a las 24 horas de iniciado el cultivo y luego cambiado cada 48 horas hasta que las células alcanzaron el 80% de confluencia. Después las células fueron desprendidas con una solución de tripsina al 0.25% durante 2 min a 37°C, se centrifugó a 200g por 10min y se resuspendió el pellet con 10mL de EBM-2 al 10% de SFB. Luego las células se subcultivaron en dos frascos T-25 hasta que alcanzaron nuevamente el 80% de confluencia, fueron desprendidas nuevamente tal como se indicó anteriormente y se congelaron en 1mL de solución de congelación (EBM-2 con 20% de SFB y 10% de DMSO) en nitrógeno líquido. Para evaluar la pureza del cultivo, las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD31 que fue revelado por inmunofluorescencia tal como se indica más adelante.

### Determinación de óxido nítrico (NO•) en cultivo

La producción del NO• se determinó en un cultivo terciario de las células endoteliales extraídas de la vena de cordón umbilical de las participantes del estudio. Para la cuantificación se utilizó la 4,5 diamino-fluoresceína (DAF-2. Sigma, D224) que en presencia de O<sub>2</sub> reacciona con el NO• produciendo triazolofluoresceína (DAF-2T) que puede ser cuantificada por fluorometría (**Figura 6**).



**Figura 6.** Formación del DAF-2T por reacción del NO• con DAF-2 en presencia de O<sub>2</sub>.

Una vez descongeladas las células del nitrógeno líquido se cultivó cada muestra por duplicado en placas de 24 pozos con diámetro de 14.8 mm. Una vez las células alcanzaron un 80%- 100% de confluencia, fueron lavadas con 2mL de PBS y se agregó 1 mL de DAF-2 a 0.1 uM disuelto en PBS. Se incubó 30 min a 37°C y 10% CO<sub>2</sub>. Luego se extrajo el sobrenadante y se congeló a

-70°C. Como control negativo, se utilizaron las células incubadas con el inhibidor de la Óxido Nítrico Sintasa endotelial, NG-Methyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA. Sigma M7033), 500 µl a 100µM durante 30 min antes de incubar con el flurocromo DAF-2. La cuantificación del DAF-2T en 0.5mL del sobrenadante se realizó por HPLC usando una columna C18 (5µm, 4.6 x150mm, Zorbax SB-18, Agilent, 014111021) a 23°C. Para la separación se utilizó un gradiente isocrático con una fase móvil de PBS 10mM pH 7.4 y acetonitrilo, en una relación 95:5 y un de flujo de 1mL/min. La detección del de DAF-2T se realizó con un detector de fluorescencia configurado a 490nm para la excitación y a 515nm para detección de la emisión de fluorescencia; cada muestra se analizó por duplicado.<sup>236</sup> Cada corrida cromatográfica tuvo una duración de 30 min .La curva de calibración del DAF-2T se construyó a través de la reacción de 10 uL de NOC-9 100Um (Sigma M1555) un donante de NO<sup>•</sup> con 40uL de DAF-2 25uM. A partir de esta solución stock de DAF-2T se prepararon cinco soluciones estándar de 5, 20, 60, y 100 nM. La integración del área del pico de DAF-2T se realizó con el programa EZChrom Elite 3.3.2.

### **Cuantificación de proteínas en células endoteliales**

La determinación de proteínas en el lisado de células endoteliales se realizó por medio de la prueba del ácido bicinónico (Sigma, BCA-1kit). Para esto se preparó una solución de trabajo compuesta por 50 partes de una solución de ácido bicinónico con 1 parte de Sulfato de cobre (II) pentahidratado al 4%. Se adicionaron 200ul/pozo de esta solución a una placa de 96 pozos. Luego se agregaron 25ul de lisado celular a cada pozo. Cada muestra fue medida por duplicado. La curva de calibración se construyó con 6 soluciones patrón de albúmina bovina a 50, 100, 200, 400 y 600 en ug/mL. Como blanco se utilizó el buffer de lisis. La placa fue incubada a 37 °C durante 30 minutos. Luego se leyó la absorbancia a 565 nm en lector de placas.

### **Nivel de expresión de eNOS y ARG2**

La expresión proteica de las enzimas eNOS y ARG2, se determinó en cultivo terciario de células endoteliales mediante la técnica de Western blot<sup>237</sup>. La células fueron cultivadas en cajas T-25 en medio de cultivo EBM-2, hasta que alcanzaron una confluencia entre el 80- 90%, luego fueron lisadas con buffer RIPA a 4°C suplementado con un inhibidor de proteasas (Roche, 05892970001). Las proteínas totales del lisado se cuantificaron por el método del ácido bicinónico.

Antes de la corrida electroforética las proteínas fueron desnaturalizadas en buffer Laemmli a 100°C durante 5 min en baño seco. Se dejaron enfriar los tubos y se procedió a adicionar 30ug/pozo de proteína por duplicado de cada muestra, luego fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% durante 90 minutos a amperaje de constante 25 mA (120V). Inmediatamente, las proteínas fueron electrotransferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Pierce, 88018) durante 1 hora con voltaje constante de 100V a 4°C. Luego las membranas fueron teñidas con una solución de Rojo de Ponceau al 0,2% p/v durante 5 min. Para verificar la transferencia completa de las proteínas, el gel de poliacrilamida fue teñido con azul de Comassie durante 60 min y decolorado con una solución metanol-ácido acético 50:10. Las membranas fueron recortadas con tijeras a la altura del marcador de 75 kDa y fueron bloqueadas con una solución de leche al 2% p/v en TBS-T durante 30 min. Luego se lavó durante 1 minuto con TBS y se adicionaron los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T: Anti-eNOS policlonal dilución 1:1000 (Abcam, ab5589) y anti-Arg2 policlonal (Abcam, Ab81505) dilución 1:1000 y se incubaron durante toda una noche bajo agitación a 4°C. Al día siguiente se lavaron las membranas 3 veces con TBST y 3 veces con TBS. Inmediatamente, se adicionó el anticuerpo secundario un Anti-IgG de conejo (origen cabra) conjugado con peroxidasa de rábano (Abcam, 31430) dilución 1: 10000 en TBST y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Las bandas fueron evidenciadas por quimioluminiscencia usando el reactivo Supersignal West Pico kit (Pierce, 34080) y luego reveladas en películas auto radiográficas (CL-XPosure Film, 34091). Los anticuerpos unidos a la membrana fueron luego removidos con el buffer Glicina-SDS-Tween20 pH 7,2 durante 15 min, se lavaron 2 veces con TBS y TBST y se bloqueó por segunda vez con leche al 2% en TBST. Se adicionó el anticuerpo anti-beta actina policlonal (Abcam, ab8227) 1:1000, y se procedió como se describió anteriormente hasta su revelado. Las películas fueron escaneadas y luego las bandas se cuantificaron mediante el programa ImageJ 1.44 (NIH, Bethesda, MD)<sup>238</sup>. La expresión de la eNOS y la ARG2 se normalizó con la banda de beta actina.

### **Inmunofluorecencia para Nrf2, PGC1A y CD31**

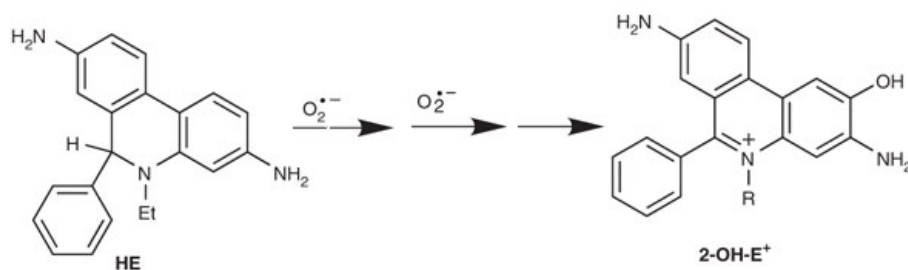
Las células endoteliales extraídas de la vena de cordón umbilical fueron cultivadas en placas de 24 pozos hasta que alcanzaron entre el 60-80% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo y se lavó cada pozo con PBS estéril pH 7.2. Luego se fijaron las células con metanol absoluto frío a -25°C durante 15 minutos. Se retiró el metanol y se almacenaron las placas a -20°C. Para la

inmunofluorescencia los pozos se lavaron con SFB al 3% en 3 ocasiones, se permeabilizó con Triton X-100 al 0.2% en PBS 15 minutos y se bloqueó con SFB al 3% en PBS +0,5% de Tween20. Luego se adicionaron los anticuerpos primarios: El anti-Nrf2 policlonal de conejo (Abcam, ab31163) y el anti-PGC-1 policlonal de conejo (Abcam 54481) a una dilución 1/100, mientras que el anti-CD31 monoclonal de ratón se utilizó con una dilución 1/200 (Abcam, No 498) : Las placas se incubaron con los anticuerpos primarios en temperatura ambiente durante 60 min. Luego, se lavaron los pozos tres veces con PBS y se agregaron los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos: Un anti-IgG de conejo (abcam, ab6939, Dylight 488) y anti-IgG de ratón (abcam: ab96879; cy3) dilución 1:500, se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS y se agregó el medio de montaje con DAPI para marcar el ADN del núcleo. La captura de la fluorescencia se realizó en microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 700). La fluorescencia total celular corregida (FTCC: siglas en inglés) se calculó en aproximadamente 25 células/ campo con el programa ImageJ 1.4 por medio de la ecuación:

**FTCC** = Fluorescencia integrada - (Área celular x Background de la fluorescencia).

### Determinación de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

La producción del  $O_2^{\bullet-}$  en el cultivo de las células endoteliales fue medida a través su reacción con la dihidroetidina (HE) que genera 2- hidroxietidio ( $2-OH-E^+$ ), un producto específico de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  (**Figura 7**).<sup>239</sup> La cuantificación de  $2-OH-E^+$  en cultivo, se realizó por HPLC según el método descrito por Zielonka *et al*.<sup>240</sup>



**Figura 7.** Mecanismo propuesto para la formación de la  $2-OH-E^+$  a partir de la reacción de la HE con el  $O_2^{\bullet-}$

Las células endoteliales cultivadas en frascos T-25 cuando alcanzaron una confluencia entre el 80-100% fueron lavadas con PBS estéril e incubadas con 3 mL de HE a 10uM por 30 min en oscuridad, luego las células fueron raspadas en PBS estéril frío con un raspador de goma, se transfirieron a un tubo estéril de 15 mL y fueron centrifugadas a 1000xg por 5 min a 4°C. El precipitado obtenido fue almacenado a -70 °C. Para la normalización se midió la concentración de proteínas en el precipitado por el método del ácido bicinónico. El 2-OH-E<sup>+</sup> fue cuantificado por HPLC (Agilent technologies 1260). De cada muestra se inyectaron 50uL, usando como fase estacionaria una columna C18 (Zorbax 300SB-C<sub>18</sub> 5µm 4.6x150mm). Para la separación se utilizó una fase móvil a un flujo de la de 0.5 mL/min con un gradiente de concentración (**Tabla1**). La fase móvil estuvo compuesta por dos soluciones: Agua (grado MiliQ) con ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) (Solución A) y acetonitrilo 99.9%, 0.1% ácido trifluoroacético (Solución B).

**Tabla 1.** Gradiente de concentración de la fase móvil para la separación y detección de la 2-OH-E<sup>+</sup>.

| Tiempo (min) | Flujo (mL/min) | % Solución A | % Solución B |
|--------------|----------------|--------------|--------------|
| 0            | 0.5            | 90           | 10           |
| 46           | 0.5            | 30           | 70           |
| 47           | 0.5            | 0            | 100          |
| 55           | 0.5            | 0            | 100          |
| 60           | 0.5            | 90           | 10           |
| 65           | 0.5            | 90           | 10           |

La detección del 2-OH-E<sup>+</sup> se realizó con un detector de arreglo de diodos a 290nm, con un tiempo de retención de 27,2 min. Para la cuantificación se construyó una curva estándar de 2-OH-E<sup>+</sup> con 8 soluciones patrón de 2.5uM, 5.0uM, 10uM, 15uM, 20uM, 40uM, 80uM y 160uM. Cada corrida tuvo una duración de 65 minutos.

### **Extracción del ADN de placenta**

El aislamiento del ADN se realizó con el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN su concentración se determinó espectrofotométricamente en Nanodrop 2000C midiendo su absorbancia (A) a 260nm basado en la fórmula:  $\left[ \text{ADN} \frac{\text{ng}}{\text{uL}} \right] = A_{260\text{nm}} \times 50 \frac{\text{ng}}{\text{uL}}$ . La pureza de ADN se estimó por la relación  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ .

### **Determinación de la metilación en ADN placentario.**

Para la determinación del efecto de la suplementación sobre la metilación de citosinas en regiones promotoras en el ADN placentario se utilizó un arreglo de PCR dependiente del estado de metilación. La técnica se basa en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE: methylation-sensitive restriction enzyme) y enzimas de restricción independientes de metilación (MDRE: methylation-dependent restriction enzyme). Los productos de la digestión son amplificados y cuantificados por medio de una PCR en tiempo real con primers específicos diseñados por el fabricante para cada gen de interés por pozo.

Para este estudio se diseñaron placas de 96 pozos para 22 genes de interés (**Tabla 2**) con el EpiTect Methyl II PCR System (Qiagen, 335112), los genes fueron seleccionados por su participación en procesos angiogénicos y la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup> después de revisión del Genbank.

**Tabla 2.** Listado de genes evaluados mediante el EpiTect Methyl II PCR System.

| <b>Siglas</b>        | <b>Nombre del gen</b>                                      | <b>Localización</b> |
|----------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b><i>SIRT1</i></b>  | Sirtuína 1                                                 | Cr. 10 q22.31       |
| <b><i>VEGFA</i></b>  | Vascular endothelial growth factor A                       | Cr. 6 p12           |
| <b><i>FGF2</i></b>   | Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (básico)           | Cr. 4 q27           |
| <b><i>ITGB5</i></b>  | Integrina, beta 5                                          | Cr. 3 q21.2         |
| <b><i>MTOR</i></b>   | Diana de rapamicina en células de mamífero                 | Cr. 1 p36.22        |
| <b><i>TIMP2</i></b>  | Inhibidor tisular de metaloproteasas 3                     | Cr. 17 q25.4        |
| <b><i>KLLN</i></b>   | Inhibidor de la replicación del ADN regulada por p53       | Cr. 10 q23.31       |
| <b><i>NRP1</i></b>   | Neuropilina 1                                              | Cr. 10 p11.22       |
| <b><i>LEP</i></b>    | Leptina                                                    | Cr.7 q32.1          |
| <b><i>KIT</i></b>    | V-Kit homologo al oncogén viral del sarcoma felino 4       | Cr.4 q12            |
| <b><i>NFE2L2</i></b> | Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2            | Cr.2 q31.2          |
| <b><i>SLC7A1</i></b> | Miembro 1 de la familia 7 de los transportadores de soluto | Cr.13 q12.3         |
| <b><i>KEAP1</i></b>  | Proteína 1 asociada a Kelch-Like ECH                       | Cr.19 p13.2         |
| <b><i>FGFR1</i></b>  | Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos -1      | Cr.8 p11.22         |
| <b><i>FLT1</i></b>   | Tirosina-quinasa Fms-relacionada 1                         | Cr. 13q12.3         |
| <b><i>AGTR1</i></b>  | Receptor de la angiotensina tipo 1                         | Cr.3 q24            |
| <b><i>CKS1B</i></b>  | Subunidad reguladora de quinasas dependientes de ciclinas  | Cr.1 q21.3          |
| <b><i>FSCN1</i></b>  | Fascin homolog 1, actin-bundling protein                   | Cr.7 p22.1          |
| <b><i>DDAH2</i></b>  | Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2                    | Cr.6 p21.33         |
| <b><i>KDR</i></b>    | Kinase insert domain receptor                              | Cr.4 q12            |
| <b><i>ARG2</i></b>   | Arginasas tipo II                                          | Cr.14 q24.1         |
| <b><i>LEPR</i></b>   | Receptor de leptina                                        | Cr.1 p31.3          |
| <b><i>CDH1</i></b>   | Caderina 1-Control                                         | Cr.16 q22.1         |
| <b><i>ACTB</i></b>   | actina-Control                                             | Cr.7 p22.1          |

Para todas las determinaciones 1ug de ADN por muestra fue diluido en 26µL del buffer de digestión 5X y agua libre de DNasas y RNasas hasta un volumen final a 120µL. Inmediatamente se alicuotaron 4 fracciones de 28 uL/tubo, según el tubo se agregaron las enzimas de digestión (**Tabla 3**) y se incubó a 37 °C durante toda la noche en el termociclador. La digestión enzimática fue inactivada calentando los tubos a 65°C durante 20 min y se almacenó a -20°C.

**Tabla 3.** Volúmenes para la digestión del ADN con las enzimas de restricción.

| Componente                                | M <sub>o</sub> | M <sub>s</sub> | M <sub>d</sub> | M <sub>sd</sub> |
|-------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| DNA diluido                               | 28uL           | 28uL           | 28uL           | 28uL            |
| Enzima sensible a metilación              |                | 1uL            |                | 1uL             |
| Enzima independiente de metilación        |                |                | 1uL            |                 |
| H <sub>2</sub> O libre de DNasas y RNasas | 2uL            | 1uL            | 1uL            | 1uL             |
| Volumen Final                             | 30uL           | 30uL           | 30uL           | 30uL            |

La digestión fue inactivada calentando los tubos a 65°C durante 20 min y se almacenó a -20°C. Luego, 30uL de cada tubo de digestión se mezclaron con 330uL del PCR master mix (Quiagen, 330503) y se ajustó el volumen a 660 uL con agua libre de DNasas y RNasas. Después se tomaron 25uL/pozo para la PCR en tiempo real en una placa de 96 pozos (**Figura 8**).

| Digestion Pozos |   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|-----------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M <sub>o</sub>  | A | G01 | G02 | G03 | G04 | G05 | G06 | G07 | G08 | G09 | G10 | G11 | G12 |
|                 | B | G13 | G14 | G15 | G16 | G17 | G18 | G19 | G20 | G21 | G22 | SEC | DEC |
| M <sub>s</sub>  | C | G01 | G02 | G03 | G04 | G05 | G06 | G07 | G08 | G09 | G10 | G11 | G12 |
|                 | D | G13 | G14 | G15 | G16 | G17 | G18 | G19 | G20 | G21 | G22 | SEC | DEC |
| M <sub>d</sub>  | E | G01 | G02 | G03 | G04 | G05 | G06 | G07 | G08 | G09 | G10 | G11 | G12 |
|                 | F | G13 | G14 | G15 | G16 | G17 | G18 | G19 | G20 | G21 | G22 | SEC | DEC |
| M <sub>sd</sub> | G | G01 | G02 | G03 | G04 | G05 | G06 | G07 | G08 | G09 | G10 | G11 | G12 |
|                 | H | G13 | G14 | G15 | G16 | G17 | G18 | G19 | G20 | G21 | G22 | SEC | DEC |

**Figura 8.** Esquema placa del PCR array. Las muestras de DNA digeridas por las enzimas de restricción fueron adicionadas por filas como se indica en la **Figura**. **M<sub>o</sub>**: DNA no digerido. **M<sub>s</sub>**: DNA digerido con enzimas de restricción sensibles a metilación. **M<sub>d</sub>**: DNA digerido con enzimas de restricción insensibles a la metilación. **M<sub>sd</sub>**: DNA digerido por ambas enzimas de restricción. SEC: Control de **M<sub>s</sub>**. DEC: Control de **M<sub>d</sub>**.

Después de adicionar las muestras a los pozos, se sellaron las placas y se amplificaron en el termociclador para PCR en tiempo real CFX-96 (Biorad, CFX96), con el siguiente programa de amplificación: 95°C x 10min x 1 ciclo; 90°C x 30 seg, 72°C x 1min, x 3 ciclos; 97°C x 15 seg, 72°C x 1min, x 40 ciclos. La detección de la fluorescencia del SYBR Green se programó durante el paso del anillaje y extensión a 72°C. Al finalizar la PCR para evaluar la especificidad de la reacción se programó una curva de fusión así: 97°C 1min, 55°C 30seg, Incremento de 2°C/seg desde 55°C hasta 95°C. Luego se revisó la gráfica de la curva. El porcentaje de metilación en las muestras fue calculado a partir de la relación entre la fracción metilada y desmetilada por el método de  $\Delta C_T$ . El análisis de los datos se realizó normalizando la cantidad de cada una de las reacciones de digestión ( $M_s$ ,  $M_d$ ,  $M_{sd}$ ) por la cantidad de ADN total-no digerido ( $M_o$ ). La cantidad de ADN en cada reacción se calculó a partir del  $C_T$  de cada pozo así:  $C_{M_o} = 2^{-CT(M_o)}$ ;  $C_{M_s} = 2^{-CT(M_s)}$ ;  $C_{M_d} = 2^{-CT(M_d)}$   $C_{M_{sd}} = 2^{-CT(M_{sd})}$ .

La fracción desmetilada ( $F_{DM}$ ): 
$$F_{DM} = \frac{C_{M_d}}{C_{M_o} - C_{M_{sd}}} = \frac{2^{-CT(M_d)}}{2^{-CT(M_o)} - 2^{-CT(M_{sd})}}$$

La fracción hipermetilada ( $F_{HM}$ ): 
$$F_{HM} = \frac{C_{M_s}}{C_{M_o} - C_{M_{sd}}} = \frac{2^{-CT(M_s)}}{2^{-CT(M_o)} - 2^{-CT(M_{sd})}}$$

La fracción con metilación intermedia ( $F_{IM}$ ): 
$$F_{IM} = 1 - F_{HM} - F_{DM}$$

La fracción metilada ( $F_M$ ): 
$$F_M = F_{HM} - F_{IM}$$

La fracción resistente a la metilación ( $F_R$ ):

$$F_R = \frac{C_{M_{sd}}}{C_{M_o}} = \frac{2^{-CT(M_{sd})}}{2^{-CT(M_o)}} = 2^{-CT(M_{sd})-CT(M_o)} = 2^{-\Delta C_T(M_{sd}-M_o)}$$

Los valores obtenidos de metilación de cada fracción fueron expresados en forma de porcentaje. Los cálculos se realizaron introduciendo los valores de  $C_T$  de la PCR en tiempo real, usando el algoritmo provisto por el fabricante en la página web: [www.sabiosciences.com/dna methylation data analysis.php](http://www.sabiosciences.com/dna%20methylation%20data%20analysis.php). La amplificación correspondiente a >60% representa regiones hipermetiladas, 0%

indica completamente desmetilada y entre 0% a 60% representa una fracción con metilación intermedia.

### **Extracción ARN de placenta**

Para la extracción del ARN total se utilizaron 6 muestras, 3 del grupo control y 3 del grupo suplementado. Se pesaron  $\approx 100\text{mg}$  tejido placentario y se mezcló con 1mL del reactivo de Trizol (Ambion, 1559606) en viales plásticos de 1,5mL. El tejido fue homogenizado con una jeringa de 3 mL (BD, 309585) con aguja 19G1 (BD, 305186). Luego se adicionó 0.2 mL de cloroformo y se mezcló en vortex  $\approx 15$  seg y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a  $12000\text{ g} \times 15\text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Se extrajeron  $\approx 400\text{uL}$  de la fase acuosa a un vial de 1,5 mL y se adicionaron 0,5mL de isopropanol al 100%. Se incubó a temperatura ambiente 10min y luego se centrifugo  $12000\text{g} \times 10\text{min}$  a  $40^\circ\text{C}$ . Se extrajo la fase líquida y se lavó el pellet de ARN en 1 mL de etanol frío al 75%, luego se centrifugó a  $7500\text{g} \times 5\text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ , se extrajo el etanol y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente 5 min. El ARN se resuspendió en 40 uL de agua (grado HPLC) y se incubó a  $55^\circ\text{C}$  por 5 min. Luego, el ARN fue tratado con una DNasa I y purificado en columnas con el Kit RNeasy Mini (Quiagen; 74104). La cuantificación del ARN se realizó en NanoDrop 2000c y la concentración se calculó con la fórmula:  $[\text{ARN} \frac{\text{ng}}{\text{uL}}] = A_{260\text{nm}} \times 40 \frac{\text{ng}}{\text{uL}}$ .

### **Diseño de primers para RT-PCR**

Para el diseño de los primers de la RT-PCR, se tomaron como secuencias de referencia las reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias referencia correspondientes a cada gen fueron: H19 (Cromosoma 11; NR\_002196), MEG3 (Cromosoma 14; NR\_002766.2, NR\_003530.2, NR\_003531.3, NR\_033358.1, NR\_033359.1, NR\_033360.1, NR\_046464.1, NR\_046465.2, NR\_046466.1, NR\_046467.1, NR\_046468.2, NR\_046469.1, NR\_046470.2, NR\_046471.1, NR\_046472.1, NR\_046473.1) MEG8 (Cromosoma 14; NR\_024149.2). KCNQ10T1 (Cromosoma 11; NR\_002728.3), IPW (Cromosoma 15; NR\_023915.1), GNAS-AS1 (Cromosoma 20; NR\_002785.2) USP32B (Cromosoma 17, NR\_003190.2), MAGI2-AS3 (Cromosoma 7; NR\_038343.2, NR\_038346.1, NR\_038345.1, NR\_038344.1) y la  $\beta$ -ACTINA (Cromosoma 7; NM\_001101.3). Para diseñar la secuencia de los primers (**Tabla 4**), se utilizó el programa Primer3. La especificidad

para cada región se analizó en la base de datos Primer-Blast<sup>241</sup>. Después se evaluó la formación de homodímeros y heterodímeros con el programa Oligoanalyzer 3.1<sup>242</sup>.

**Tabla 4.** Primers para RT-PCR.

| Gen       | Secuencias de cebadores    | Tm   | Tamaño amplicon |
|-----------|----------------------------|------|-----------------|
| H19       | GCGGGTCTGTTTCTTTACTTCC     | 59,5 | 80              |
|           | TTTCATGTTGTGGGTCTGGA       | 60,1 |                 |
| MEG3      | GCTGAAGAACTGCGGATGGAA      | 60,9 | 106             |
|           | CCCAAACCAGGAAGGAGACGA      | 61,7 |                 |
| MEG8      | AGGGGGTTTCTGAGGACA         | 56,9 | 125             |
|           | CACCAAGCGAGTCTGGAAG        | 58,2 |                 |
| KCNQ10T1  | CCAGATTAGGTCAGCATTCAAGC    | 59,7 | 136             |
|           | AGTGGTTGGGTGAAGTTACTAGG    | 59,7 |                 |
| IPW       | ATGCCCTTGCCTTAACTTTCA      | 58,1 | 100             |
|           | TTCAAACATACTTCCCCAACAT     | 56,6 |                 |
| GNAS-AS1  | ATTGCTGCCGTTTTTGCT         | 59,9 | 87              |
|           | GCCATTTTCAGCACGGGTAG       | 59,5 |                 |
| USP32P1   | ATCTCCCAGACAGACAACAAGG     | 59,7 | 110             |
|           | TGAGGTGAAGAGAAGGAAAGC      | 57,6 |                 |
| MAGI2-AS3 | GTACTIONTCCATGAAGCTGAGGTTA | 58,2 | 89              |
|           | ATCACCATCTCTCAACTCTGCA     | 59,2 |                 |
| β Actina  | GCTACGAGCTGCCTGACG         | 60,6 | 76              |
|           | TGAGGCACTCTCCAGCC          | 58,9 |                 |

### RT-PCR para ARNs largos no codificantes (lncRNAs)

Para la cuantificación de la expresión de los lncRNAs, se realizó una retrotranscripción primer específica del ARN a ADN, utilizando el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18080-044). Se utilizaron 800ng de ARN total y 2 picomoles de cada primer reverso para los genes: H19, IPW, MEG3, MEG8, USP32P1, MAGI-AS3, GNAS-AS1, KCNQ10T1 y β-ACTINA. La PCR cuantitativa se realizó en un centrífugo termociclador LightCycler® 480 System Roche-480. Para cada reacción se tomó 1μL de cDNA y 19μL el Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 4385612) en placas de 384 pozos (Applied Biosystems, 4309849). Cada gen fue medido por triplicado, la corrida se programó durante 40 ciclos a 60 °C. La expresión fue normalizada usando la expresión de la beta-actina y la expresión relativa de los genes se calculó usando la fórmula de  $2^{-\Delta CT}$  con  $\Delta CT = CT_{(\text{gen blanco})} - CT_{(\text{Control})}$ .

## Análisis estadístico

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio para determinar la frecuencia y distribución de cada una de las variables estudiadas. La distribución normal de las variables con un  $n \geq 20$  fue analizada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, aquellas variables con  $n < 20$  fueron valoradas por la prueba de Shapiro-Wilk en cada uno de los grupos. Las variables que no presentaron distribución normal y que después haber sido transformadas logarítmicamente no alcanzaron la normalidad en los dos grupos, fueron analizadas con la prueba Mann Whitney bilateral a un nivel de significancia de  $p < 0.05$  o la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas. Para las variables con distribución normal se estableció si había diferencia en las medias después de la intervención por medio del test de *Student* para muestras independientes con un nivel de significancia  $P < 0,05$ . Las diferencias intragrupo después de la intervención se evaluaron con el test de Student para muestras relacionadas.

Adicionalmente, para aumentar la sensibilidad del análisis sobre el efecto de la intervención sobre la variable resultado de VMF se realizó un Análisis de Covarianza (ANCOVA) usando covariables que habían sido medidas antes de la intervención. En el modelo solo se incluyeron covariables con un nivel  $P < 0,05$ .<sup>243</sup>

Para establecer si había correlación entre las variables que presentaran una distribución normal y un rango continuo, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Para aquellas variables que no cumplieron estas condiciones se estimó el coeficiente de correlación de Spearman. Los análisis se realizaron en programa SPSS 15.0. La diferencia entre frecuencia de variables cualitativas entre se evaluó con la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), Para las categorías con  $n < 5$  se utilizó la corrección de Fisher en el módulo StacCalc del paquete estadístico EPI INFO 7.1.

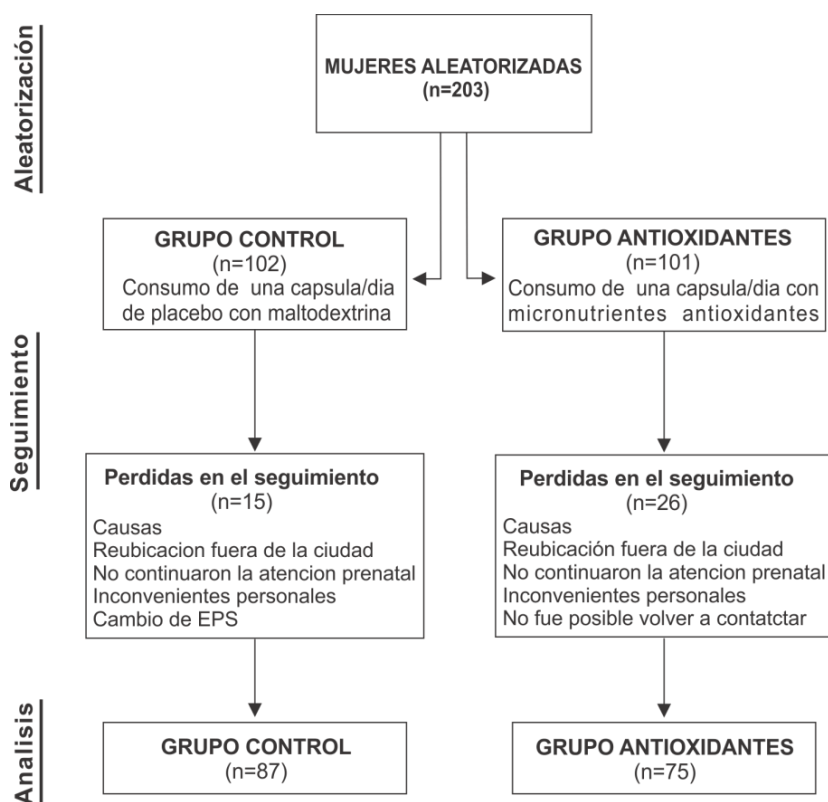
# CAPÍTULO 1

## ANÁLISIS DE LA ALEATORIZACIÓN, DESERCIÓN EXPERIMENTAL Y ADHERENCIA AL TRATAMIENTO

### Análisis de la Aleatorización

La aleatorización en este ensayo clínico se realizó por bloques balanceados, método que permite evitar el desbalance entre el número de participantes en cada grupo y garantiza que en ningún momento durante el período de aleatorización se presente una cantidad de sujetos superior en uno de los grupos.

En este estudio fueron aleatorizadas 203 primigestantes (**Figura 9**). En el grupo control se asignaron 102 participantes y en el grupo suplementado con antioxidantes 101 embarazadas. El análisis de las variables antropométricas y hemodinámicas al inicio del estudio no mostró diferencia en ninguna de las variables analizadas (**Tabla 5**), indicando que el método de aleatorización cumplió con su propósito.



**Figura 9.** Diagrama de la progresión del ensayo clínico.

**Tabla 5.** Parámetros antropométricos y hemodinámicos basales de las primigestantes.

| Parámetro                     | Grupo Control Basal |                  |             | Grupo Antioxidantes Basal |                  |             | p     |
|-------------------------------|---------------------|------------------|-------------|---------------------------|------------------|-------------|-------|
|                               | n                   | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%      | n                         | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%      |       |
| Edad (años) <sup>£</sup>      | 102                 | 20,0 $\pm$ 3,4   | 19,4 – 20,7 | 101                       | 19,9 $\pm$ 3,1   | 19,3 – 20,5 | 0,927 |
| Edad gestacional <sup>£</sup> | 102                 | 16,72 $\pm$ 2,1  | 16,3 – 17,1 | 100                       | 16,6 $\pm$ 2,0   | 16,25 -17,7 | 0,828 |
| Peso (Kg)                     | 102                 | 54,2 $\pm$ 8,6   | 52,5 -55,9  | 101                       | 54,1 $\pm$ 9,2   | 52,3 – 55,9 | 0,929 |
| Talla (cm)                    | 102                 | 156,2 $\pm$ 6,5  | 155 – 157   | 101                       | 156,4 $\pm$ 6,2  | 155 - 158   | 0,764 |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )      | 102                 | 22,3 $\pm$ 3,3   | 21,6 – 22,9 | 101                       | 22,1 $\pm$ 3,4   | 21,4 – 22,8 | 0,766 |
| Pliegue suprailíaco           | 102                 | 13,9 $\pm$ 5,0   | 12,9 – 14,9 | 101                       | 13,5 $\pm$ 5,6   | 12,4 – 14,6 | 0,542 |
| Pliegue tricipital            | 102                 | 13,8 $\pm$ 4,5   | 12,9 -14,7  | 101                       | 14,3 $\pm$ 5,4   | 13,2 – 15,3 | 0,466 |
| Pliegue subescapular          | 102                 | 12,5 $\pm$ 5,0   | 11,6 – 13,5 | 101                       | 13,1 $\pm$ 5,3   | 12,1 – 14,2 | 0,433 |
| Grasa corporal (%)            | 102                 | 25,0 $\pm$ 5,0   | 24,0 – 26,0 | 101                       | 25,0 $\pm$ 5,4   | 24,0 – 26,0 | 0,99  |
| TAS (mm Hg)                   | 102                 | 108 $\pm$ 8,0    | 106 - 109   | 101                       | 107 $\pm$ 7,0    | 105 - 108   | 0,293 |
| TAD (mm Hg)                   | 102                 | 64 $\pm$ 6,0     | 63 – 65     | 101                       | 64 $\pm$ 6,0     | 63 -66      | 0,759 |

IMC: Índice de masa corporal. TAS: Tensión arterial sistémica. TAD: Tensión arterial diastólica. Pliegues cutáneos en milímetros.  $\bar{X}$ : Media, DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza de la media. La diferencia entre medias fue calculada con la prueba t de Student para muestras independientes. £ Calculada con la U de Mann-Whitney bilateral.

Para el análisis nutricional se tomaron en cuenta tres rangos del Porcentaje de Adecuación (PA) nutricional. Un PA <75% fue considerado como deficiente, entre el 75% -115% aceptable y mayor del 115% como elevado. El análisis no mostro diferencias en estas tres categorías entre los grupos (**Tabla 6**). Adicionalmente se encontró que para la mayoría de los macro y micronutrientes la mayor parte de las primigestantes seleccionadas presentaron PA nutricional deficientes. La única excepción fueron las grasas, donde la mayoría de las participantes tuvieron un consumo elevado. Mientras que el consumo de proteínas y carbohidratos fueron bajos. La ingesta promedio de macro y micronutrientes a excepción de la vitamina B12 estuvo por debajo de las recomendaciones dietarias, siendo la ingesta de hierro la más baja (**Anexo 11**).

**Tabla 6.** Porcentajes de adecuación nutricional de las embarazadas

| Parámetro            | PA <75%       |                    |       | PA 75-115%    |                    |       | PA >115%      |                    |       |
|----------------------|---------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|
|                      | Grupo control | Grupo suplementado | p     | Grupo control | Grupo suplementado | p     | Grupo control | Grupo suplementado | p     |
| Kilocalorías         | 22,8%         | 24.2%              | 0,808 | 54,5%         | 58,6%              | 0,559 | 22,8%         | 17,2%              | 0,329 |
| Proteína (gr)        | 49,5%         | 56%                | 0,361 | 39,6%         | 33,0%              | 0,335 | 10,9%         | 11,0%              | 0,980 |
| Carbohidratos (gr)   | 69,3%         | 75,0%              | 0,374 | 27,7%         | 20,0%              | 0,178 | 3,0%          | 4,0%               | 0,709 |
| Grasa (gr)           | 5,0%          | 10,1%              | 0,180 | 17,8%         | 15,2%              | 0,618 | 77,2%         | 74,7%              | 0,685 |
| Colesterol (mg)      | 48,5%         | 54%                | 0,441 | 8,9%          | 10,0%              | 0,798 | 42,6%         | 36,0%              | 0,345 |
| Sodio (mg)           | 92,0%         | 92,0%              | 0,983 | 4,0%          | 7,0%               | 0,366 | 4,0%          | 1,0%               | 0,375 |
| Calcio (mg)          | 91,1%         | 95%                | 0,294 | 8,9%          | 5,0%               | 0,294 | 0%            | 0%                 | -     |
| Fosforo (mg)         | 64,4%         | 75,0%              | 0,104 | 27,7%         | 20,0%              | 0,205 | 7,9%          | 5,0%               | 0,419 |
| Magnesio (mg)        | 96,1%         | 96%                | 0,999 | 3,9%          | 2,0%               | 0,701 | 0%            | 2,0%               | 0,487 |
| Hierro (mg)          | 100%          | 100%               | -     | 0%            | 0%                 | -     | 0%            | 0%                 | -     |
| Zinc (mg)            | 60,4%         | 61,0%              | 0,930 | 29,7%         | 21,0%              | 0,209 | 9,9%          | 18,0%              | 0,146 |
| Cobre (ug)           | 96,1%         | 95,0%              | 0,975 | 3,9%          | 4,0%               | 0,999 | 0%            | 1,0%               | 0,995 |
| Vitamina A (UI)      | 56,9%         | 56%                | 0,985 | 30,4%         | 20,0%              | 0,124 | 12,7%         | 24,0%              | 0,059 |
| Vitamina E (UI)      | 81,4%         | 79%                | 0,805 | 11,8%         | 10,0%              | 0,859 | 6,9%          | 11,0%              | 0,432 |
| Tiamina (mg)         | 86,1          | 87%                | 0,977 | 10,9%         | 6,0%               | 0,320 | 3,0%          | 7,0%               | 0,323 |
| Riboflavina (mg)     | 73.3%         | 77.0%              | 0,653 | 20,8%         | 15,0%              | 0,375 | 5,9%          | 8,0%               | 0,796 |
| Niacina (mg)         | 82.0%         | 81.0%              | 0,883 | 13,1%         | 14,0%              | 0,860 | 5,0%          | 5,0%               | 0,999 |
| Vitamina B6 (mg)     | 99.0%         | 97.0%              | 0,606 | 1,0%          | 2,0%               | 0,992 | 0%            | 1,0%               | 0,995 |
| Vitamina B12 (ug)    | 45.5%         | 48.0%              | 0,835 | 22,8%         | 29,0%              | 0,397 | 31,7%         | 23,0%              | 0,222 |
| Ácido Fólico (ug)    | 93.1%         | 88.0%              | 0,323 | 5,0%          | 10,0%              | 0,275 | 2,0%          | 2,0%               | 0,999 |
| Ácido Ascórbico (mg) | 65.3%         | 60.0%              | 0,532 | 20,8%         | 22,0%              | 0,970 | 13,9%         | 18,0%              | 0,542 |

El valor  $p$  se calculó con la prueba de  $\chi^2$  corregido.

Los resultados nutricionales eran previsibles, dado que las participantes seleccionadas pertenecían a una población vulnerable de la ciudad de Cali. Además las mujeres embarazadas son particularmente susceptibles a deficiencias de vitaminas y oligoelementos por el incremento en las demandas metabólicas propias del embarazo. Generalmente los requerimientos nutricionales durante la gestación son calculados por un incremento de la ingesta nutricional con respecto a los

valores de mujeres no embarazadas y no lactantes, con el fin de cubrir el desarrollo del feto. Sin embargo en estos cálculos no se toman en cuenta los cambios metabólicos en absorción y excreción que pueden ayudar a compensar los requerimientos nutricionales sin necesidad de incrementar la ingesta<sup>244</sup>.

### **Análisis de la deserción experimental**

La deserción experimental es definida como la pérdida de participantes, que una vez comprometidos en un estudio, por diferentes causas desertan antes de finalizar el protocolo. La deserción experimental se convierte en un riesgo de la validez interna de un estudio cuando el número de deserciones entre los grupos es significativamente diferente.

En el grupo control el porcentaje de deserción fue del 15% (n=15), mientras que un 26,7% (n=26) se presentó en el grupo suplementado con antioxidantes (**Figura 9**). La deserción entre los grupos no alcanzo a ser significativa ( $p=0.074$ ,  $\chi^2$  corregido).

### **Análisis de la adherencia al tratamiento**

La adherencia es definida en un estudio de intervención como el cumplimiento de las recomendaciones de dosis y frecuencia sugeridas para un tratamiento experimental. Esta variable se mide en un período de tiempo determinado y es expresada en porcentaje. El análisis del comportamiento de la adherencia se utiliza para asegurar que los cambios en las variables dependientes puedan ser atribuibles al tratamiento<sup>245</sup>. Así, una inadecuada adherencia puede impactar adversamente la evaluación de la efectividad de la intervención.

En este estudio el porcentaje de adherencia fue calculado como la proporción de cápsulas consumidas por las participantes registradas por autoreporte en relación a la cantidad de cápsulas esperadas que debieron haber consumido durante el período de tiempo comprendido entre el ingreso al estudio hasta el parto.

No se encontraron diferencias en la adherencia entre los grupos,  $p>0.05$  (**Tabla 5**). El análisis descriptivo por percentiles tampoco mostró diferencias entre diferentes niveles (**Tabla 6**). La

mediana de adherencia de los grupos (percentil 50) estuvo ligeramente por encima de la media estimada.

**Tabla 7.** Análisis de la adherencia al tratamiento.

|                | Grupo Control |                  |             | Grupo Antioxidantes |                  |             | <i>p</i><br>Intergrupos |
|----------------|---------------|------------------|-------------|---------------------|------------------|-------------|-------------------------|
|                | n             | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%      | n                   | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%      |                         |
| Adherencia (%) | 87            | 58,9 $\pm$ 23,7  | 54,3 – 63,6 | 75                  | 55,1 $\pm$ 26,4  | 49,9 – 60,3 | 0,360                   |

El valor *p* fue calculado con la prueba U de Mann-Whitney bilateral.  $\bar{X}$ : Media, DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza de la media.

**Tabla 8.** Adherencia al tratamiento por percentiles.

| Percentil | Grupo Control | Grupo Antioxidantes |
|-----------|---------------|---------------------|
| 25        | 45,8          | 39,5                |
| 50        | 64,2          | 61,2                |
| 75        | 79,2          | 73,3                |
| 90        | 88,1          | 90,0                |

En este estudio la adherencia al tratamiento fue ligeramente superior a la reportada en regímenes de suplementación rutinarios durante el embarazo que muestran una adherencia alrededor del 50%<sup>246</sup>. Sin embargo este valor está por debajo de lo reportado en mujeres embarazadas colombianas por Holguin *et al*<sup>247</sup> quienes reportaron una adherencia del 88,6% en el consumo de ácido fólico durante el embarazo. Otro estudio en adolescentes embarazadas en Medellín encontró que el 14 % no consumían suplementos con hierro y el 43% presentaban una ingesta inadecuada<sup>248</sup>. Una característica de esto dos últimos estudios es que fueron de corte transversal, en una sola etapa del embarazo y con poco tiempo de seguimiento de la adherencia, lo cual puede conducir a una sobre estimación del cumplimiento.

La adherencia a tratamientos con píldoras durante la gestación está influenciada por factores biológicos propios del embarazo, como el incremento fisiológico de la irritabilidad gastrointestinal que incrementa la frecuencia de síntomas como náuseas, gastritis, reflujo gástrico, y constipación que pueden ser estimulados por el consumo de micronutrientes en presentaciones farmacológicas<sup>249</sup>.

Otro factor determinante es el tiempo de intervención, en la medida que se extiende la duración del tratamiento se produce una pérdida progresiva de la adherencia, en este estudio el tiempo de intervención estimado fue de 18 semanas con una dosis sugerida de 1 cápsula/día, lo cual puede haber contribuido para no alcanzar una alta adherencia al tratamiento. Adicionalmente el uso de suplementos que no impactan de una forma perceptible en el estado general de salud de la embarazada puede llevar a ser considerado como innecesarios disminuyendo su utilización<sup>250</sup>. Otra barrera para considerar son las concepciones socioculturales determinadas por el nivel educativo y la percepción de riesgo que pueden limitar el uso de suplementos nutricionales durante el embarazo<sup>251</sup>.

Durante el desarrollo del estudio se intentó incrementar la adherencia y disminuir la deserción con estrategias como la entrega del suplemento o placebo a las participantes en sus hogares, que en la mayoría de los casos se encontraban localizados en zonas de difícil acceso por las condiciones de seguridad. También se procuró establecer contacto y diálogo con familiares de las embarazadas para informarles acerca de la importancia de participar en este estudio.

## CAPÍTULO 2

### EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA FUNCION ENDOTELIAL MATERNA

El aumento en la producción de RLO y el desarrollo de un estado de estrés oxidativo en el sistema vascular ha sido relacionado con la disfunción endotelial y disminución de la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup>. Esto ha llevado a proponer que intervenciones con moléculas antioxidantes (como ciertos micronutrientes) pueden modular negativamente el estrés oxidativo y ayudar a restablecer la función endotelial. En este estudio se realizó una intervención con múltiples micronutrientes antioxidantes durante la gestación con el propósito de mejorar la función endotelial materna. La función endotelial fue evaluada por medio de la VMF en la arteria braquial, una medición no invasiva que ha sido relacionada con la producción del NO<sup>•</sup> por la células endoteliales<sup>252</sup>.

La VMF es considerada una prueba que provee información predictiva e independiente de eventos cardiovasculares futuros, por encima de los factores de riesgo tradicionales<sup>253</sup>. El principal estímulo para el cambio de diámetro en la VMF es el EFE generado después de liberar la arteria de la oclusión, lo cual produce una elevación transitoriamente del flujo sanguíneo sobre el endotelio (hiperemia reactiva) que estimula la liberación de sustancia vasodilatadoras. Por lo tanto, el  $\Delta$ VMF no solo está influenciado por la función del endotelio sino también por la magnitud del estímulo impuesto por el EFE<sup>254</sup>. En este estudio se encontró una moderada correlación entre el %  $\Delta$ VMF y el EFE calculado antes y después de la intervención en ambos grupos. (**Anexo 12**). Por este motivo se normalizo el  $\Delta$ VMF (VMFn) con la magnitud del estímulo el EFE. Además la VMFn pero no el % $\Delta$ VMF ha mostrado detectar la reducción de la función endotelial en personas con bajo riesgo cardiovascular como eran las participantes de este estudio<sup>255</sup>.

La comparación intragrupos post-intervención mostró una disminución significativa del EFE en ambos grupos, lo cual se puede explicar por el aumento significativo del DABB, parámetro que está relacionado inversamente con el EFE. Esto coincide con la disminución del % $\Delta$ VMF en el tercer trimestre de gestación en ambos grupos. (**Tabla 9**). Sin embargo después de normalizar la variable por el EFE (VMFn) contrario a lo esperado solo en el grupo tratado con antioxidantes se presentó una disminución significativa ( $p=0,000$ ), mientras que el grupo control presentó un incremento no

significativo ( $p=0.388$ ). Este último hallazgo en el grupo control está acorde con lo reportado por Quinton *et al*<sup>256</sup>, en un estudio longitudinal ( $n=47$ ), en el que encontró que el  $\% \Delta \text{VMF}$  no cambia hasta la semana 32 de gestación, una de las limitaciones de ese estudio fue la no normalización de la VMF por el EFE, dificultando la extrapolación de los resultados. En otro estudio Duro *et al*<sup>257</sup>, encontraron también un incremento en DABB a medida que avanza el embarazo con un incremento no significativo del  $\% \Delta \text{VMF}$ . Los valores de DABB y  $\% \Delta \text{VMF}$  post intervención en el grupo control, fueron similares a los reportados en mujeres embarazadas normotensas ( $3,4 \pm 0,5$  y  $11,0 \pm 4,5$  respectivamente) medido durante  $29 \pm 4$  semanas de embarazo<sup>258</sup>.

**Tabla 9.** Análisis por intención de tratamiento de la VMF.

| Parámetro                           | Grupo Control           |                         |              | Grupo Antioxidantes     |                         |              | Valor p Inter- grupos |                   |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------|-----------------------|-------------------|
|                                     | Basal                   | Post-intervención       | p            | Basal                   | Post-intervención       | p            | Basal                 | Post-intervención |
|                                     | $\bar{X} \pm \text{DE}$ | $\bar{X} \pm \text{DE}$ |              | $\bar{X} \pm \text{DE}$ | $\bar{X} \pm \text{DE}$ |              |                       |                   |
| DABB (mm) <sup>£</sup>              | $2,7 \pm 0,29$          | $3,1 \pm 0,36$          | <b>0,000</b> | $2,6 \pm 0,28$          | $3,0 \pm 0,34$          | <b>0,000</b> | <b>0,041</b>          | 0,185             |
| DPPH (mm) <sup>£</sup>              | $3,1 \pm 0,34$          | $3,4 \pm 0,38$          | <b>0,000</b> | $3,0 \pm 0,31$          | $3,3 \pm 0,37$          | <b>0,000</b> | <b>0,038</b>          | <b>0,023</b>      |
| Vb (cm/seg) <sup>£</sup>            | $22,2 \pm 5,1$          | $20,7 \pm 5,1$          | <b>0,018</b> | $21,0 \pm 3,3$          | $21,0 \pm 5,2$          | 0,860        | 0,326                 | 0,660             |
| Vph(cm/seg) <sup>£</sup>            | $44,9 \pm 10,8$         | $41,6 \pm 5,2$          | 0,079        | $43,1 \pm 10,9$         | $43,3 \pm 5,2$          | 0,976        | 0,292                 | 0,357             |
| EFE                                 | $16,2 \pm 4,0$          | $13,3 \pm 3,8$          | <b>0,000</b> | $16,2 \pm 4,5$          | $14,3 \pm 3,9$          | <b>0,000</b> | 0,980                 | 0,099             |
| $\% \Delta \text{VMF}$ <sup>£</sup> | $13,0 \pm 5,5$          | $11,2 \pm 5,4$          | <b>0,01</b>  | $13,4 \pm 6,0$          | $9,4 \pm 5,1$           | <b>0,000</b> | 0,749                 | <b>0,022</b>      |
| VMFn*                               | $0,83 \pm 0,39$         | $0,88 \pm 0,45$         | 0,388        | $0,87 \pm 0,38$         | $0,70 \pm 0,38$         | <b>0,015</b> | 0,334                 | <b>0,006</b>      |

La diferencia intragrupos fue evaluada con un test de Student para muestras relacionadas. <sup>£</sup> Se calculó la U de Mann-Whitney bilateral y para la diferencia intragrupos la prueba de Wilcoxon.. \*La diferencia entre grupos entre las semanas 32-36 fue calculada por ANCOVA de una vía ajustado por la VMFn materna basal. EFE: Estrés de fricción endotelial,  $\bar{X}$ : Media, DE: Desviación estándar.

Una de las características de los estudios mencionados anteriormente es la heterogeneidad de covariables en las participantes en cuanto a edad, IMC, paridad, tiempo de la medición y así como un  $n$  pequeño y la ausencia de normalización de la VMF por el EFE, contrario a nuestro estudio donde los grupos no presentaron diferencias en covariables que potencialmente pueden afectar la interpretación de la VMF (**Tabla 10**). La comparación intergrupos en la medición basal (**Tabla 9**), mostró diferencias significativas en DABB ( $p=0.028$ ) y DPPH ( $p=0.019$ ) sin embargo, Vm, EFE,

% $\Delta$ VMF y VMFn fueron estadísticamente similares en los dos grupos al inicio del estudio ( $p>0.05$ ) Para corregir la influencia de DABB sobre la VMF entre grupos se realizó un análisis alométrico de la variable resultado en un modelo de ANCOVA en el que se introdujo como covariable el DABB transformado logarítmicamente tal como lo recomienda Atkinson et al<sup>259</sup>. El % $\Delta$ VMF basal calculado con este modelo para el grupo control fue de  $13,2 \pm 5,1$  y para el grupo intervenido con antioxidantes fue de  $12,9 \pm 5,1$  y la inferencia entre grupos no fue significativa ( $p=0,698$ ).

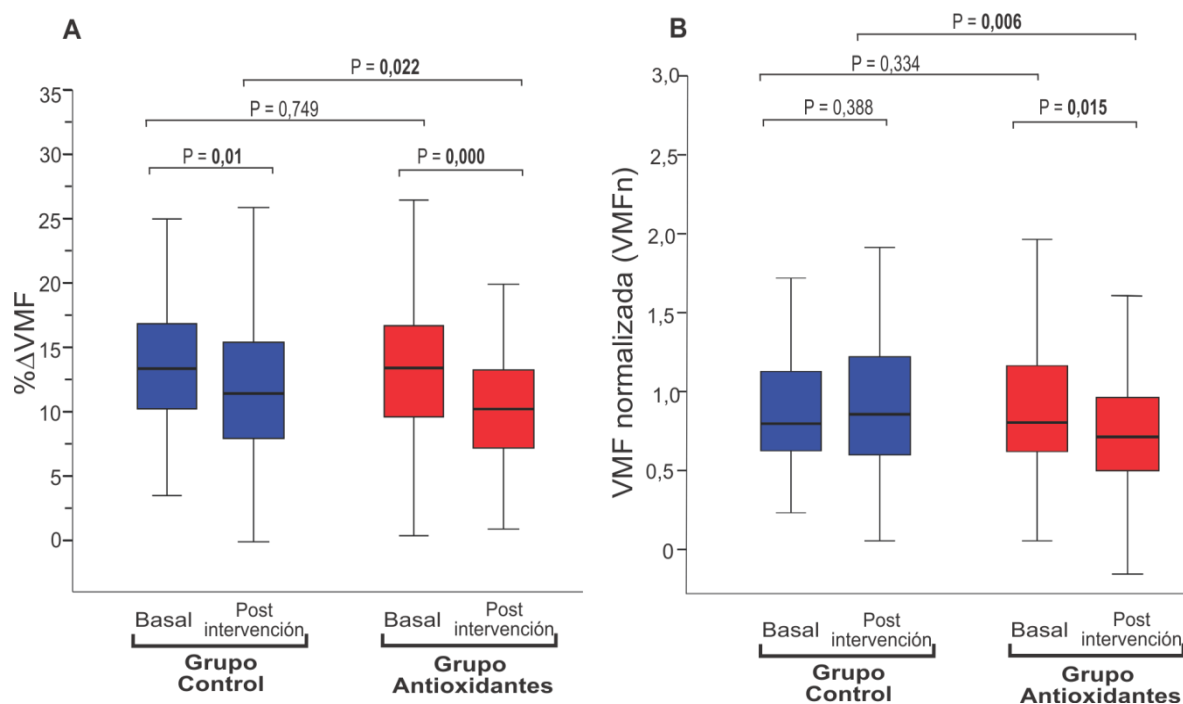
La comparación intergrupos post-intervención (**Tabla 10**) mostró en el grupo tratado con antioxidantes, una disminución significativa en el % $\Delta$ VMF ( $p=0.022$ ), cuando se excluyeron del análisis las participantes con adherencia del 0% ( $n=2$  del grupo control y  $n=4$  del grupo antioxidantes) la diferencia en % $\Delta$ VMF siguió siendo significativa ( $p=0.011$ ). Igualmente, la VMFn post-intervención ajustada por la medición basal de la variable en un modelo de ANCOVA, presentó

**Tabla 10.** Parámetros antropométricos y hemodinámicos post intervención.

| Parámetro                              | Grupo Control<br>Post-intervención |                  |              | Grupo Antioxidantes<br>Post-intervención |                  |              | $p$<br>Intergrupos |
|----------------------------------------|------------------------------------|------------------|--------------|------------------------------------------|------------------|--------------|--------------------|
|                                        | n                                  | $\bar{x} \pm DE$ | IC 95%       | n                                        | $\bar{x} \pm DE$ | IC 95%       |                    |
| Edad (años) <sup>£</sup>               | 87                                 | $20,6 \pm 3,3$   | 19,9 -21,3   | 75                                       | $20,3 \pm 3,2$   | 19,6 - 21,0  | 0,568              |
| Edad gestacional medición <sup>£</sup> | 87                                 | $32,2 \pm 1,27$  | 31,9 -32,4   | 75                                       | $32,4 \pm 0,76$  | 32,2 -32,5   | 0,280              |
| Peso (Kg)                              | 87                                 | $62,6 \pm 9,4$   | 60,6 -64,6   | 75                                       | $63,0 \pm 10,3$  | 60,6 -65,4   | 0,787              |
| Talla (cm)                             | 87                                 | $156,3 \pm 6,7$  | 154,9 -157,8 | 75                                       | $156,0 \pm 6,2$  | 154,5 -157,4 | 0,715              |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )               | 87                                 | $25,6 \pm 3,6$   | 24,8 -26,4   | 75                                       | $25,9 \pm 4,0$   | 25,0 – 26,8  | 0,629              |
| Pliegue suprailíaco (mm)               | 87                                 | $15,4 \pm 5,7$   | 14,2 -16,6   | 75                                       | $15,6 \pm 5,6$   | 14,3 -16,9   | 0,811              |
| Pliegue tricípital (mm)                | 87                                 | $15,3 \pm 4,7$   | 14,3 -16,3   | 75                                       | $15,9 \pm 5,1$   | 14,7 - 17,1  | 0,416              |
| Pliegue subescapular ( mm)             | 87                                 | $14,8 \pm 5,5$   | 13,6 -16     | 75                                       | $15,7 \pm 5,7$   | 14,3 – 17,0  | 0,314              |
| Grasa corporal (%)                     | 87                                 | $27,1 \pm 4,5$   | 26,1 - 28,0  | 75                                       | $27,1 \pm 4,4$   | 26,1 – 28,1  | 0,954              |
| TAS (mm Hg)                            | 87                                 | $107 \pm 9,0$    | 105 - 109    | 75                                       | $106 \pm 7,0$    | 104 - 107    | 0,289              |
| TAD (mm Hg)                            | 87                                 | $66 \pm 6,0$     | 65 -67       | 75                                       | $65 \pm 6,0$     | 64 -67       | 0,433              |
| Semanas de Intervención <sup>£</sup>   | 87                                 | $15,5 \pm 1,62$  | 15,1 – 15,8  | 74                                       | $15,6 \pm 2,3$   | 15,0 – 16,0  | 0,628              |

IMC: Índice de masa corporal,. TAS: Tensión arterial sistémica. TAD: Tensión arterial diastólica..  $\bar{x}$ : Media, DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza de la media. La diferencia entre medias se calculó con la prueba t de Student para muestras independientes. <sup>£</sup> Se calculó la U de Mann-Whitney bilateral.

Una disminución muy significativa en el grupo tratado con antioxidantes ( $p=0.006$ ) respecto al grupo control (**Figura 10**). Incluso sin ajustar la VMFn post-intervención, siguió siendo significativa ( $p=0.008$ , prueba t de Student).



**Figura 10.** Comparación intra e intergrupos de la VMF antes y después de las intervenciones. **A.** Porcentaje de cambio de la VMF (%ΔVMF). **B.** Vasodilatación mediada por flujo normalizada (VMFn). Las barras representan el IC del 95% de la mediana. La comparación de la VMFn post-intervención se realizó por un análisis de ANCOVA ajustado por la VMFn basal.

Para establecer si el comportamiento del %ΔVMF y la VMFn post-intervención estaban relacionadas con la adherencia al tratamiento, la adherencia fue dividida en tertiles. En este análisis no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con antioxidantes (**Tabla 11**), a pesar que la media de las dos variables fueron siempre menores en el grupo tratado con antioxidantes %ΔVMF ( $p=0.097$ ) y VMFn ( $p=0.079$ ).

**Tabla 11.** Tertiles de adherencia de la media y el Intervalo de confianza (IC) para el % $\Delta$ VMF y la VMFn post-intervención

|                              | <i>n</i> | % $\Delta$ VMF Post-intervención  |             | VMFn Post-intervención            |             |
|------------------------------|----------|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|
|                              |          | $\bar{x} \pm DE$                  | IC del 95%. | $\bar{x} \pm DE$                  | IC del 95%. |
| Tertil 1 Grupo Control       | 21       | 11,4 $\pm$ 1,1                    | 9,3 - 13,6  | 0,89 $\pm$ 0,39                   | 0,73 – 1,07 |
| Tertil 1 Grupo Antioxidantes | 12       | <b>8,2 <math>\pm</math> 1,4</b>   | 5,3 - 11,1  | <b>0,55 <math>\pm</math> 0,38</b> | 0,31 - 0,80 |
| Tertil 2 grupo Control       | 33       | 11,0 $\pm$ 0,87                   | 9,3 - 12,8  | 0,86 $\pm$ 0,43                   | 0,70 - 1,01 |
| Tertil 2 Grupo Antioxidantes | 28       | <b>8,1 <math>\pm</math> 0,97</b>  | 6,1 - 10,0  | <b>0,67 <math>\pm</math> 0,37</b> | 0,53- 0,82  |
| Tertil 3 Grupo Control       | 32       | 11,7 $\pm$ 0,90                   | 9,9 - 13,5  | 0,92 $\pm$ 0,53                   | 0,73 - 1,11 |
| Tertil 3 Grupo Antioxidantes | 32       | <b>11,2 <math>\pm</math> 0,89</b> | 9,4 - 12,9  | <b>0,76 <math>\pm</math> 0,35</b> | 0,63 - 0,88 |

$\Delta$ VMF% ( $p= 0,097$ ) y VMFn ( $p= 0,079$ ). La diferencia entre tertiles fue calculada con la prueba de Kruskal-Wallis.

Contrario a la hipótesis planteada al inicio del estudio, el análisis estadístico mostró, que el tratamiento con múltiples micronutrientes antioxidantes no solo no mejora la función endotelial materna medida por la VMF, sino que la reduce significativamente después de  $\approx 15$  semanas de intervención con antioxidantes. Estos resultados indican que el consumo prolongado de antioxidantes durante el embarazo puede atenuar significativamente la función endotelial materna, y que posiblemente puede convertirse en un factor de riesgo para desarrollar disfunción endotelial. Este hallazgo puede estar relacionado con los reportes de diferentes estudios durante el embarazo que no han mostrado efectos benéficos del consumo de altas dosis de antioxidantes (principalmente Vitamina C y Vitamina E) en la reducción de la frecuencia de desórdenes hipertensivos de la gestación y por el contrario han reportado incrementos significativo en el riesgo de desarrollar hipertensión gestacional (riesgo relativo:1.10; IC 95%: 1.02-1.19) y aumento en el uso de anti-hipertensivos<sup>260,261</sup>.

En un estudio Wray *et al*<sup>262</sup>, reportaron que el consumo de antioxidantes por vía oral atenúa significativamente el incremento de la VMF inducido por el ejercicio físico en pacientes de la tercera edad. Donato *et al*<sup>263</sup>, también encontraron atenuación de la VMF en sujetos jóvenes y viejos que

realizaron ejercicio después de recibir un suplemento con varios micronutrientes antioxidantes. En un modelo hipercolesterolemia en conejos, se encontró que un alto consumo de alfa-tocoferol disminuye la vasorelajación arterial<sup>264</sup>. Estos estudios indican que posiblemente algunas especies reactivas del oxígeno, son necesarios para una adecuada vasodilatación.

Se ha asumido y aceptado tradicionalmente que la VMF está mediada principalmente por la liberación y biodisponibilidad del NO<sup>•</sup> en las células endoteliales, sin embargo un reciente meta-análisis encontró que alrededor del 67% de la vasodilatación en esta prueba es explicada por el NO<sup>•</sup><sup>265</sup>. En otro estudio Wray *et al*<sup>266</sup>, encontraron en sujetos jóvenes, que la inhibición de la eNOS con L-*N*MMMA por vía intravenosa solo reduce ≈33 % de la VMF en la arteria braquial. Esto ha llevado a cuestionar el aporte del NO<sup>•</sup> en la VMF y a considerar otras sustancias vasodilatadoras liberadas por el endotelio post-hiperemia, que no han sido muy estudiadas en sujetos humanos, como el ácido araquidónico y la prostaciclina I<sub>2</sub><sup>267</sup> o el Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (EDFH; siglas en ingles)<sup>268</sup>, sustancias que en combinación podrían explicar el resultado de la prueba.

Una de las preguntas que surge de los resultados encontrados, es ¿cómo el consumo de micronutrientes antioxidantes puede disminuir la vasodilatación dependiente del endotelio? En la literatura científica la suplementación con antioxidantes han mostrado que se incrementa la VMF en pacientes con edad avanzada o hipertensos,<sup>269,270</sup> y se ha asumido que la intervención incrementa la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup>, pero como se discutió anteriormente, al no ser esta molécula la única implicada en la VMF, otras sustancias vasodilatadoras que puedan ser alteradas por los antioxidantes podrían ser buenas candidatas para explicar este resultado.

Dentro de esas sustancias paradójicamente se encuentran especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), considerado como una molécula tipo EDFH. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es no polar y permeable en las membranas biológicas, puede ser sintetizado en el endotelio como subproducto del metabolismo del O<sub>2</sub><sup>-•</sup> principalmente por la SOD<sup>271</sup>, aunque algunos reportes han planteado que también podría producirse por la eNOS desacoplada<sup>272</sup> y las NADPH oxidasas vasculares.<sup>273</sup> Estudios *in vivo* en animales han encontrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce vasodilatación en arterias.<sup>274,275</sup> y que el EFE puede inducir su producción en arterias coronarias de humanos<sup>276,277</sup>. El efecto de

vasorelajación inducido sobre las células musculares lisas por esta especie reactiva del oxígeno ocurre a concentraciones del orden micromolar<sup>278</sup>, y parece ser mediado por la activación de canales de potasio sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$ . La activación de estos canales conducen a una hiperpolarización de la membrana celular y a la vaso relajación muscular <sup>279,280</sup>. Otros estudios han reportado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede incluso incrementar la activación de la eNOS y su expresión génica.<sup>281,282</sup>

Experimentos en células endoteliales aisladas, han mostrado que antioxidantes como la vitamina E pueden reducir los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  asociado esto con un incremento en su degradación<sup>283,284</sup>. Sin embargo, también se ha encontrado que una excesiva cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede alterar la función vascular normal<sup>285</sup>. Micronutrientes antioxidantes como el ácido ascórbico, y el alfa-tocoferol han mostrado que pueden reaccionar rápidamente con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reduciendo su concentración, y posiblemente afectando la producción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la SOD<sup>286,287,288</sup>

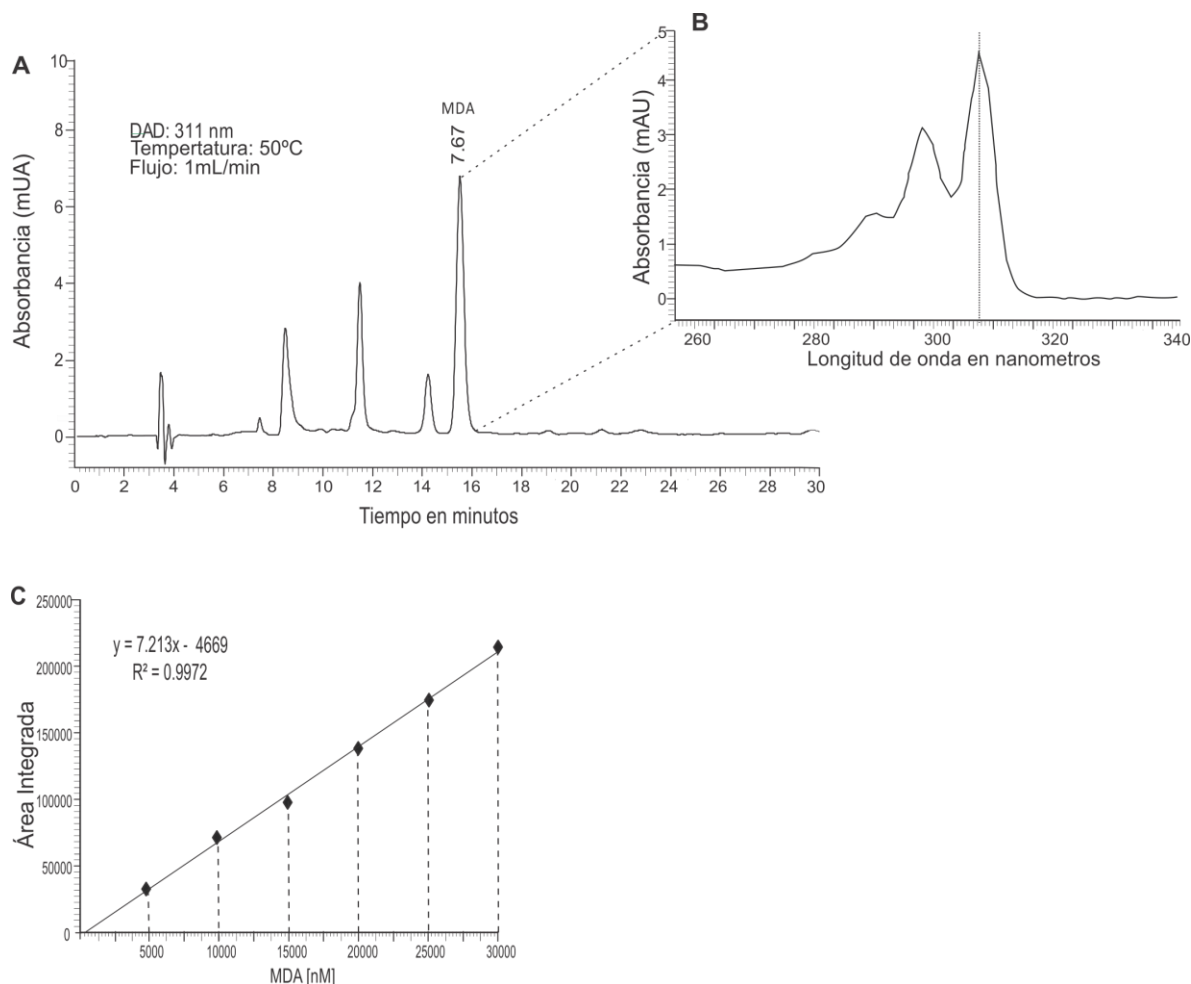
Los resultados obtenidos, puede implicar que para el desarrollo de una adecuada función vascular materna se requiere un nivel óptimo de RLO, así un exceso o disminución de RLO puede producir efectos inhibitorios sobre la respuesta biológica en este caso la VMF. La reducción en la concentración de RLO por la administración crónica de sustancias antioxidantes pueden ocasionar una reducción en los niveles de especies reactivas del oxígeno intracelulares con propiedades vasodilatadoras como el peróxido de hidrogeno, implicando que el consumo de sustancias antioxidantes debe ser realizado con moderación durante el embarazo. Sin embargo aún se requiere plantear nuevos modelos de estudio, que incluyan diferentes condiciones de edad, estados metabólicos y de estrés oxidativo, en los que la intervención con antioxidantes puedan divergir en sus efectos sobre la función endotelial.

### CAPÍTULO 3

#### EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHIDO EN PLASMA MATERNO

Para establecer el efecto del tratamiento con antioxidantes sobre el estrés oxidativo de las gestantes, se determinó por HPLC el nivel del malondialdeído (MDA) plasmático total en sangre materna, un biomarcador de peroxidación lipídica. Este compuesto es un aldehído volátil subproducto de la lipoperoxidación, de bajo peso molecular ( $C_3H_4O_2$ ) permeable a membranas biológicas muy abundante en los tejidos (en concentraciones micromolares)<sup>289</sup>. El MDA puede ser producido por procesos enzimáticos durante la síntesis del tromboxano A2 o como un subproducto de procesos no enzimáticos por la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados con tres o más dobles enlaces por el ataque de RLO<sup>290</sup>. *In vivo* el MDA es generado por la autoxidación de lipoperoxidos derivados principalmente de ácidos grasos como el ácido araquidónico, docosahexanoico y linolenico, presentes en triacilgliceridos, glicerofosfolipidos, ésteres de colesterol y prostaglandinas<sup>291</sup>.. Adicionalmente el MDA puede ser consumido de forma exógena en la dieta mediante la ingestión de aceites de origen vegetal y grasas oxidadas de origen animal<sup>292</sup>. Una vez producido este aldehído, puede reaccionar con macromoléculas como fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas, formando aductos de MDA. También la evidencia *in vivo* que indica que el MDA libre es catabolizado a acetaldehído por la enzima mitocondrial aldehído deshidrogenasas y luego este subproducto es degradado hasta  $CO_2$  por la acetaldéhído deshidrogenasa<sup>293</sup>. Hasta el momento no se reportan estudios que indiquen como esta vía de degradación afecta sus niveles plasmáticos. Adicionalmente se sabe que el MDA que no es metabolizado puede ser excretado por la vía urinaria<sup>294</sup>.

En este estudio el MDA plasmático se derivatizó con la DAN, que bajo condiciones acidas (pH=0,8), permite no solo derivatizar el MDA libre, sino también el liberado por los aductos de MDA con las proteínas plasmáticas, logrando de esta forma medir el MDA total en el plasma. El cromatograma, así como el espectro de absorción del MDA derivatizado y la curva de calibración de una corrida cromatográfica por HPLC se puede observar en la **Figura 11**. Estos resultados muestran que se alcanzó una separación optima del MDA derivatizado de otras sustancias interferentes.



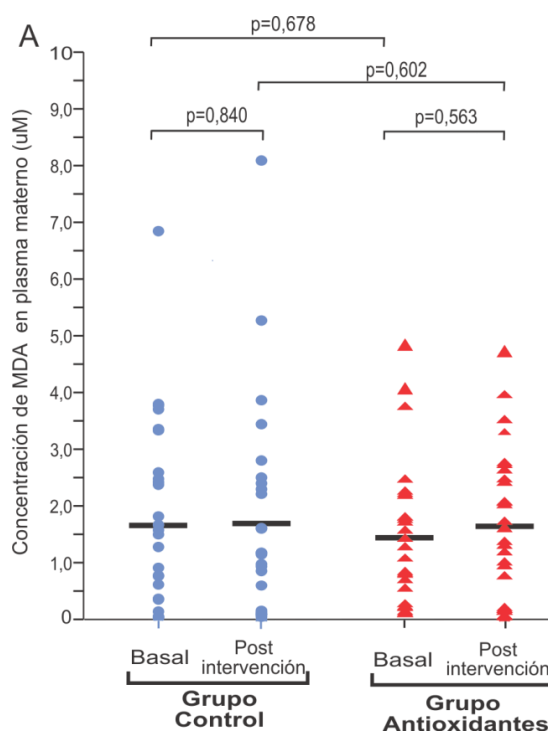
**Figura 11.** Cuantificación del MDA total en plasma materno por HPLC. **A.** Cromatograma de separación y detección del MDA a 311nm. Se puede observar un pico con un tiempo de retención de 7,67 min que corresponde al naftodiazepinium . **B.** Espectro de absorción del pico de MDA entre 250nm y 340nm de acuerdo a lo reportado por Steghens *et al*<sup>234</sup>. **C.** Curva de calibración para MDA con 6 estándares de concentración en nanomolar (nM).

Para la determinación de los niveles de MDA plasmático materno, se seleccionaron 25 gestantes en cada uno de los grupos, de las cuales se dispusiera de muestras de sangre con tomas en el segundo y tercer trimestre y presentaran una adherencia al tratamiento  $\geq 60\%$ . Los resultados en la medición basal, mostraron niveles estadísticamente similares en los dos grupos (**Tabla 12**). La evaluación post-intervención tampoco mostró diferencias significativas intragrupos e intergrupos. Estos resultados están acordes con el reporte Patrick *et al*<sup>295</sup>, quienes en un estudio descriptivo en

primigestantes jóvenes sanas no encontraron incremento significativo del MDA en plasma en los diferentes trimestres del embarazo.

**Tabla 12.** Concentración de MDA en plasma materno

|          | Grupo Control<br>(n=25) |                       |       | Grupo Antioxidantes<br>(n=25) |                       |       | Valor p<br>Inter- grupos |                       |
|----------|-------------------------|-----------------------|-------|-------------------------------|-----------------------|-------|--------------------------|-----------------------|
|          | Basal                   | Post-<br>intervención | p     | Basal                         | Post-<br>intervención | P     | Basal                    | Post-<br>intervención |
|          | $\bar{X} \pm DE$        | $\bar{X} \pm DE$      |       | $\bar{X} \pm DE$              | $\bar{X} \pm DE$      |       |                          |                       |
| MDA (uM) | 1,7 $\pm$ 1,6           | 1,7 $\pm$ 1,8         | 0,840 | 1,4 $\pm$ 1,2                 | 1,6 $\pm$ 1,2         | 0,563 | 0,678                    | 0,602                 |



**Figura 12.** Niveles plasmáticos de MDA materno, antes (basal) y después de (10-12 semanas) de la intervención con antioxidantes. La diferencia entre grupos fue valorada por la prueba U de Mann-Whitney bilateral. La diferencia intra grupos fue evaluada con la prueba de signo de Wilcoxon.

La distribución de los niveles de MDA presentó en los dos grupos una gran dispersión de los datos tanto en el estado basal como post-intervención (**Figura 12**). Wilson *et al*<sup>296</sup>, encontraron que los niveles plasmáticos de hidroxiácidos como el MDA pueden ser influenciados por su consumo en la

dieta. Esto podría explicar la gran variabilidad en los niveles de MDA encontrados en los grupos, lo cual implicaría que este marcador, dado su metabolismo, debe tenerse en cuenta para su interpretación la dieta como un posible confusor, que puede llevar enmascarar cambios a nivel de estrés oxidativo por la intervención, ante la imposibilidad de discriminar entre el MDA endógeno producido por el estrés oxidativo y el absorbido de los alimentos.

También se ha reportado que la concentración plasmática de MDA presenta una correlación directa con los niveles de colesterol y triacilgliceridos sanguíneos así como la composición de ácidos grasos poli-insaturados<sup>297</sup>. Franke *et al*<sup>298</sup>, encontraron una gran variabilidad en los niveles de subproductos de lipoperoxidos plasmáticos (como el MDA) en individuos saludables en comparación a las concentraciones determinadas bajo condiciones controladas de cultivo celular, una buena parte de esta variabilidad fue explicada por diferencias inter sujetos en lípidos poli-insaturados plasmáticos, lo que llevo a proponer el ajuste del nivel de los subproductos de peroxidación lipídica por la concentración de ácidos grasos poli-insaturados en plasma y no usar el MDA como único indicador de peroxidación lipídica. En un ensayo clínico controlado un grupo de gestantes suplementadas con aceite de pescado (ricos en ácidos graso poli-insaturado), se encontró un incremento significativo en la concentración de subproductos de lipoperoxidos en el segundo trimestre de embarazo, sin disminución de la capacidad antioxidante plasmática<sup>299</sup>. Estos hallazgos muestran que los niveles de MDA plasmático presentan una dependencia con la dieta, especialmente con el consumo de grasa insaturada.

Adicionalmente la concentración de MDA plasmático ha mostrado responder de forma inconsistente al consumo de antioxidantes<sup>300</sup>. Kim *et al*<sup>301</sup>, en un estudio de cohorte que analizó 715 mujeres embarazadas entre las semanas 12-28 de gestación, no encontraron una asociación entre los niveles de MDA urinario y la ingesta por tertiles de frutas, vegetales y vitaminas antioxidantes. Otro estudio en mujeres con riesgo de cáncer de seno, mostró que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes puede disminuir biomarcadores de estrés oxidativo como la 8-hidroxiguanosina y los F2-Isoprostanos pero no el MDA,<sup>302</sup> indicando que este marcador es poco sensible para reflejar cambios en los niveles de estrés oxidativo. Esta falta de sensibilidad de los derivados de la

peroxidación lipídica en plasma parcialmente se puede explicar porque no necesariamente reflejan el estado de estrés oxidativo de todos los tejidos<sup>303</sup>.

La variabilidad intrínseca del MDA plasmático y su poca sensibilidad a cambios de estrés oxidativo, dificulta la interpretación de cambios asociados a intervenciones dirigidas a reducir el estrés oxidativo como la realizada en este ensayo clínico y especialmente en individuos saludables con niveles “normales” de estrés oxidativo. Esto ha llevado a considerar otros biomarcadores de peroxidación lipídica en plasma, más específicos, sensibles, estables y que no estén influenciados por la dieta, como los F<sub>2</sub>-Isoprostanos<sup>304</sup>. Y adicionalmente a considerar múltiples marcadores de estrés oxidativo cuando se pretenda alcanzar una medición aproximada de este estado en muestras de sangre<sup>305</sup>. En el análisis de correlaciones entre el MDA y las variables maternas (**Tabla 13**), no se encontró ninguna relación significativa.

**Tabla 13.** Correlaciones de MDA materno basal y post-intervención por grupos con otras variables maternas.

| Parámetro    |                          | Grupo control       |       |                                 |       | Grupo Antioxidantes |       |                                 |       |
|--------------|--------------------------|---------------------|-------|---------------------------------|-------|---------------------|-------|---------------------------------|-------|
|              |                          | MDA Basal<br>(n 26) |       | MDA post-<br>intervención(n 25) |       | MDA Basal<br>(n 26) |       | MDA post-<br>intervención(n 25) |       |
|              |                          | <i>Rho</i>          | P     | <i>Rho</i>                      | P     | <i>Rho</i>          | P     | <i>Rho</i>                      | P     |
| Semana 16-20 | Edad <sup>£</sup> (años) | -0,155              | 0,450 | 0,104                           | 0,620 | 0,123               | 0,558 | -0,354                          | 0,070 |
|              | Peso (Kg)                | -0,175              | 0,393 | 0,112                           | 0,593 | 0,028               | 0,894 | 0,229                           | 0,250 |
|              | Talla (cm)               | -0,124              | 0,545 | 0,205                           | 0,325 | 0,014               | 0,946 | 0,337                           | 0,086 |
|              | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | -0,160              | 0,436 | 0,017                           | 0,936 | 0,078               | 0,709 | -0,104                          | 0,604 |
|              | Grasa corporal (%)       | -0,235              | 0,247 | 0,101                           | 0,630 | 0,309               | 0,133 | 0,084                           | 0,676 |
|              | % ΔVMF                   | -0,045              | 0,825 | -0,159                          | 0,449 | -0,032              | 0,881 | -0,054                          | 0,793 |
|              | VMFn                     | -0,030              | 0,891 | -0,115                          | 0,593 | -0,102              | 0,636 | -0,041                          | 0,850 |
| Semana 32-36 | Peso (Kg)                | -0,079              | 0,708 | 0,235                           | 0,269 | 0,088               | 0,667 | 0,191                           | 0,340 |
|              | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | -0,090              | 0,670 | 0,169                           | 0,430 | 0,094               | 0,654 | -0,069                          | 0,732 |
|              | Grasa corporal (%)       | -0,175              | 0,404 | 0,212                           | 0,320 | 0,355               | 0,082 | -0,059                          | 0,771 |
|              | %ΔVMF                    | -0,335              | 0,102 | 0,006                           | 0,979 | -0,009              | 0,965 | 0,178                           | 0,373 |
|              | VMFn                     | -0,291              | 0,159 | -0,002                          | 0,992 | -0,064              | 0,765 | 0,181                           | 0,398 |
|              | MDA (uM)                 | 0,225               | 0,279 | -                               | -     | -0,273              | 0,187 | -                               | -     |

Las correlaciones se calcularon con el coeficiente de correlación de *rho* de Spearman a un nivel de significancia 0,05 bilateral

## CAPÍTULO 4

### EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA LOS NIVELES DE LEPTINA, ADIPONECTINA

Las concentraciones plasmáticas de adiponectina total, leptina y proteína C reactiva en el segundo (basal) y tercer trimestre (post-intervención) fueron determinadas en gestantes que reportaron una adherencia al tratamiento mayor del 60%, tanto en el grupo control como el suplementado con antioxidantes, y que tuvieran muestras de sangre tanto en el estado basal como post-intervención. La concentración de adiponectina total en el estado basal en el segundo trimestre de embarazo (semana 16-20) en los dos grupos (**Tabla 14**), fue ligeramente superior a la reportada en embarazadas chilenas sin complicaciones (14,7 ng/mL) en un período similar de la gestación<sup>306</sup>. La comparación intergrupos no mostró diferencias significativas entre las gestantes seleccionadas.

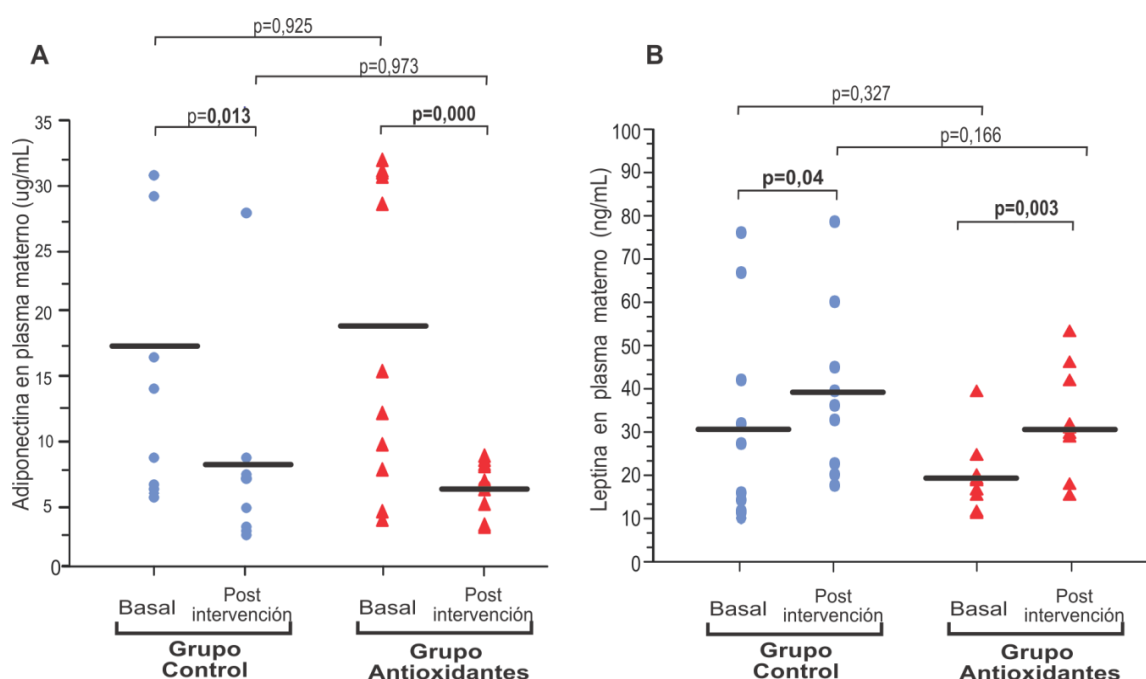
**Tabla 14.** Concentración de adiponectina total, leptina y CRP en plasma materno en el grupo control y grupo suplementado con antioxidantes.

| Biomarcador  | Grupo Control |                  |                   |              | Grupo Antioxidantes |                  |                   |              | <i>p</i><br>Intergrupos |                   |
|--------------|---------------|------------------|-------------------|--------------|---------------------|------------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------|
|              | Basal         |                  | Post-intervención | p            | Basal               |                  | Post-intervención | p            | Basal                   | Post Intervención |
|              | n             | $\bar{x} \pm DE$ | $\bar{x} \pm DE$  |              | n                   | $\bar{x} \pm DE$ | $\bar{x} \pm DE$  |              |                         |                   |
| Adiponectina | 17            | 19,8 $\pm$ 11,7  | 8,17 $\pm$ 8,5    | <b>0.013</b> | 17                  | 16,9 $\pm$ 11,1  | 5,56 $\pm$ 1,77   | <b>0,000</b> | 0.925                   | 0.973             |
| Leptina      | 20            | 28,6 $\pm$ 18,9  | 37,8 $\pm$ 19,7   | <b>0.04</b>  | 20                  | 19,8 $\pm$ 7,25  | 29,6 $\pm$ 11,3   | <b>0,003</b> | 0,327                   | 0.166             |
| CRP          | 20            | 0.80 $\pm$ 0.61  | 0,68 $\pm$ 0,34   | 0.952        | 20                  | 0.62 $\pm$ 0,49  | 0,74 $\pm$ 0,48   | 0,117        | 0.194                   | 0,989             |

La diferencia intragrupos fue evaluada por la prueba con signo de Wilcoxon  $p < 0.05$ . Para establecer las diferencias basales y post-intervención entre grupos se utilizó la prueba de Mann Whitney bilateral  $p < 0.05$ .  $\bar{x}$ : Media, DE: Desviación estándar. Adiponectina en ug/mL; Leptina en ng/mL y CRP en mg/dL.

El análisis post-intervención intragrupos, mostró una reducción en la concentración plasmática de adiponectina significativa en los dos grupos, estos resultados están acorde con diferentes reportes que indican que durante el embarazo los niveles de adiponectina disminuyen progresivamente desde el primer trimestre hasta el parto, asociado con una disminución en la expresión del ARNm en los adipocitos maternos, a pesar del aumento fisiológico de hasta un 25% de la masa adiposa durante la

gestación<sup>307,308</sup>. También se ha reportado que el sincitiotrofoblasto en la placenta expresa y secreta esta hormona aunque en una baja proporción en comparación al tejido adiposo<sup>309</sup>. Fuglsang *et al*<sup>310</sup>, en un estudio longitudinal en mujeres danesas (n=11), observaron una disminución paulatina de la adiponectina total en suero a partir del segundo trimestre de gestación, reporte que es similar a lo encontrado en este estudio. Los cambios de la adiponectina durante el embarazo, no parecen ser solo cuantitativos sino también cualitativos, con un desplazamiento en la síntesis de la forma trimerica hacia la oligomerica de alto peso molecular, la forma más activa de la hormona<sup>311</sup>.



**Figura 13.** Niveles plasmáticos de adipoquinas en plasma materno. **A.** Niveles de adiponectina total pre y post-intervención (ug/mL). **B.** Niveles de Leptina pre y post-intervención (ng/mL). La línea horizontal continua de color negro representa la media. La diferencia intra grupos fue evaluada con la prueba con signo de Wilcoxon y la inter grupos con la prueba U de Mann Whitney bilateral.

La comparación intergrupos post-intervención, no mostró diferencias significativas entre los grupos. La reducción de la adiponectina en el grupo suplementado con antioxidantes fue del 66,8% superior a la encontrada en el grupo control 57.8%. Aunque hay que tener en la cuenta que el grupo control presentó una variabilidad de la adiponectina mucho más alta en el grupo suplementado (**Figura 13**).

**Tabla 15.** Correlación de la adiponectina con variables antropométricas, de función endotelial y bioquímicas maternas en el grupo control y el grupo suplementado con antioxidantes.

| Parámetro    |                          | Grupo control      |          |                                |          | Grupo Antioxidantes |          |                                |              |
|--------------|--------------------------|--------------------|----------|--------------------------------|----------|---------------------|----------|--------------------------------|--------------|
|              |                          | Adiponectina Basal |          | Adiponectina Post-intervención |          | Adiponectina Basal  |          | Adiponectina Post-intervención |              |
|              |                          | <i>Rho</i>         | <i>p</i> | <i>Rho</i>                     | <i>p</i> | <i>Rho</i>          | <i>p</i> | <i>Rho</i>                     | <i>p</i>     |
| Semana 16-20 | Edad (años)              | 0.426              | 0.061    | -0.298                         | 0.246    | 0.107               | 0.655    | 0.119                          | 0.651        |
|              | Peso (Kg)                | 0.106              | 0.625    | -0.421                         | 0.093    | 0.040               | 0.867    | -0.068                         | 0.797        |
|              | Talla (cm)               | -0.223             | 0.344    | 0.080                          | 0.759    | 0.252               | 0.285    | 0.023                          | 0.929        |
|              | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | 0.202              | 0.399    | -0.444                         | 0.074    | 0.019               | 0.937    | -0.109                         | 0.676        |
|              | Grasa corporal (%)       | 0.059              | 0.803    | -0.348                         | 0.171    | -0.018              | 0.940    | -0.275                         | 0.286        |
|              | TAS (mm de Hg)           | -0.028             | 0.906    | -0.303                         | 0.194    | -0.019              | 0.937    | 0.300                          | 0.199        |
|              | TAD (mm de Hg)           | -0.053             | 0.825    | -0.109                         | 0.648    | -0.113              | 0.636    | 0.252                          | 0.283        |
|              | %ΔVMF                    | 0.126              | 0.596    | 0.293                          | 0.253    | -0.033              | 0.890    | 0.297                          | 0.247        |
|              | VMFn                     | 0.271              | 0.293    | 0,064                          | 0.808    | 0.056               | 0.830    | 0.025                          | 0.926        |
|              | MDA (uM)                 | -0.220             | 0.365    | 0.176                          | 0.513    | -0.082              | 0.789    | -0.036                         | 0.915        |
|              | Leptina (ng/mL)          | -0.132             | 0.578    | -0.275                         | 0.286    | -0.114              | 0.631    | -0.201                         | 0.439        |
|              | CRP (mg/mL)              | 0.241              | 0.321    | -0.035                         | 0.897    | -0.53               | 0.825    | -0.167                         | 0.522        |
| Semana 32-36 | Peso (kg)                | -0.070             | 0.768    | -0.315                         | 0.218    | 0.017               | 0.942    | 0.012                          | 0.963        |
|              | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | 0.082              | 0.731    | -0.230                         | 0.374    | -0.153              | 0.520    | 0.012                          | 0.963        |
|              | Grasa corporal (%)       | -0.002             | 0.992    | -0.246                         | 0.340    | 0.042               | 0.860    | -0.230                         | 0.375        |
|              | TAS (mm de Hg)           | -0.308             | 0.885    | -0.023                         | 0.929    | -0.171              | 0.512    | -0.222                         | 0.392        |
|              | TAD (mm de Hg)           | -0.294             | 0.251    | -0.085                         | 0.746    | 0.104               | 0.690    | -0.009                         | 0.974        |
|              | %ΔVMF                    | -0.198             | 0.403    | 0.105                          | 0.687    | -0.288              | 0.219    | 0.578                          | <b>0.015</b> |
|              | VMFn                     | -0.292             | 0.256    | 0,034                          | 0.896    | -0.265              | 0.305    | 0.515                          | <b>0.035</b> |
|              | MDA (uM)                 | -0.427             | 0.077    | 0.316                          | 0.251    | 0.04                | 0.990    | 0.111                          | 0.972        |
|              | Adiponectina (ug/mL)     | -                  | -        | -0.254                         | 0.326    | -                   | -        | -0.260                         | 0.314        |
|              | Leptina (ng/mL)          | -0.195             | 0.410    | -0.042                         | 0.874    | 0.016               | 0.949    | -0.044                         | 0.871        |
|              | CRP (mg/mL)              | 0.132              | 0.580    | 0.107                          | 0.683    | 0.160               | 0.500    | -0.130                         | 0.619        |

Las correlaciones se calcularon con el coeficiente de *rho* de Spearman a un nivel de significancia 0,05 bilateral.

tensión arterial, proteína C reactiva, leptina y MDA no fueron significativos en ninguno de los grupos. (Tabla 15). La excepción fue la correlación positiva encontrada post-intervención en el grupo suplementado con antioxidantes con el %ΔVMF ( $r=0,573$ ) y VMFn ( $r=0,515$ ).

Esta correlación encontrada es muy similar a la reportada por Mori *et al*<sup>312</sup>, en un estudio transversal en mujeres embarazadas japonesas con  $\approx 30$  semanas de gestación, en el mismo estudio se encontró una relación significativa entre la adiponectina plasmática y el  $\% \Delta \text{VMF}$  en mujeres preclámpicas ( $r=0,50$ ), pero no en el grupo control con embarazos no complicados. Al igual que este estudio, ellos no observaron una relación entre el IMC materno y la adiponectina en embarazos normales. Esta correlación positiva entre adiponectina y la función endotelial materna post- intervención solo en el grupo suplementado con antioxidantes podría indicar que el tratamiento con antioxidantes potencia la acción de la adiponectina sobre el endotelio, aunque es solo evidencia circunstancial.

Aunque no se observó una correlación entre los niveles de marcador de estrés oxidativo (MDA) y adiponectina en sangre materna, estudios clínicos han reportado una asociación negativa entre los niveles de esta hormona y biomarcadores de estrés oxidativo. Araki *et al*<sup>313</sup>, reportaron en niños obesos una correlación significativa e inversa entre la concentración plasmática de F2-isoprostanos (marcador de peroxidación lipídica) y los niveles de adiponectina de alto peso molecular ( $r= -0.401$ ) pero no encontraron relación con las otras isoformas de adiponectina circulante. Katsuki *et al*<sup>314</sup>, usando los mismos biomarcadores reportaron un hallazgo similar ( $r= -0,620$ ) en adultos jóvenes con peso normal metabólicamente obesos, pero en sujetos normales aunque la correlación fue negativa ( $r=-0,127$ ) no alcanzo a ser significativa. Gustafsson *et al*<sup>315</sup>, en un análisis multivariado de un estudio transversal en población adulta mayor, también encontraron una correlación inversa entre la adiponectina total en suero y varios biomarcadores de estrés oxidativo. La mayoría de estudios en humanos que han reportado esta relación negativa han sido de corte transversal, por lo que no se ha podido establecer si existe una relación causa-efecto. Sin embargo, *in vitro* el desarrollo de estados de estrés oxidativo en adipocitos inhibe la expresión y secreción de adiponectina<sup>316</sup>. Tanto en cultivo de adipocitos como en modelos animales, la suplementación con moléculas antioxidantes como el tocoferol ha mostrado incrementar la síntesis de adiponectina<sup>317,318</sup>.

En este estudio el análisis de los niveles de leptina, no encontró diferencias en la concentración basal entre los grupos (**Tabla 16**). Pero, sí se observó un incremento significativo en los niveles plasmáticos de leptina entre el segundo y tercer trimestre de embarazo tanto en el grupo control

como el grupo tratado con antioxidantes, estos resultados están de acuerdo a lo reportado por diferentes estudios longitudinales en gestantes que han mostrado la tendencia hacia la hiperleptinemia a medida que avanza el embarazo<sup>319,320</sup>.

El análisis de correlaciones de leptina con otras variables maternas medidas (**Tabla 16**), mostró una fuerte relación positiva con variables antropométricas de peso, IMC y porcentaje de grasa en el grupo control, tanto en el estado basal como post-intervención. En el grupo suplementado con antioxidantes esas correlaciones solo se observaron en el estado basal, y post-intervención solo con el peso materno. Este resultado está acorde a lo reportado por otros estudios longitudinales con embarazadas como el de Eriksson *et al*<sup>321</sup>, quienes encontraron una fuerte relación entre la grasa total materna e IMC con los niveles de leptina en las semanas 14 y 32 de gestación. Estas relaciones posiblemente indican que uno de los factores determinantes para explicar parcialmente la hiperleptinemia gestacional es la ganancia de tejido adiposo graso materno.

La concentración de leptina también mostró una fuerte correlación negativa con el  $\% \Delta \text{VMF}$  ( $r = -0,532$ ), en la medición inicial en el grupo basal, sin embargo la variable normalizada por el estrés de fricción ( $\text{VMFn}$ ) no presentó una relación significativa ( $p = 0,071$ ). Paradójicamente, estados hiperleptinémicos crónicos como los que ocurren durante el embarazo, han sido asociados con el desarrollo de disfunción endotelial. Korda *et al*<sup>322</sup>, observaron en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical que el estímulo agudo con leptina activa transitoriamente la síntesis de  $\text{NO}^*$ , pero crónicamente induce el incremento en la producción de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y peroxinitritos ( $\text{ONOO}^*$ ). En un modelo similar, Bouloumie *et al*<sup>323</sup>, observaron que la hiperleptinemia induce un estado de estrés oxidativo en células endoteliales de forma dosis dependiente. De aquí, se considere que leptina presenta dos caras sobre el endotelio; la exposición aguda promueve el incremento en la producción de  $\text{NO}^*$  y la angiogénesis, mientras que la exposición prolongada como ocurre durante el embarazo puede inducir la generación de RLO. Otro hallazgo de este análisis de correlaciones fue la relación positiva entre la leptina plasmática y la tensión arterial diastólica en la medición basal ( $r = 0,728$ ) y post-intervención ( $r = 0,457$ ) solo en el grupo control. El suministro crónico de leptina en ratas incrementa significativamente la tensión arterial media.<sup>324</sup> Este efecto sobre la tensión sanguínea parece ser mediado por el incremento de la actividad adrenérgica del sistema nervioso simpático<sup>325</sup>.

**Tabla 16.** Correlación de la concentración de Leptina basal (ng/mL) y post-intervención semanas ( 28-32) con variables antropométricas, de función endotelial y bioquímicas maternas .

|              |                          | Grupo control |              |                           |              | Grupo Antioxidantes |              |                           |              |
|--------------|--------------------------|---------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------------|--------------|
|              |                          | Leptina Basal |              | Leptina Post-intervención |              | Leptina Basal       |              | Leptina Post-intervención |              |
|              |                          | <i>Rho</i>    | p            | <i>Rho</i>                | p            | <i>Rho</i>          | p            | <i>Rho</i>                | p            |
| Semana 16-20 | Edad (años)              | -0.137        | 0.563        | 0.270                     | 0.249        | 0.269               | 0.251        | -0.135                    | 0.582        |
|              | Peso (Kg)                | 0.702         | <b>0.001</b> | 0.576                     | <b>0.008</b> | 0.492               | <b>0.028</b> | 0.256                     | 0.291        |
|              | Talla (cm)               | 0.242         | 0.304        | 0.056                     | 0.815        | -0.390              | 0.089        | 0.244                     | 0.315        |
|              | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | 0.669         | <b>0.001</b> | 0.620                     | <b>0.004</b> | 0.498               | <b>0.025</b> | 0.188                     | 0.441        |
|              | Grasa corporal (%)       | 0.451         | <b>0.046</b> | 0.762                     | <b>0.000</b> | 0.517               | <b>0.020</b> | 0.180                     | 0.461        |
|              | TAS (mm de Hg)           | 0.342         | 0.140        | 0.151                     | 0.140        | 0.041               | 0.867        | 0.308                     | 0.199        |
|              | TAD (mm de Hg)           | 0.728         | <b>0.000</b> | 0.446                     | <b>0.000</b> | 0.168               | 0.492        | 0.102                     | 0.678        |
|              | %ΔVMF                    | -0.532        | <b>0.016</b> | -0.242                    | 0.303        | -0.222              | 0.347        | -0.095                    | 0.701        |
|              | VMFn                     | -0.412        | 0.071        | 0.122                     | 0.609        | -0.121              | 0.622        | -0.093                    | 0.705        |
|              | MDA (uM)                 | -0.054        | 0.825        | -0.407                    | 0.084        | 0.279               | 0.364        | -0.140                    | 0.665        |
|              | CRP (mg/mL)              | 0.292         | 0.225        | 0.454                     | <b>0.051</b> | 0.343               | 0.139        | 0.291                     | 0.227        |
|              | Adiponectina (ug/mL)     | -0.132        | 0.578        | -0.195                    | 0.410        | -0.114              | 0.631        | 0.016                     | 0.949        |
| Semana 32-36 | Peso (Kg)                | 0.726         | <b>0.000</b> | 0.647                     | <b>0.002</b> | 0.384               | 0.095        | 0.690                     | <b>0.001</b> |
|              | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | 0.594         | <b>0.006</b> | 0.689                     | <b>0.001</b> | 0.552               | <b>0.012</b> | 0.417                     | 0.076        |
|              | Grasa corporal (%)       | 0.592         | <b>0.006</b> | 0.836                     | <b>0.000</b> | 0.297               | 0.204        | 0.373                     | 0.115        |
|              | TAS (mm de Hg)           | 0.368         | 0.110        | 0.432                     | <b>0.057</b> | 0.115               | 0.639        | 0.273                     | 0.258        |
|              | TAD (mm de Hg)           | 0.435         | <b>0.045</b> | 0.457                     | <b>0.043</b> | 0.352               | 0.139        | 0.142                     | 0.573        |
|              | %ΔVMF                    | 0.026         | 0.915        | 0.076                     | 0.750        | -0.100              | 0.675        | -0.234                    | 0.336        |
|              | VMFn                     | 0.126         | 0.596        | 0.120                     | 0.613        | 0.349               | 0.143        | -0.381                    | 0.108        |
|              | MDA (uM)                 | 0.339         | 0.169        | 0.249                     | 0.319        | 0.061               | 0.830        | 0.046                     | 0.876        |
|              | CRP (mg/mL)              | -0.011        | 0.962        | 0.563                     | <b>0.010</b> | 0.263               | 0.264        | -0.042                    | 0.864        |
|              | Adiponectina (ug/mL)     | -0.275        | 0.286        | -0.042                    | 0.874        | -0.201              | 0.439        | -0.044                    | 0.871        |
|              | Leptina (ng/mL)          | 0.447         | <b>0.043</b> | -                         | -            | 0.085               | 0.837        | -                         | -            |

Las correlaciones se calcularon con el coeficiente de *rho* de Spearman a un nivel de significancia 0,05 bilateral.

En humanos la concentración sérica de leptina ha sido asociada con la hipertensión arterial sistólica y diastólica tanto en hombres como en mujeres, independiente de etnia, raza, edad e IMC<sup>326</sup>.

En este trabajo también se observó una relación significativa entre los niveles de leptina y proteína C reactiva post-intervención en el grupo control ( **$r=0,563$** ), pero no en el grupo intervenido con antioxidantes. Esto posiblemente indica que los antioxidantes disocian la relación entre esta adipocina y el grado de inflamación desarrollado en el tercer trimestre de embarazo. Molvarec et al<sup>327</sup>, encontraron una relación similar en gestantes húngaras ( $r=0,46$ ) con embarazos sin complicaciones. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el efecto que ha mostrado la leptina a concentraciones fisiológicas moderadamente altas ( $>20$  ng/mL) de promover la inflamación vascular al inducir la expresión de la proteína C reactiva en el endotelio, mediado por el incremento de RLO intracelulares<sup>328,329</sup>. Adicionalmente la administración exógena de leptina en individuos saludables con peso normal, ha mostrado incrementar los niveles de la proteína C reactiva<sup>330</sup>.

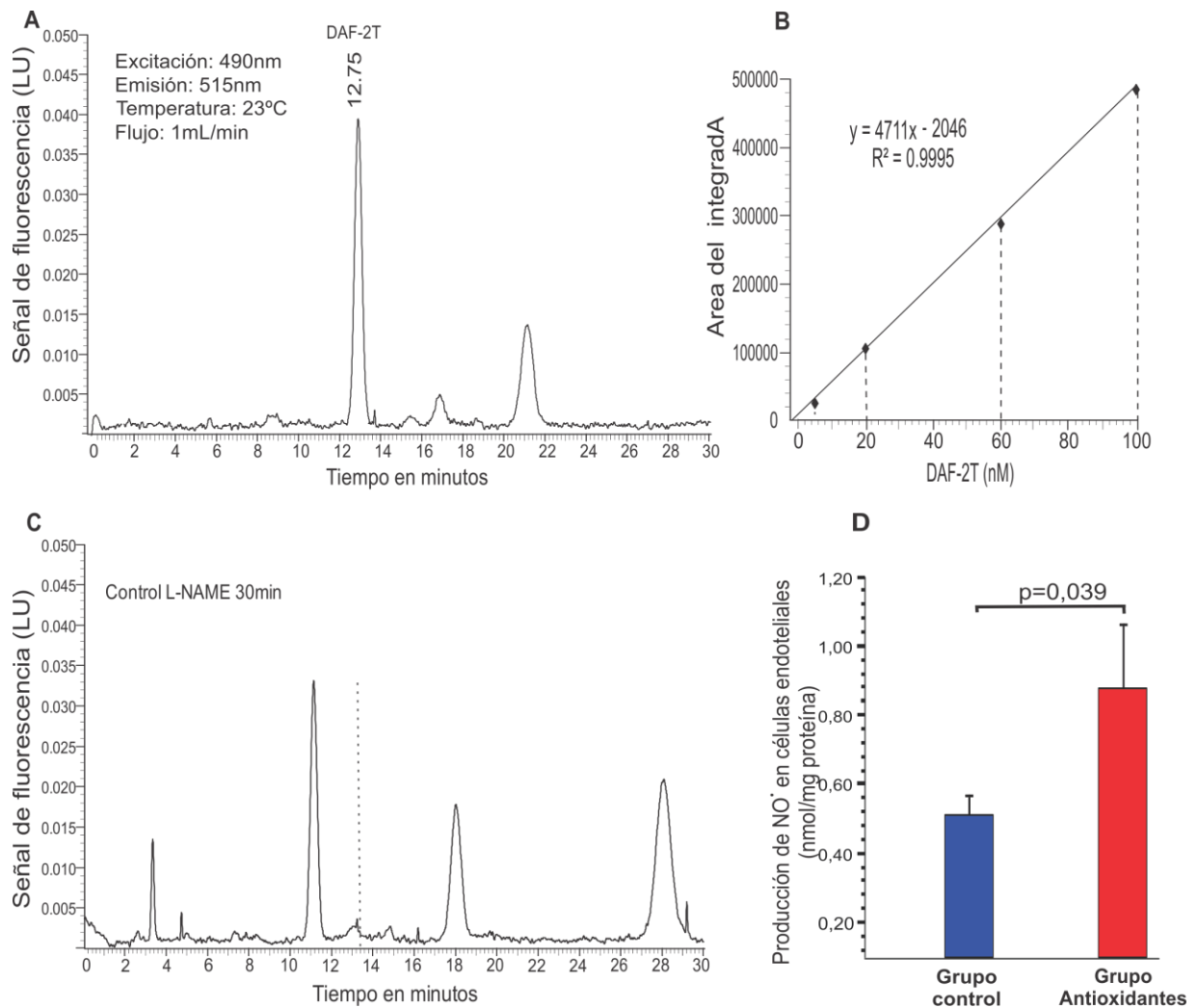
## CAPITULO 5

### EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA FUNCION ENDOTELIAL NEONATAL

Para evaluar el efecto de la intervención con antioxidantes sobre la función endotelial neonatal, se cultivaron las células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC; siglas en ingles) de recién nacidos cuyas madres habían sido asignadas a uno de los dos grupos del estudio. La función endotelial, fue valorada en cultivo por medio de la medición de la producción de NO<sup>•</sup>, anión superóxido y la expresión de las proteínas eNOS, ARG2, PGC1A y Nrf2 implicadas en la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup>.

La medición de NO<sup>•</sup> en cultivo, bajo condiciones basales, sin ningún tipo de estimulación, se realizó por HPLC a través de la determinación del DAF-2T, un compuesto derivado de la reacción del NO<sup>•</sup> con el DAF. La separación del pico de DAF-2T en la corrida cromatográfica se alcanzó a los 12,75 minutos (**Figura 14A**) bajo las condiciones descritas en el apartado de la metodología. La curva de calibración de DAF2-T se puede observar en la **Figura 14B**. Para confirmar que el pico de DAF-2T provenía del NO<sup>•</sup> sintetizado por la eNOS en las células HUVEC, se adicionó al cultivo L-NMMA, un inhibidor de la NOS. Después de la adición de este inhibidor no se detectó el DAF-2T en el sobrenadante del cultivo (**Figura 14C**).

La cuantificación de la síntesis de NO<sup>•</sup> en cultivo normalizada por la concentración de proteínas, mostró una producción significativamente mayor de NO<sup>•</sup> ( $p=0,039$ ) en las células HUVEC de recién nacidos provenientes de madres que consumieron antioxidantes durante la gestación (**Figura 14D**) con respecto al grupo control.

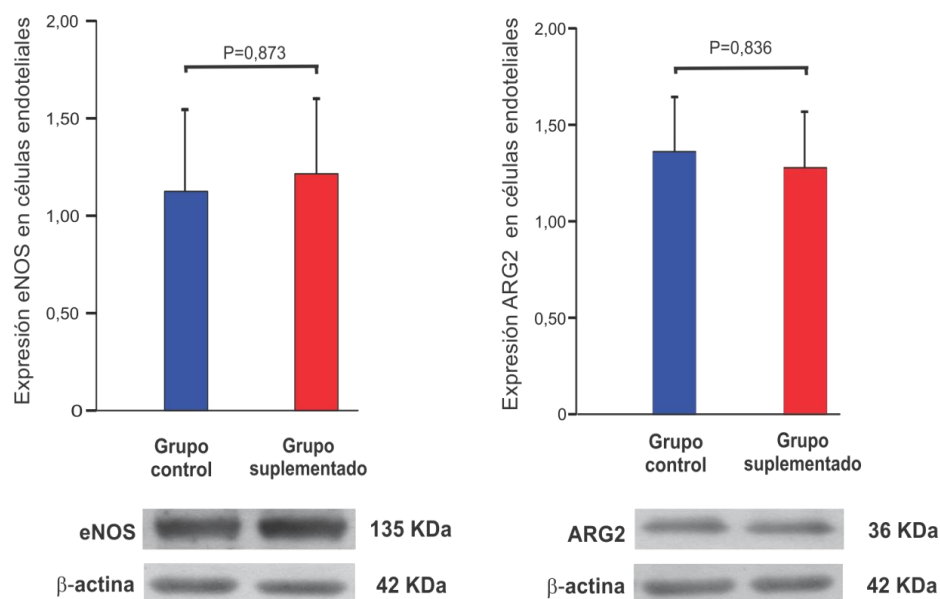


**Figura 14.** Determinación de NO• en células endoteliales por HPLC. **A.** Cromatograma de detección y cuantificación de DAF-2T por fluorescencia a un tiempo de retención de 12,75 minutos. **B.** Curva de calibración de DAF-2T utilizada para medir la concentración de NO•. **C.** Control de inhibición de la eNOS con L-NAME en células endoteliales por 30 min, se puede observar la ausencia de DAF-2T (línea punteada). **D.** Cuantificación de NO• en células endoteliales en el grupo control y el grupo tratado con antioxidantes. La concentración de NO• fue normalizada con la concentración de proteína celular (nmol/mg de proteína). Las células endoteliales del grupo antioxidantes presentaron una producción significativamente mayor de NO• ( $p=0,039$ ). Prueba U de Mann Whitney bilateral. Las barras representan el  $\pm$ EEM.

### Expresión proteica de eNOS y ARG2

Para establecer si este aumento en la producción de NO• en las células endoteliales estaba relacionada con una mayor expresión proteica de la eNOS y/o una disminución de la ARG2, se realizó su cuantificación proteica por western blot en el lisado celular, normalizado con la expresión

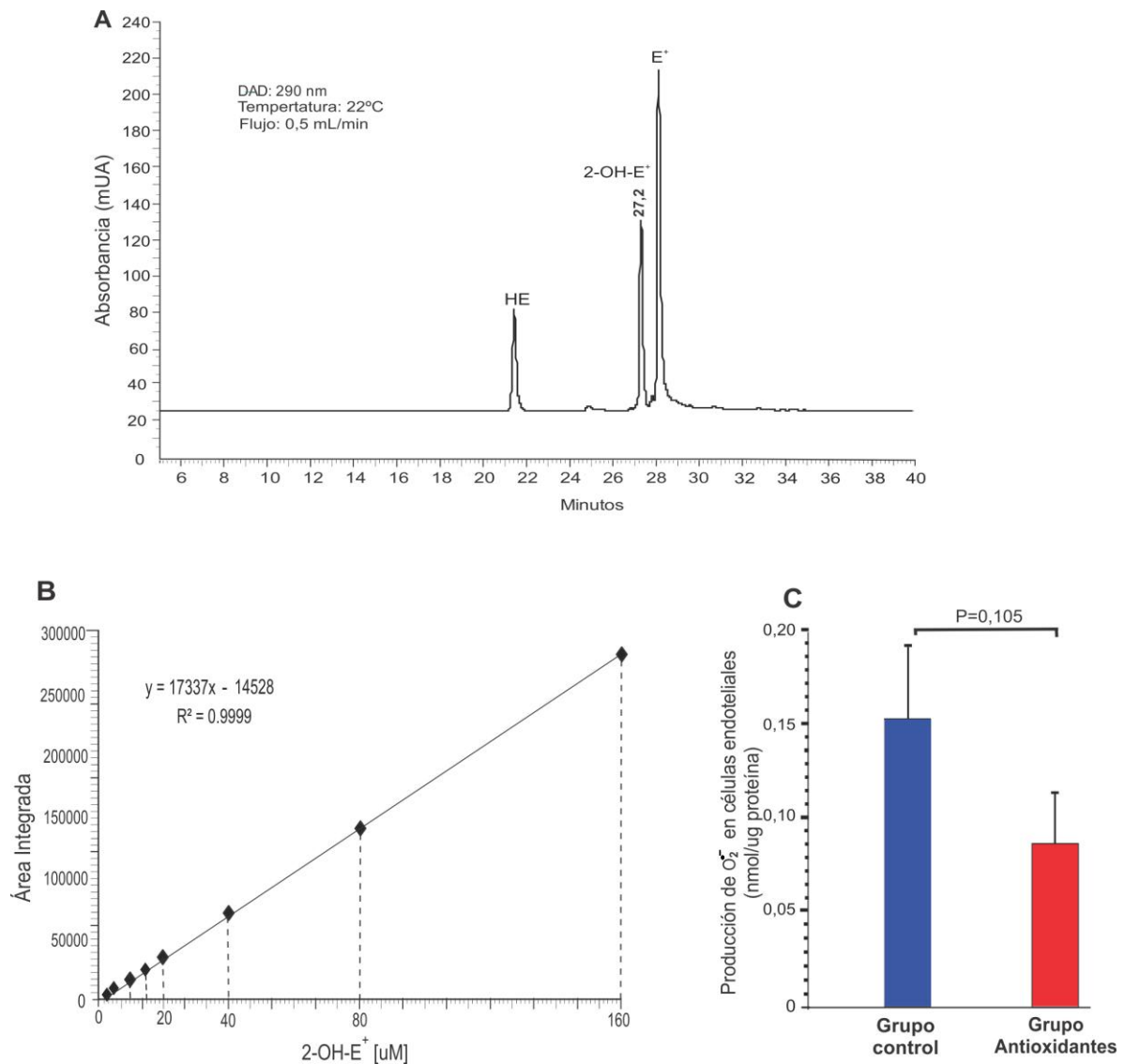
proteica de  $\beta$ -actina. El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas en la expresión de estas dos proteínas (**figuras 15A y 15B**).



**Figura 15.** Expresión proteica de eNOS y ARG2 en células endoteliales por western blot. **A.** Expresión la Óxido Nítrico sintasa endotelial (eNOS). **B.** Expresión de la ARG2. Las barras verticales representan el EEM. El valor  $p$  se calculó con la prueba U de Mann Whitney bilateral.

### Determinación del anión superóxido

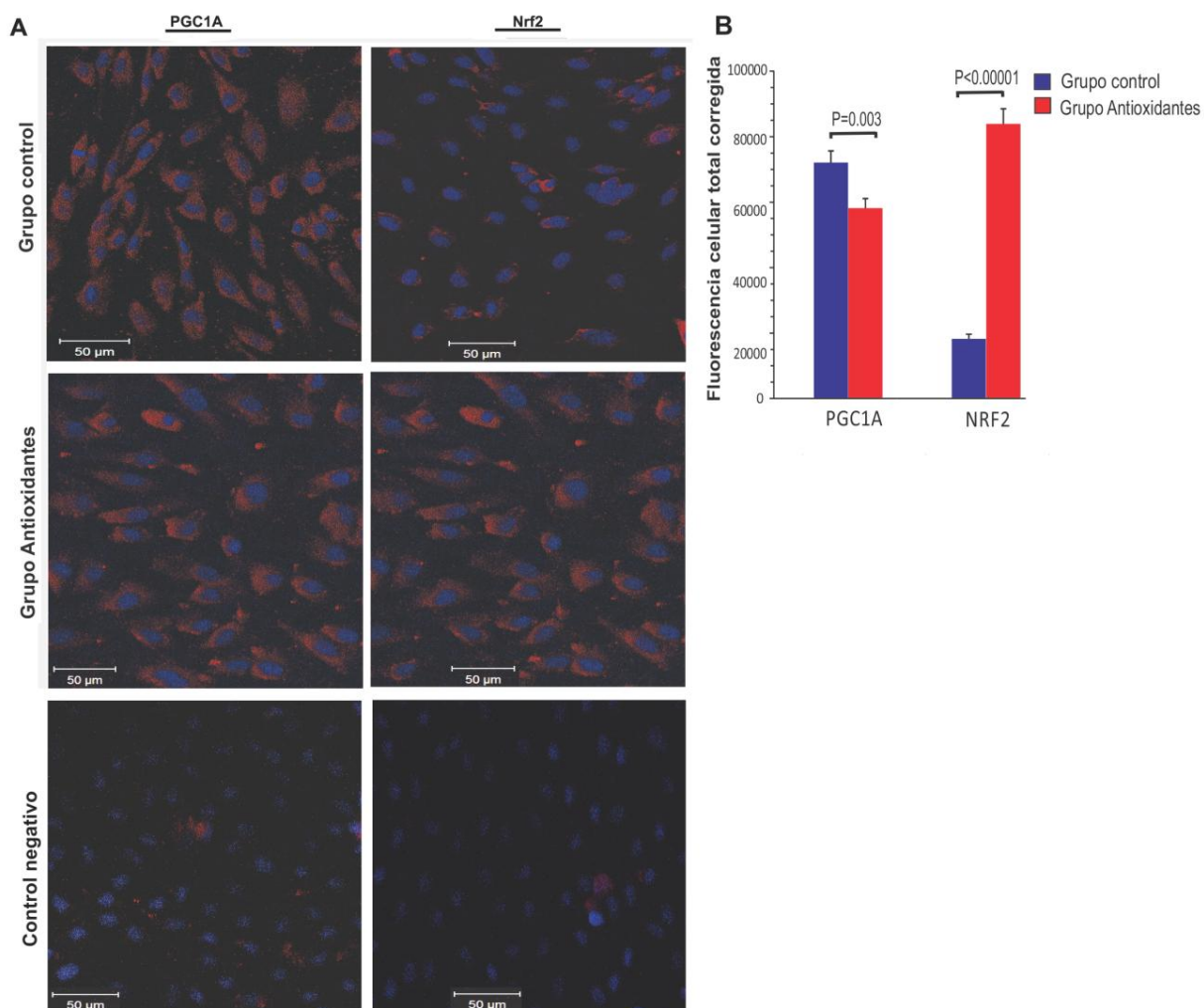
La producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en las células HUVEC, se mido en cultivo por HPLC por medio del 2-Hidroxietidio (2-OH-E<sup>+</sup>), un subproducto de la reacción entre el  $O_2^{\cdot -}$  y la Hidroetidina (HE). La separación y detección optima de la 2- OH-E<sup>+</sup> se alcanzó a los 27,2 minutos de la corrida cromatográfica (**Figura 16A**). La curva de calibración con este compuesto mostró una alta correlación con las áreas de los picos integrados (**Figura 15B**). El análisis de la cuantificación del  $O_2^{\cdot -}$  en cultivo (**Figura 16C**), mostró una menor producción de este RLO en el grupo tratado con antioxidantes aunque la diferencia no alcanzo a ser significativa ( $p=105$ ).



**Figura 16.** Determinación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en células endoteliales por HPLC **A.** Cromatograma de detección y cuantificación de 2-OH-E<sup>+</sup> a una longitud de onda de 290nm con un tiempo de retención de 27,2 minutos. Adicionalmente se pueden observar los picos de HE y E<sup>+</sup> en picos completamente separados **B.** Curva de calibración de 2-OH-E<sup>+</sup> utilizada para calcular la concentración de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en las muestras **D.** Cuantificación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en células HUVEC en el grupo control y el grupo tratado con antioxidantes. La concentración de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> fue normalizada con la concentración de proteína celular (nmol/ug de proteína). Las células endoteliales del grupo antioxidantes no mostraron una producción significativamente menor de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (p=0,105) con respecto al grupo control. Prueba de Mann Whitney bilateral. Las barras representan ±EEM.

## Expresión proteica de PGC1A y Nrf2

Para establecer, si existían diferencias en la expresión de PGC1A y Nrf2, proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, se midieron por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cultivo. La pureza del cultivo celular fue también evaluada por IFI con un anticuerpo anti-CD11 (Anexo 13). El análisis de expresión mostró en el grupo tratado con antioxidantes una menor expresión de PGC1A y mayor expresión de Nrf2, diferencia significativa en ambos casos (Figura 17 A y B).



**Figura 17.** Expresión proteica en células endoteliales de PGC1A y Nrf2 por inmunofluorescencia. **A.** Las células endoteliales de neonatos del grupo placebo y del grupo tratado con antioxidantes fueron marcadas con anti- PGC1A y anti-Nrf2. El ADN nuclear fue teñido con DAPI. El control se incubó solo con el anticuerpo secundario. **B.** Cuantificación de la fluorescencia celular para PGC1A y Nrf2. Las barras representan  $\pm$  EEM.

Los resultados encontrados muestran que las células endoteliales en cultivo terciario de recién nacidos de mujeres tratadas con antioxidantes, presentan una mayor producción de NO<sup>•</sup>, este incremento no se encuentra asociado con modificaciones en la expresión de la eNOS o la disminución de la ARG2.

El factor transcripcional Nrf2 es una proteína pentamérica cuya activación ha mostrado proteger a las células endoteliales frente al estrés oxidativo y suprimir la respuesta inflamatoria mediada por RLO<sup>331</sup>. El Nrf2 bajo condiciones basales se encuentra en el citoplasma unido con la proteína Keap1 que evita su translocación al núcleo. Los RLO ocasionan una disminución de la afinidad de Keap1 por Nrf2 permitiendo su activación y reclutamiento hacia el núcleo donde reconoce secuencias ARE en el ADN conduciendo al aumento de la transcripción de múltiples genes involucrados en el control del estrés oxidativo y mecanismos anti-inflamatorios<sup>332</sup>. Recientemente, Yu S *et al*<sup>333</sup> reportaron en células cancerígenas de próstata de ratón, la represión del gen Nrf2 puede ser controlada por metilación de citosinas en su región promotora, con la consecuente reducción de proteínas que participan en la defensa contra el estrés oxidativo. La inducción de hipometilación de la región promotora se halló correlacionada con el restablecimiento de la expresión de la proteína Nrf2<sup>334</sup>. Este mismo grupo reportó que el uso de un antioxidante como el  $\gamma$ -tocoferol previene *in vivo* la hipermetilación de una región del promotor e incluso la revierte *in vitro*<sup>335</sup>. Smolarek *et al*<sup>336</sup>, en un modelo murino encontraron que la ingesta de  $\gamma$ -tocoferol incrementa la expresión de Nrf2. Esto muestra que es posible modular este factor de transcripción por la dieta bien sea a través de modificaciones epigénéticas y/o inducción de su activación. Adicionalmente el Nrf2 está controlado por su estado de acetilación, desacetilasas como SIRT1 han mostrado incrementar la actividad de la proteína durante estados de estrés oxidativo<sup>337</sup>. El aumento constitutivo sin estímulo detectado en cultivo del Nrf2 en células endoteliales de neonatos de madres que recibieron los antioxidantes podrían implicar una mejor capacidad para controlar la producción de RLO en cultivo. Aunque es prematuro asegurar que este mismo comportamiento se presente *in vivo*, dado que en este estudio no se evaluó la actividad de esta proteína en cultivo.

Por otra parte el PGC1- $\alpha$ , es un coactivador involucrado en la biogénesis mitocondrial, el incremento en la expresión de enzimas antioxidantes por medio de la modulación de la expresión y activación

del Nrf1 y Nrf2<sup>338</sup>. En cultivo de células endoteliales de cordón se ha encontrado que polifenoles como el resveratrol incrementa la expresión y actividad del PGC1- $\alpha$ <sup>339</sup>.

Recientemente, en células musculares de sujetos con diabetes tipo II, se observó una correlación negativa entre la hipermetilación de citosinas en el promotor del PGC1 $\alpha$ , con la expresión proteica y la densidad mitocondrial<sup>340</sup>. Ling C *et al* encontraron, en células *beta* pancreáticas de origen humano, reducción en la expresión de la proteína relacionada con metilaciones en islas CpG.<sup>341</sup> Gemma C *et al*<sup>342</sup>, encontraron relación inversa entre la metilación de la región promotora del gen PGC1 $\alpha$ , en células de cordón umbilical, y el índice de masa corporal preconcepcional de la madre, sugiriendo un posible efecto del estado materno sobre la regulación epigenética de este gen. . Esta proteína puede regular el funcionamiento mitocondrial, y procesos como la gluconeogénesis hepática, el metabolismo de proteínas, la angiogénesis, la termogénesis adaptativa y la biosíntesis del grupo hemo entre otras funciones<sup>343</sup>.

En resumen, en el cultivo celular se encontró un incremento en la expresión de proteínas involucradas en el control del estrés oxidativo y metabolismo celular, así como una mayor producción de NO<sup>\*</sup> en células endoteliales de neonatos cuyas madres fueron suplementadas con antioxidantes durante el embarazo. La producción de las enzimas eNOS y ARG2 y de anión superóxido no fue diferente entre los grupos. Esta aparente mejor función endotelial *in vitro* en el grupo tratado con antioxidantes, debe interpretarse con cuidado dado que en este trabajo no se estableció la actividad funcional de las células cultivadas.

## CAPÍTULO 6

### EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA EXPRESION DE ARNs LARGOS NO CODIFICANTES Y LA METILACION DE REGIONES PROMOTORAS RELACIONADAS CON ANGIOGENESIS EN PLACENTA

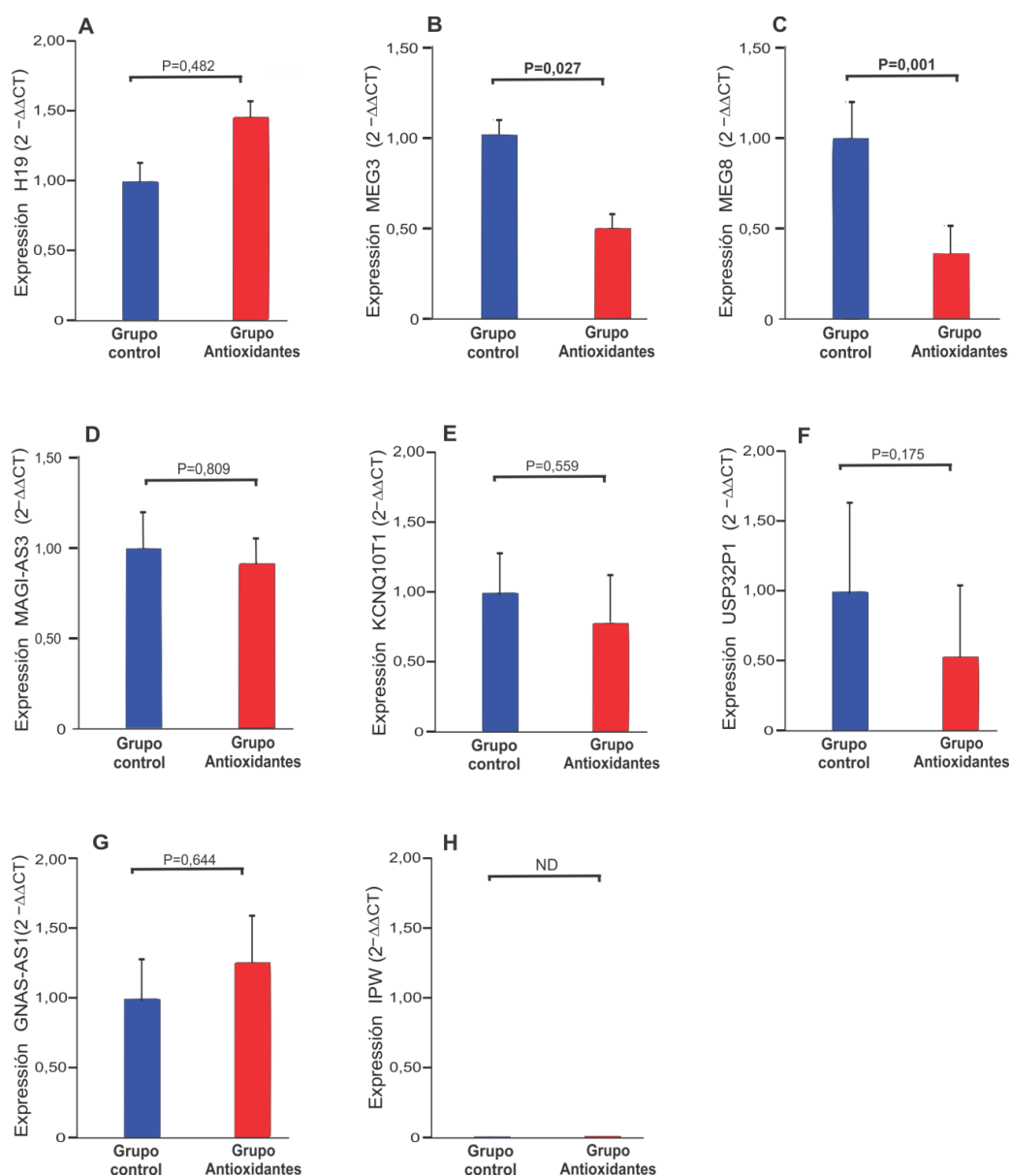
#### Expresión de ARNs largos no codificantes.

La expresión de 8 genes lncRNAs (H19, MEG3, MEG8, MAGI-AS3, KCNQ10T1, USP32P1, GNAS-as1 y IPW) con un patrón de expresión materno fue analizada por triplicado en muestras de placenta con la técnica de PCR en tiempo real (**Anexo 14**). Las muestras utilizadas fueron apareadas por adherencia (>60%), peso placentario y edad gestacional en el grupo control (n=3) y el grupo tratado con antioxidantes (n=3) para reducir la variabilidad que pudiera estar relacionadas con estas dos variables. Los valores de CT medidos por qPCR fueron normalizados por la expresión de  $\beta$ -actina.

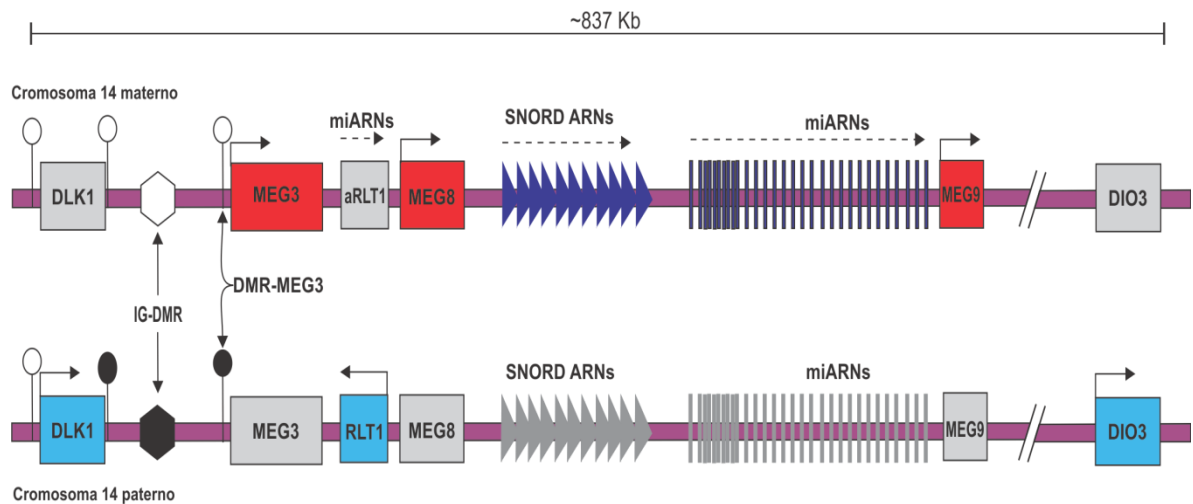
No se encontraron diferencias en la expresión en cinco de los genes estudiados. No se alcanzó detectar a IPW. En las placentas del grupo tratado con antioxidantes se encontró una expresión significativamente menor ( $p<0,05$ ) de MEG3 y MEG8 (**figuras 18B y 18C**)

Los genes MEG3 y MEG8 se expresan en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32) materno situado en el locus génico denominado DLK1 –DIOS. Esta región cubre aproximadamente 837 Kb, incluye 3 genes codificantes, DLK1, RLT1 y DIO3 que normalmente se expresan solo uno de los alelos paternos. Esta región también contiene a MEG9 otro lncRNA, varios ARNs nucleolares pequeños y alrededor de 54 microARNs<sup>344</sup> (**Figura 19**). La expresión diferencial de los genes según el origen parental del cromosoma parece estar regulada por el estado de metilación de dos Regiones Diferencialmente Metiladas (DMR) que se localizan corriente arriba de MEG3: el DMR Intergénico (IG-DMR) y el MEG3-DMR este último se superpone con la región promotora del gen MEG3. En el cromosoma materno el IG-DMR que se encuentra entre DLK1 y MEG3 usualmente esta desmetilado permitiendo la expresión de los genes MEG, una situación contraria se presenta en el IG-DMR paterno (**Figura 19**). El estado de metilación del DMR-MEG3 parece estar bajo control del IG-DMR en los tejidos corporales, aunque en placenta no parece tener el mismo comportamiento<sup>345</sup>. En la región de control de la expresión de MEG3, también se ha identificado una secuencia de unión de factores de transcripción denominada elemento de respuesta al AMP cíclico<sup>346</sup>.

En el caso del gen MEG8 se conoce que transcribe para un lncRNA de ~500 nucleótidos que ha sido poco estudiado en humanos y animales. En ratones MEG8 se produce como producto del splicing alternativo de un macro ARN denominado RIAN que se expresado ampliamente durante el desarrollo fetal en tejidos como musculo esquelético, lengua, pulmón, timo, hígado y cerebro<sup>347</sup>.



**Figura 18.** Expresión de lncRNAs relacionados con imprinting materno en placenta. **A.** H19 **B.** MEG3, **C.** MEG8, **D.** MAGI-AS3, **E.** KCNQ1OT1, **F.** USP32P1, **G.** GNAS-AS1, **H.** IPW. La barras verticales representan el EEM. ND: No detectable.



**Figura 19.** Esquema del locus DLK1-DIO3 en el cromosoma 14 humano. Los tres genes codificantes del locus DLK1, RLT1 y DIO3 son expresados en el cromosoma paterno. Mientras MEG3, MEG8, MEG9, numerosos ARNs nucleolares pequeños (SNORD ARNs) y micro ARNs (miARNs) se expresan solo en el cromosoma materno. El estado desmetilado en el cromosoma materno de la Región Intergénica Diferencialmente Metilada (IG-DMR) permite la expresión de los lncRNAs e inhibe la expresión de los genes codificantes. El color gris indica los genes no expresados, el color rojo lncRNAs expresados, El color azul claro, genes codificantes expresados. El color negro indica metilación. aRLT1: Anti sentido RLT1; miARNs: MicroARNs, SNORD ARNs: ARNs nucleolares cortos.

El gen MEG3 se ha encontrado expresado en la mayoría de los tejidos en humanos y se han identificado al menos trece isoformas producidas por splicing alternativo, de las cuales la variante MEG1 (NR\_002766.2) de ~1600 nucleótidos explica alrededor del 70% de los transcritos<sup>348</sup>. La función de MEG3 aún no se ha entendido por completo, sin embargo se ha logrado determinar que tiene propiedades antiproliferativas dependientes de su estructura, que le permite regular proteínas que controlan el ciclo celular como p53 y MDM2<sup>349</sup>. La supresión o la disminución de la expresión de MEG3, ha sido relacionada con la proliferación y crecimiento de diferentes tipos de tumores. Mientras que su sobreexpresión *in vitro* ha mostrado que inhibe la proliferación celular de células cancerígenas, hallazgos que han llevado a considerar a MEG3 como un gen supresor de tumores.

Otra función atribuida a los transcritos de MEG3 es la regulación negativa de la angiogénesis. Gordon *et al*<sup>350</sup>, en tejido cerebral de ratones knock out para MEG3, reportaron un incremento entre cuatro a cinco veces en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular alfa (VEGFA) y

su receptor tipo I (VEGFAR1) asociado con un incremento también significativo en la densidad de la microvasculatura cerebral. La vía de VEGF es esencial para la proliferación, supervivencia y migración de las células endoteliales durante la angiogénesis y la formación de nuevos vasos. Recientemente, Dimmeler *et al*,<sup>351</sup> reportaron que al menos el 56% del total del ARN en células HUVEC corresponde a ncRNAs, con al menos un 14% siendo clasificados como lncRNAs. En este mismo trabajo se encontró que bajo condiciones de hipoxia la expresión de MEG3 se incrementó hasta cuatro veces respecto a la condición de normoxia. Estos hallazgos indican que la expresión de MEG3 podría ser modulada por modificaciones ambientales a nivel celular. Recientemente, Zhang *et al*<sup>352</sup>, encontraron en placentas de mujeres primigestantes diagnosticadas con preeclampsia una disminución muy significativa en la expresión de MEG3. En ese mismo estudio la sobreexpresión del gen en líneas celulares trofoblásticas inhibió la apoptosis e incrementó la migración celular, el resultado contrario fue observado tras su inhibición. McMinin *et al*<sup>353</sup> también encontraron una reducción significativa en la expresión de MEG3 en placentas de embarazos con RCIU. Sin embargo en otro estudio similar DiPlas *et al*<sup>354</sup>, no encontraron diferencias significativas en la expresión MEG3 entre placentas de recién nacidos con RCIU y crecimiento normal.

Este es el primer estudio en reportar que el consumo de micronutrientes antioxidantes durante el embarazo se relaciona con la disminución de la expresión de MEG3 y MEG8 en placenta, dos lncRNAs con un patrón de expresión materna. El significado biológico de esta disminución puede circunscribirse a las funciones conocidas actualmente para MEG3, el lncRNA más estudiado del locus DLK1-DIO3. Tres características críticas para el funcionamiento de la placenta como la angiogénesis, la migración y proliferación celular están relacionadas con MEG3. Los efectos fisiológicos descritos en la literatura para estos lncRNAs son escasos y en muchas ocasiones discordantes, lo cual puede implicar que su función puede depender del contexto celular en que se estudien. Un posible mecanismo por el cual la expresión de MEG3 y MEG8 puede ser regulada es a través de factores de respuesta al estrés oxidativo como Nrf2, esto implicaría que el estado redox es un posible modulador de su expresión, ya en células endoteliales humanas se ha visto que la hipoxia la cual ha sido relacionada con el aumento del estrés oxidativo induce la sobreexpresión de MEG3, por lo que es posible inferir que una reducción de los radicales libres placentario por el tratamiento con antioxidantes pueda haber llevado por esta vía a reducir su expresión.

### Metilación de genes relacionados con angiogénesis en placenta.

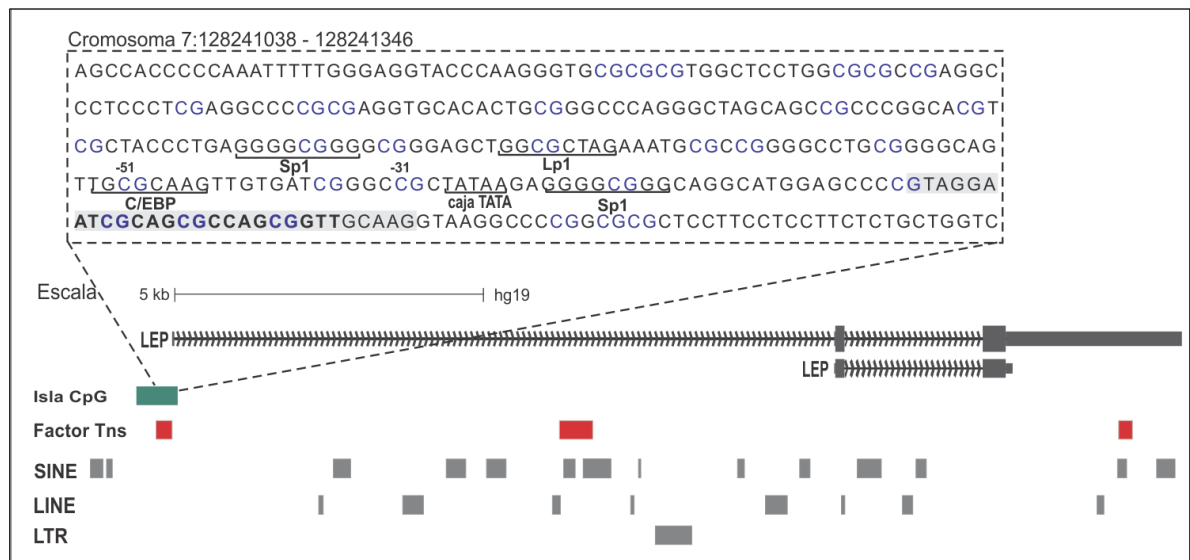
El análisis de metilación del ADN extraído de placenta en los genes seleccionados por su relación con procesos angiogénicos y la biodisponibilidad del NO<sup>•</sup>, se encontró en general un estado desmetilado en las regiones promotoras estudiadas. Los porcentajes de metilación entre los grupos no difirieron estadísticamente 18 de los genes estudiados (**Tabla 17**). En el PCR array no se logró detectar el estado de metilación de los genes SLC7A1, AGTR1 y KDR (**Anexo 15**)

**Tabla 17.** Porcentaje de metilación en regiones promotoras en placenta.

| Promotor | Grupo Control (n=6) |             | Grupo Antioxidantes (n=6) |             | p            |
|----------|---------------------|-------------|---------------------------|-------------|--------------|
|          | Mediana (%)         | Rango       | Mediana (%)               | Rango       |              |
| SIRT1    | 0,35                | 0,06 -1,40  | 0,70                      | 0,09 -2,79  | 0,394        |
| VEGFA    | 0,021               | 0,00 - 0,19 | 0,029                     | 0,00 – 0,08 | 0,818        |
| FGF2     | 0,080               | 0,00 - 0,4  | 0,065                     | 0,1– 0,32   | 0,999        |
| ITGB5    | 0,11                | 0,1 - 0,27  | 0,32                      | 0,03 – 0,70 | 0,118        |
| MTOR     | 0,54                | 0,34 - 0,77 | 0,53                      | 0,12-0,95   | 0,999        |
| TIMP2    | 0,031               | 0,00 –      | 0,065                     | 0,01 – 0,13 | 0,589        |
| KLLN     | 0,0045              | 0,00 - 0,15 | 0,0048                    | 0,00-0,03   | 0,818        |
| NRP1     | 0,10                | 0,06 - 0,29 | 0,32                      | 0,06 – 0,60 | 0,180        |
| LEP      | 62                  | 55 – 72     | 75                        | 61 - 86     | <b>0,041</b> |
| ARG2     | 2,0                 | 0,5 – 3,8   | 3,9                       | 0,35 – 7,7  | 0,476        |
| KIT      | 0,034               | 0,03 – 0,27 | 0,041                     | 0,02 – 0,39 | 0,999        |
| NFE2L2   | 0,0006              | 0,00 – 0,23 | 0,0018                    | 0,00 -0,01  | 0,818        |
| KEAP1    | 0,014               | 0,01 – 0,24 | 0,008                     | 0,00 – 0,03 | 0,240        |
| FGFR1    | 0,016               | 0,00 – 0,04 | 0,029                     | 0,00 – 0,08 | 0,394        |
| FLT1     | 0,26                | 0,04 – 0,50 | 0,24                      | 0,12 – 0,53 | 0,688        |
| CKS1B    | 0,43                | 0,18 – 0,60 | 0,12                      | 0,04 – 0,45 | <b>0,015</b> |
| FSCN1    | 0,055               | 0,01 - 0,08 | 0,09                      | 0,04 – 0,21 | 0,065        |
| DDAH2    | 0,05                | 0,00 – 0,26 | 0,20                      | 0,02 – 0,30 | 0,394        |
| LEPR     | 14,1                | 0,07 – 42   | 50                        | 0,12 - 69   | 0,132        |
| CDH1     | 0,52                | 0,3 -69     | 0,73                      | 0,17-62     | 0,999        |
| ACTB     | 0,0008              | 0,00-0,16   | 0,010                     | 0,00-0,07   | 0,177        |

La diferencia entre grupos se calculó con la prueba U de Mann-Whitney bilateral.

Para la región promotora del gen de leptina (LEP) se encontró un aumento significativo ( $p=0,041$ ) en el porcentaje de metilación en el grupo tratado con antioxidantes (media= 75%) respecto al grupo control (media = 62%). El promotor del gen de leptina se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7 dentro de una isla CpG de 625 bp que contiene 60 dinucleótidos CpG<sup>355</sup>. En esta región se ha identificado una secuencia de  $\approx 310$  bp corriente arriba del primer exón con varias secuencias de unión a factores de transcripción como el Sp1, Lp1, C/EBP y la caja TATA involucradas en el control transcripcional del gen<sup>356</sup> (**Figura 20**). Estas secuencias de regulación presentan citosinas susceptibles de ser metiladas. Experimentalmente se ha encontrado que la metilación de las citosinas dentro de la secuencia de unión de C/EBP (nucleótido -51) y aquellas que flanquean la caja TATA (nucleótido -21) inhiben la expresión del gen<sup>357</sup>. Marchi *et al*<sup>358</sup>, también reportaron que el estado de metilación del promotor de leptina varía entre diferentes tejidos y esta variación es uno de los principales determinantes de su nivel de expresión.



**Figura 20.** Loci del gen de leptina. El promotor del gen de leptina se encuentra dentro de una isla CpG en la cual se han identificado secuencias de unión a los factores de transcripción Sp1, Lp1, C/EBP. El gen también presenta secuencias para elementos repetidos como SINEs, LINEs y LTR. Las barras de color verde representan la isla CpG, el color rojo las regiones de unión de factores de transcripción y en color gris las regiones para elementos repetidos. En la secuencia de 310 bp, en color azul se resaltan los dinucleótidos CpG. En sombreado gris se resalta la secuencia UTR 5'.

Diferentes estudios han encontrado en placenta, que el estado de metilación de citosinas en el promotor de leptina presenta variaciones relacionadas con distintas patologías del embarazo. La hipometilación del promotor ha sido relacionada con altas concentraciones de la hormona en suero materno y un mayor riesgo de inicio temprano de preeclampsia<sup>359</sup>. Xiang *et al*<sup>360</sup>, encontraron un aumento significativo de hipometilación en citosinas localizadas en dinucleótidos CpGs próximos al sitio de unión de los factores de transcripción Sp1, Lp1, C/EBP. De otra parte Bouchard *et al*<sup>361</sup>, reportaron una relación entre el porcentaje de metilación de la región promotora de gen de leptina en placenta y la glicemia desarrollada 2 horas post-carga en mujeres que presentaron intolerancia oral a la glucosa durante la gestación. En otro estudio Xu *et al*<sup>362</sup>, encontraron que el desarrollo de fetos macrosómicos se relaciona con la hipermetilación de citosinas específicas en el promotor, aunque no presentó correlación con el nivel de expresión del gen. Otro estudio encontró que la hipermetilación del promotor en placenta se relaciona con alteraciones en el neurocomportamiento de los recién nacidos.<sup>363</sup> Todos estos hallazgos sugieren que la metilación de este promotor en tejido placentario es susceptible de ser modificada por el ambiente intrauterino, y que por mecanismos que aún no se entienden puede ser un indicador del estado de salud del neonato para el desarrollo de futuras enfermedades.

El hallazgo en este estudio de un mayor porcentaje de metilación en el promotor de leptina en el grupo tratado con antioxidantes podría implicar que las modificaciones epigénéticas en este *loci*, son sensibles al estado redox, lo cual hasta el momento no ha sido estudiado en la literatura científica. El incremento en la metilación de citosinas en CpGs de regiones promotoras tradicionalmente ha sido asociado con la represión transcripcional a través de mecanismos como la inhibición de la unión de factores de transcripción y el reclutamiento de proteínas hacia los CpG metilados<sup>364,365</sup>. Por lo tanto es posible suponer que el mayor grado de metilación encontrado en las placentas del grupo suplementado con antioxidantes pueda estar asociado con una disminución en la expresión del gen LEP. Sin embargo, como se mencionó en párrafos anteriores la metilación de solo algunas citosinas específicas en el promotor de este gen desempeñan una función crítica en su nivel de expresión. Una de las limitaciones técnicas del PCR array utilizado para cuantificar la metilación de las regiones promotoras, es que no da información acerca de la región y posición específica de las citosinas metiladas, dificultando la interpretación biológica de las diferencias encontradas. Por esta

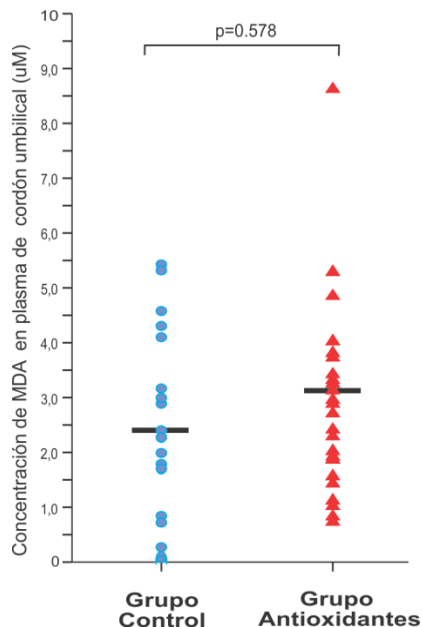
razón, el siguiente paso es realizar análisis adicionales con un tamaño de muestra mayor, y aplicando técnicas como la pirosecuenciación o espectrometría de masas, que permiten identificar si las diferencias de metilación se localizan en las regiones de control críticas.

## CAPÍTULO 7

### EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES ANTIOXIDANTES SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y MEDICIONES ANTROPOMETRICAS NEONATALES

Para determinar el efecto de la suplementación con antioxidantes sobre los niveles de estrés oxidativo en los recién nacidos, se midió la concentración de MDA total en plasma en sangre venosa de cordón umbilical. Para esto se seleccionaron muestras de neonatos que reunieran las condiciones de adherencia materna a la intervención >60%, cuyas madres tuvieran dos mediciones previas de MDA durante el embarazo y no evidenciaran hemolisis. En total fueron seleccionadas 25 muestras de plasma de neonatos pertenecientes al grupo placebo y 19 del suplementado con antioxidantes.

Los niveles de MDA en el momento de nacer no mostraron diferencias significativas entre los grupos. (Figura 21 y Tabla 18).



**Figura 21.** Concentración de MDA en plasma de sangre de cordón umbilical. La línea horizontal entre los puntos representa la media.

Tabla 18. Niveles plasmáticos de MDA (uM) en sangre de cordón.

|     | Grupo Control |                  |         | Grupo Antioxidantes |                  |         | <i>p</i> |
|-----|---------------|------------------|---------|---------------------|------------------|---------|----------|
|     | n             | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%  | n                   | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%  |          |
| MDA | 25            | 2,5±1,7          | 1,7-3,3 | 19                  | 3,4 ±3,6         | 1,9–4,9 | 0.578    |

$\bar{X}$ : Media, DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza de la media. La diferencia se calculó con la prueba U de Mann Whitney bilateral.

El análisis de correlaciones del MDA en plasma de cordón umbilical con las covariables maternas, mostró una correlación positiva con el MDA en plasmático materno en el grupo control medido entre las semanas 16-20 de gestación (***Rho*= 0,544 *p*=0,016**). Esta relación es similar a la reportada por Koklu *et al*,<sup>366</sup> entre el MDA materno medido en el segundo trimestre y el de los recién nacidos (*r*=0,473) en un estudio con 100 gestantes. Es interesante hacer notar que esta relación no se encontró en el grupo que consumió los antioxidantes (*Rho*=0.279 *p*=0,187).

No se encontraron correlaciones significativas con otras variables antropométricas maternas, vasculares o de inflamación en el grupo control y suplementado con antioxidantes (**Anexo 16**). Tampoco se encontró correlación entre el MDA del plasma de los recién nacidos con las variables antropométricas neonatales y placentarias (**Tabla 19**).

Para el análisis de las variables antropométricas neonatales y morfométricas placentarias se incluyeron los datos de embarazadas que no asistieron a la segunda cita entre las semanas 32-36 de gestación, por tal razón el número del tamaño de muestras es mayor al utilizado en el análisis de la variable resultado VMF.

**Tabla 19.**Correlaciones de MDA en cordón umbilical con variables antropométricas neonatales y placentarias.

| Parámetro                     | MDA Cordón Grupo control (n=25) |          | MDA Cordón Grupo Antioxidantes(n=19) |          |
|-------------------------------|---------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
|                               | <i>Rho</i>                      | <i>p</i> | <i>Rho</i>                           | <i>p</i> |
| <b>Antropometría neonatal</b> |                                 |          |                                      |          |
| Peso                          | 0.093                           | 0.721    | 0.028                                | 0.893    |
| Talla                         | -0.224                          | 0.388    | -0.173                               | 0.408    |
| Perímetro cefálico            | 0.009                           | 0.973    | 0.079                                | 0.707    |
| Perímetro abdominal           | 0.191                           | 0.463    | 0.084                                | 0.688    |
| Índice Ponderal               | 0.420                           | 0.094    | 0.172                                | 0.411    |
| <b>Placenta</b>               |                                 |          |                                      |          |
| Peso (gr)                     | -0.130                          | 0.619    | 0.089                                | 0.673    |
| Grosor (cm)                   | 0.107                           | 0.684    | 0.110                                | 0.601    |
| Diámetro (cm)                 | 0.272                           | 0.326    | -0.007                               | 0.973    |
| Circunferencia (cm)           | 0.113                           | 0.665    | -0.304                               | 0.140    |

Se calculó con el coeficiente de *rho* de Spearman a un nivel de significancia 0,05 bilateral

El análisis de las variables antropométricas de los recién nacidos entre los grupos (**Tabla 20**) mostró que el IP fue significativamente mayor en el grupo intervenido con antioxidantes ( $p=0,019$ ).

**Tabla 20.** Indicadores de antropometría fetal por grupos.

| Parámetro                             | Grupo Control |                  |             | Grupo Antioxidantes |                  |             | p<br>t-Student |
|---------------------------------------|---------------|------------------|-------------|---------------------|------------------|-------------|----------------|
|                                       | n             | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%      | n                   | $\bar{X} \pm DE$ | IC 95%      |                |
| Peso al nacer (gr)                    | 85            | 3126 $\pm$ 415   | 3037-3216   | 86                  | 3200 $\pm$ 459   | 3102-3299   | 0.270          |
| Talla (cm)                            | 85            | 50,3 $\pm$ 2,2   | 49,8 – 50,8 | 84                  | 49,9 $\pm$ 3,1   | 49,2 – 50,5 | 0.283          |
| Perímetro cefálico (cm)               | 79            | 33.6 $\pm$ 1,9   | 33.1 - 34,0 | 86                  | 32.5 $\pm$ 1,5   | 33,5 – 34,2 | 0.302          |
| Perímetro abdominal (cm)              | 72            | 32,2 $\pm$ 4,2   | 31,7 -32,7  | 80                  | 32,5 $\pm$ 3,9   | 32,1 -33,0  | 0.297          |
| Índice ponderal (gr/cm <sup>3</sup> ) | 85            | 2,44 $\pm$ 0,26  | 2,38 -2,50  | 86                  | 2,60 $\pm$ 0,52  | 2,48 -2,72  | <b>0,019</b>   |
| Semanas de gestación                  | 92            | 39.1 $\pm$ 5.1   | 38-40.2     | 90                  | 39.6 $\pm$ 5.0   | 38.5-40.7   | 0.443          |

$\bar{X}$ : Media, DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza de la media

Al categorizar por sexo la antropometría neonatal se encontró que el índice ponderal entre los neonatos de sexo masculino fue mayor en el grupo tratado con antioxidantes ( $p=0,029$ ). (**Tabla 21**). La diferencia siguió siendo significativa ( $p=0,042$ ) después de excluir a los neonatos con bajo peso al nacer ( $<2500$  gr) y macrosómicos ( $>4500$  gr) de ambos grupos. También se observó en el grupo control un menor perímetro cefálico en los recién nacidos de sexo femenino con respecto a los varones ( $p=0,036$ ). Tendencia que no se observó en el grupo tratado con antioxidantes.

**Tabla 21.** Indicadores de antropometría fetal por grupos y sexo del recién nacido.

| Parámetro           | Grupo Control     |                  |              | Grupo Antioxidantes |                  |          | <i>p</i><br>Intergrupos |          |
|---------------------|-------------------|------------------|--------------|---------------------|------------------|----------|-------------------------|----------|
|                     | Masculino<br>n=42 | Femenino<br>n=43 | <i>p</i>     | Masculino<br>n=39   | Femenino<br>n=45 | <i>p</i> | Masculino               | Femenino |
|                     | $\bar{x} \pm DE$  | $\bar{x} \pm DE$ |              | $\bar{x} \pm DE$    | $\bar{x} \pm DE$ |          |                         |          |
| Peso al nacer       | 3209±425          | 3045±393         | 0,068        | 3278±422            | 3133±483         | 0,146    | 0,711                   | 0,330    |
| Talla               | 50,8 ±2,0         | 49,9±2,3         | 0,070        | 50,2±2,1            | 49,6±3,7         | 0,428    | 0,076                   | 0,727    |
| Perímetro cefálico  | 34,0 ±1,7         | 33,1±2,0         | <b>0,036</b> | 34,0±1,5            | 33,7± 1,5        | 0,483    | 0,808                   | 0,082    |
| Perímetro abdominal | 32,0±1,9          | 32,5±2,1         | 0,335        | 32,7±1,9            | 32,4±2,0         | 0,518    | 0,102                   | 0,808    |
| Semanas gestación   | 38,7±1,3          | 39,2 ±6,7        | 0,661        | 39,3±1,6            | 39,8±6,6         | 0,660    | 0,077                   | 0,660    |
| Índice ponderal     | 2,44±0,26         | 2,44±0,26        | 0,939        | 2,59±0,30           | 2,61±0,72        | 0,931    | <b>0,029</b>            | 0,114    |
| MDA plasma cordón   | 2.8±1.8           | 2.3±1.5          | 0.606        | 2.6±1.4             | 2.0±1.5          | 0.392    | 0.779                   | 0.709    |

Peso al nacer en gramos; talla, perímetro cefálico y abdominal en centímetros; Índice ponderal en gr/cm<sup>3</sup>; MDA en uM.

Por otra parte la frecuencia de alteraciones de la salud materna y neonatal no mostró diferencias entre los grupos. Aunque si se encontró una tendencia no significativa de parto por cesárea en el grupo tratado con antioxidantes (**Tabla 22**). El APGAR indicador de salud neonatal tomado en el primer y al quinto minuto del nacimiento permite establecer adaptación extra-uterina y el riesgo de complicación tempranas en los recién nacidos. En este estudio la frecuencia de neonatos con APGAR bajo ( $< 7$ ) que se asocia con un mayor riesgo de mortalidad independientemente de la edad gestacional, no fue significativamente diferente. El análisis de los datos morfométricos de las placentas no mostró diferencias significativas entre los grupos (**Anexo 17**).

**Tabla 22.** Agrupación de las principales complicaciones en los grupos de tratamiento.

| Parámetro                    | Grupo Control |           |      | Grupo Antioxidantes |           |      | <i>p</i> |
|------------------------------|---------------|-----------|------|---------------------|-----------|------|----------|
|                              | n             | No. Casos | %    | n                   | No. Casos | %    |          |
| APGAR <7 a 1 minuto          | 78            | 2         | 2,5% | 80                  | 3         | 3,7  | 0,982    |
| APGAR <7 a 5 minutos         | 78            | 1         | 1,3% | 79                  | 1         | 1,2% | 0,482    |
| Parto pretermino <37 semanas | 91            | 6         | 6,6  | 88                  | 5         | 5,7  | 0.951    |
| Bajo peso al nacer <2500gr   | 85            | 7         | 8,2  | 86                  | 4         | 4,6  | 0,519    |
| Alto peso al nacer >4000gr   | 85            | 5         | 9,3  | 86                  | 2         | 6,8  | 0,746    |
| Trastornos Hipertensivos     | 91            | 8         | 8,8  | 88                  | 6         | 6,8  | 0.831    |
| Via del parto                | 91            |           |      | 89                  |           |      | 0.080    |
| Vaginal                      |               | 71        | 78,0 |                     | 58        | 65,2 |          |
| Cesarea                      |               | 20        | 22,0 |                     | 31        | 34,8 |          |

El valor *p* fue calculado con la prueba de  $\chi^2$  corregido.

La suplementación múltiple durante el embarazo con vitaminas y oligoelementos como los suministrados en este estudio, han mostrado reducir la incidencia de bajo peso al nacer para la edad gestacional en poblaciones con deficiencias nutricionales<sup>367</sup>. A pesar de esto, este tipo de intervenciones no han mostrado un impacto significativo sobre la duración de la gestación y la talla al nacer<sup>368</sup>. Con respecto a los resultados de este estudio, hay que considerar que el tamaño de muestra fue calculado sobre la premisa de detectar cambios en la función endotelial materna, por lo tanto no se esperaba alcanzar a detectar efectos antropométricos por la intervención. Sin embargo, durante el análisis estadístico se encontró un aumento en el Índice Ponderal (IP), en los recién nacidos del grupo suplementado con antioxidantes. El IP es considerado un indicador antropométrico fetal que tiene en cuenta tanto el peso como la talla y tradicionalmente ha sido empleado para identificar el crecimiento intrauterino simétrico o asimétrico<sup>369</sup>. Así, un IP bajo indica un crecimiento asimétrico, es decir que la talla es relativamente mayor para su peso. Este parámetro también ha mostrado tener una fuerte relación positiva principalmente hasta la semana

37 de gestación<sup>370</sup>. Aunque en nuestro estudio la edad gestacional tuvo una tendencia a ser mayor en el grupo tratado con antioxidantes esta no fue significativa ( $p=0.443$ ), por lo que este factor es poco probable que explique la diferencia encontrada. El análisis por sexo mostró que la diferencia encontrada entre los grupos se debe principalmente a la diferencia de IP en los recién nacidos del sexo masculino.

No es claro, si este efecto de la intervención sobre el IP se debe a la acción antioxidante de los micronutrientes suministrados o al bajo porcentaje de adecuación nutricional de micronutrientes que desde el inicio del estudio fueron encontradas en la población de primigestantes y que posiblemente con la suplementación pudieron mejorar el crecimiento fetal evidenciándose en un mayor IP. Aun menos fácil es explicar porque el efecto fue dependiente del sexo masculino, todos estos aspectos reservan futuros estudios en el tema.

## FORTALEZAS Y DEBILIDADES DEL ESTUDIO

### Fortalezas

**Selección de la muestra:** Las participantes reclutadas en este estudio fueron seleccionadas por criterios de inclusión y exclusión estrictos que permitieron asegurar primigestantes saludables con un bajo riesgo para el desarrollo de enfermedades propias del embarazo que afectaran las variables resultado del estudio. El método de aleatorización permitió que los grupos fueran homogéneos desde su asignación a cada intervención. Esto permitió disminuir el ruido asociado a covariables que pudieran estar asociadas a los efectos de la intervención.

**Nuevo conocimiento:** Este es el primer reporte del hallazgo de que el consumo crónico durante la gestación de un multivitamínico con micronutrientes antioxidantes, atenúa significativamente la vasodilatación dependiente de endotelio en el tercer trimestre. Este hallazgo no solo tiene una considerable importancia para las políticas de salud nutricional de las embarazadas, sino que reserva futuras investigaciones en el área de ciencias básicas y clínicas de la fisiología vascular del embarazo. Adicionalmente este estudio encontró que la ingesta de micronutrientes antioxidantes se relaciona con cambios epigénéticos a nivel de la expresión de ARNs largos no codificantes como MEG3 y MEG8 e incluso cambios en el nivel de metilación de promotores como el gen de leptina. También es relevante destacar la mayor producción de  $\text{NO}^*$ , Nrf2 y PGC1A, encontrada *in vitro* en las células endoteliales de neonatos cuyas madres fueron asignadas al grupo suplementado.

**Técnicas del estudio:** La estandarización e implementación de técnicas de laboratorio por HPLC permitió la detección específica de biomoléculas como el  $\text{NO}^*$ , el anión superóxido y el MDA con una mayor sensibilidad que otros métodos convencionales.

## **Debilidades**

**Biomarcador de estrés oxidativo y adherencia al tratamiento:** A pesar de que inicialmente se propuso medir F-2 isoprostanos como biomarcador de estrés oxidativo, no se pudo contar con los recursos técnicos apropiados para su cuantificación por GC-masas. En su defecto se decidió utilizar el MDA, también biomarcador de lipoperoxidación lipídica menos sensible para detectar cambios durante intervenciones nutricionales y su medición fue estandarizada por HPLC en nuestro laboratorio.

**La adherencia al tratamiento:** Aunque se logró determinar por autoreporte, para tener una aproximación más objetiva a esta variable idealmente se hubiese medido un biomarcador de consumo para contrastar lo autoreportado.

**Número de determinaciones:** Aunque fue posible tener el número de mediciones requerido en la mayoría de variables maternas, el número de análisis para otras variables de interés fue limitado, ya que se analizaron muestras de mujeres que presentaron la mayor adherencia al tratamiento.

## CONCLUSIONES

El estrés oxidativo se considera un factor de riesgo para el desarrollo de disfunción endotelial al reducir la biodisponibilidad del óxido nítrico y activar vías de señalización que promueven inflamación, apoptosis y senescencia celular. Por esta razón se ha propuesto que el consumo de antioxidantes en la dieta puede ser una alternativa para proteger la función del endotelio y promover una buena salud vascular.

El incremento fisiológico de biomarcadores de estrés oxidativo ha sido encontrado durante la progresión de la gestación y han sido relacionados con diferentes enfermedades del embarazo (RCIU, preeclampsia, diabetes gestacional), lo que ha llevado a considerar a los RLO como parte de la fisiopatología de estas enfermedades. Diferentes estudios han usado la suplementación con antioxidantes en poblaciones de gestantes con características muy heterogéneas, con el propósito principal de prevenir el desarrollo de varias de estas patologías con resultados inconsistentes. A diferencia de estudios anteriores en el área de la suplementación durante el embarazo, en este estudio se evalúa el efecto de múltiples micronutrientes antioxidantes sobre la VMF una prueba sensible de la función endotelial en una población homogénea de primigestantes aparentemente saludables.

Contrario a lo esperado los resultados muestran que el consumo crónico del suplemento disminuye la función endotelial, esto puede llevar a considerar que el consumo prolongado y en dosis elevadas de antioxidantes puede convertirse en un factor de riesgo para desarrollar disfunción endotelial en embarazadas sanas. Una posible explicación que requiere comprobación experimental en el embarazo, es la intervención de especies reactivas del oxígeno como el  $H_2O_2$  en procesos vasculares como la vasodilatación. Esto además puede implicar que como parte del funcionamiento normal del endotelio se debe producir una cantidad apropiada de RLO, necesaria para la regulación de la función vascular, aunque la evidencia experimental en esta área en sujetos saludables es muy limitada.

A nivel epigenético en placenta, la suplementación se relacionó con cambios en la metilación del promotor de leptina y la disminución en la expresión de los lncRNAs MEG3 y MEG8. Para complementar estos resultados se tiene previsto determinar el estado de metilación del promotor de leptina a través de la secuenciación por masas y determinar el nivel de expresión del ARNm.

## PERSPECTIVAS

De este trabajo surgen nuevas preguntas de investigación como ¿Qué porcentaje de la VMF puede ser explicada por moléculas derivadas por RLO del endotelio? ¿Es este un mecanismo compensador propio de la gestación? ¿Este efecto de los antioxidantes es similar a nivel de la vasculatura placentaria? ¿Qué efectos tiene el uso prolongado de antioxidantes sobre el perfil transcripcional y proteico del endotelio?

Adicionalmente, hay que descartar como posible mecanismo de reducción de la expresión de MEG3 y MEG8 cambios en la metilación de las regiones DMRs, lo cual podría ayudar a plantear una explicación mecanicista para los resultados encontrados. Para este trabajo, la caracterización inmunohistoquímica de la densidad capilar del tejido placentario podría ayudar a determinar si la reducción de MEG3 y MEG8 está acompañada por cambios en la angiogénesis o formación de microvellocidades placentaria.

Aunque muy probablemente los cambios epigénéticos encontrados por la suplementación no se restringen solo a estos genes, explorar modificaciones adicionales requiere aproximaciones metodológicas que permitan detectar cambios epigénéticos globales como metilomas y/o transcriptomas, que a través de herramientas bioinformáticas disponibles permitan tener una visión más holística del efecto de la intervención.

Las diferencias a nivel del funcionamiento en cultivo de las células endoteliales neonatales también reservan futuros estudios, cómo; si estos cambios bioquímicos encontrados están relacionados con alteraciones epigénéticas estables, además de valorar si estas diferencias se mantienen *in vivo* en la vasculatura de los neonatos y cuales consecuencias vasculares podrían representar en un futuro. Para responder estas preguntas es necesario plantear estudios de seguimiento tipo cohorte (se viene realizando) a los hijos de las madres participantes del estudio, donde puedan ser valorados periódicamente para detectar cambios que sean clínicamente relevantes en esta población.

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> **OMS, Informe sobre la salud en el mundo 2002:** Reducir los riesgos y promover una vida sana. 2002, Organización Mundial de la Salud: Ginebra.
- <sup>2</sup> **Gaziano TA.** Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. *Circulation*. 2005;112(23):3547-53.
- <sup>3</sup> **Barker, D.** Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995; 311: 171-174.
- <sup>4</sup> **Huxley R, Shiell, Law C.** The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure; a Systematic review of the literature. *J Hypertens*. 2000; 18: 815-831.
- <sup>5</sup> **Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO.** The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet*. 2005; 1:R139-47.
- <sup>6</sup> **Maria do Carmo P, Franco et al.** Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res*. 2002; 56: 145–53.
- <sup>7</sup> **Kinlay S, Ganz P.** Relation between endothelial dysfunction and the acute coronary syndrome: implications for therapy. *Am J Cardiol*. 2000; 86:10J– 13J.
- <sup>8</sup> **Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM.** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000; 101:1899 – 1906.
- <sup>9</sup> **Kim F, Pham M, Maloney E, Rizzo NO,.** Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1982-8.
- <sup>10</sup> **Dørup I, Skajaa K, Sørensen KE.** Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol*. 1999; 276:H821-5.
- <sup>11</sup> **Williams DJ, Vallance PJ, Neild GH, Spencer JA, Imms FJ.** Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *Am J Physiol*. 1997;272:H748-52.
- <sup>12</sup> **Khan F, Mires G, Macleod M, Belch JJ.** Relationship between maternal arterial wave reflection, microvascular function and fetal growth in normal pregnancy. *Microcirculation*. 2010;17:608-14.
- <sup>13</sup> **Elvan-Taspinar A, Franx A, Bots ML, Koomans HA, Bruinse HW.** Arterial stiffness and fetal growth in normotensive pregnancy. *Am J Hypertens*. 2005;18:337-41.

- 
- <sup>14</sup> **Veas CJ, Aguilera VC, Muñoz IJ, Gallardo VI, et al.** Fetal endothelium dysfunction is associated with circulating maternal levels of sE-selectin, sVCAM1, and sFlt-1 during pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24(11):1371-7.
- <sup>15</sup> **Martin H, Gazelius B & Norman M.** Impaired acetylcholine-induced vascular relaxation in low birthweight infants: implications for adult hypertension. *Pediatr Res.* 2000; 47: 457–462.
- <sup>16</sup> **Norman M & Martin H.** Preterm birth attenuates association between low birth weight and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2003; 108: 996–1001.
- <sup>17</sup> **Martin H, Hu J, Gennser G, Norman M.** Impaired endothelial function and increased carotid stiffness in 9-year-old children with low birthweight. *Circulation.* 2000; 102: 2739–2744.
- <sup>18</sup> **Goodfellow J, Bellamy MF, Gorman ST, Brownlee M, et al.** Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc Res.* 1998; 40: 600–606.
- <sup>19</sup> **Leeson CPM, Kattenhorn M, Morley R, Lucas A, Deanfield JE.** Impact of low birth weight and cardiovascular risk factors on endothelial function in early adult life. *Circulation.* 2001; 103:1264–1268.
- <sup>20</sup> **Ligi I, Simoncini S, Tellier E, Vassallo PF, et al.** A switch toward angiostatic gene expression impairs the angiogenic properties of endothelial progenitor cells in low birth weight preterm infants. *Blood.* 2011; 118(6):1699-709.
- <sup>21</sup> **Ozaki T, Hawkins P, Nishina H, Steyn C, Poston L, Hanson MA.** Effects of undernutrition in early pregnancy on systemic small artery function in late-gestation fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 183: 1301–1307.
- <sup>22</sup> **Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L, et al.** Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res.* 2003; 54: 1–7.
- <sup>23</sup> **Nishina H, Green LR, McGarrigle HHG, Noakes DE, Poston L, Hanson M.** Effect of nutritional restriction in early pregnancy on isolated femoral artery function in midgestation. fetal sheep. *J Physiol.* 2003;553: 637–647
- <sup>24</sup> **Williams SJ, Hemmings DG, Mitchell JM, McMillen IC, Davidge ST.** Effects of maternal hypoxia or nutrient restriction during pregnancy on endothelial function in adult male rat offspring. *J Physiol.* 2005;565:125-135.
- <sup>25</sup> **Andersen MR, Walker LR, Stender S.** Reduced endothelial nitric oxide synthase activity and concentration in fetal umbilical veins from maternal cigarette smokers. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191:346 –351.

- 
- <sup>26</sup> **O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC.** Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* .2004; 287: E863-E870.
- <sup>27</sup> **Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L.** Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol*.2001; 530:141–152.
- <sup>28</sup> **Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, et al.** Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res*.2003; 54:1–7.
- <sup>29</sup> **Franco MC, Dantas AP, Akamine EH, Kawamoto EM, et al.** Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol*.2002; 40:501–509.
- <sup>30</sup> **Franco MC, Akamine EH, Rebouças N, Carvalho MH, et al.** Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: implications of oxidative stress. *Life Sci*. 2007; 80:709-15.
- <sup>31</sup> **Casanello P, Krause B, Torres E, Gallardo V, et al.** Reduced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. *Placenta*. 2009; 30:625-33.
- <sup>32</sup> **Casanello P, Sobrevia L.** Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems y+/hCAT-1 and y+/hCAT-2B and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*.2002 ;91:127-134.
- <sup>33</sup> **Rodford JL, Torrens C, Siow RC, Mann GE, et al** Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. *J Physiol*. 2008; 586:4709-4720.
- <sup>34</sup> **Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, et al** Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension*. 2004; 44: 935–43.
- <sup>35</sup> **Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, et al.** Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res*. 2008; 102:95–102.
- <sup>36</sup> **Ryoo S, Lemmon C, Soucy K, Gupta G, White A, et al.** OxLDL-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired NO signaling. *Circ Res*. 2006; 99:951–960.
- <sup>37</sup> **Li H, Meininger CJ, Hawker JR, et al.** Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline synthesis in endothelial cells. *A J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280: E75–82.

- 
- <sup>38</sup> **Prieto CP, Krause BJ, Sobrevi LP, Casanello.** Down regulation of eNOS activity in hypoxia is regulated by arginase II in human umbilical vein endothelial cells. *J Dev Orig Health Dis.* 2009; 1:197-198.
- <sup>39</sup> **Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST.** Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2010; 85(1):194-203.
- <sup>40</sup> **Mann GE, Rowlands DJ, Li FY, de WP, Siow RC.** Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. *Cardiovasc Res.* 2007; 75:261–274.
- <sup>41</sup> **Chan JY, Kwong M.** Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 517: 19–26.
- <sup>42</sup> **Xue M, Qian Q, Antonysunil A, Rabbani N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ.** Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. *Diabetes.* 2008; 57:2809–2817.
- <sup>43</sup> **Warabi E, Takabe W, Minami T, Inoue K, Itoh K, et al.** Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2007;42: 260–269.
- <sup>44</sup> **Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M.** PGC-1 $\alpha$  regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2005; 66:562-573.
- <sup>45</sup> **Ali F, Ali NS, Bauer A, Boyle JJ, Hamdulay SS, et al.** PPAR $\delta$  and PGC1 $\alpha$  act cooperatively to induce haem oxygenase-1 and enhance vascular endothelial cell resistance to stress. *Cardiovasc Res.* 2010; 85:701-10.
- <sup>46</sup> **Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, et al.** Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte specific secretory protein adiponectin. *Diabetes.* 2003; 52(2): 268–276.
- <sup>47</sup> **Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF.** Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem.* 2002;277:29359–29362.
- <sup>48</sup> **Okui H, Hamasaki S, Ishida S, Kataoka T, et al.** Adiponectin is a better predictor of endothelial function of the coronary artery than HOMA-R, body mass index, immunoreactive insulin, or triglycerides. *Int J Cardiol.* 2008; 126(1):53-61.

- 
- <sup>49</sup> **Torigoe M, Matsui H, Ogawa Y, Murakami H, et al.** Impact of the high-molecular-weight form of adiponectin on endothelial function in healthy young men. *Clin Endocrinol.* 2007 ;67(2):276-81.
- <sup>50</sup> **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, et al.** Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999;100(25):2473-6.
- <sup>51</sup> **Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, et al.** Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 2003;107(5):671-4.
- <sup>52</sup> **Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K.** Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia.* 2003;46(11):1543-9.
- <sup>53</sup> **Plant S, Shand B, Elder P, Scott R.** Adiponectin attenuates endothelial dysfunction induced by oxidised low-density lipoproteins. *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5(2):102-8.
- <sup>54</sup> **Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, Fuchsel L, et al** Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes.* 2006;55(6):1840-6.
- <sup>55</sup> **Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ.** Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidised LDL *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 315:264-71.
- <sup>56</sup> **Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, et al.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 1997; 3:1029–33.
- <sup>57</sup> **Highman TJ, Friedman JE, Huston LP, Wong WW, Catalano PM.** Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178:1010–1015.
- <sup>58</sup> **Sitras V, Paulssen RH, Grønaas H, Leirvik J, et al.** Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta.* 2009;30(5):424-33.
- <sup>59</sup> **Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN Jr, et al.** Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(1):H48-56.
- <sup>60</sup> **Fruhbeck G.** Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes.* 1999; 48: 903–8.
- <sup>61</sup> **Nakagawa K, Higashi Y, Sasaki S, Oshima T, et al.** Leptin causes vasodilation in humans. *Hypertens Res.* 2002; 25: 161–5.

- 
- <sup>62</sup> **Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, et al.** Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 2000; 49(2):293-7.
- <sup>63</sup> **Matsuda K, Teragawa H, Fukuda Y, Nakagawa K, et al.** Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. *Hypertens Res*. 2003; 26(2):147-52.
- <sup>64</sup> **Sahin AS, Bariskaner H.** The mechanisms of vasorelaxant effect of leptin on isolated rabbit aorta. *Fund Clin Pharmacol*. 2007; 21: 595–600.
- <sup>65</sup> **Kimura K, Tsuda K, Baba A et al.** Involvement of nitric oxide in endothelium- dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273: 745–9.
- <sup>67</sup> **Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ, Briley A, Hunt BJ, et al.** Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in Indices of oxidative stress and placental function. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187(3):777-84.
- <sup>68</sup> **Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EM, et al.** LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis* 2004; 177:391–399.
- <sup>69</sup> **Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, et al.** Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci*. 2004;106:93-98.
- <sup>70</sup> **Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G.** Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet*. 2003; 267:189-95.
- <sup>71</sup> **Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F.** Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol*. 2002; 7:609-613.
- <sup>72</sup> **Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S.** F(2)-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. *Free Radic Res*. 2009; 43:546-52.
- <sup>73</sup> **Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, Croft KD, Walters BN, Michael CA.** Plasma and urinary 8-isoprostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy. *Clin Sci*; 1996; 91:711–718.
- <sup>74</sup> **Harsem NK, Braekke K, Staff AC.** Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2005; 128:209–215.
- <sup>75</sup> **Wang CN, Chen JY, Sabu S, Chang YL, et al.** Elevated amniotic fluid F(2)-isoprostane: A potential predictive marker for preeclampsia. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50:1124-30.

- 
- <sup>76</sup> **Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE.** Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta*. 2004; 25:78-84.
- <sup>77</sup> **Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I.** Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta*. 2006; 27:327-332.
- <sup>78</sup> **Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I.** Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest*. 2007; 64:187-192.
- <sup>80</sup> **Rajasingam D, Seed PT, Briley AL, Shennan AH, Poston L.** A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 200:395.e1-395.e9.
- <sup>81</sup> **Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, et al.** Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol*. 2005; 19: 487–492.
- <sup>82</sup> **Min J, H. Park, Park H, Kim YJ, et al.** Paraoxonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: relationship with maternal oxidative stress and neonatal birthweights, *Reprod Toxicol* . 2006; 22:418–424.
- <sup>83</sup> **Min J, Park B, Kim YJ, Lee H, Ha E, Park H.** Effect of oxidative stress on birth sizes: consideration of window from mid pregnancy to delivery. *Placenta*. 2009; 30:418-23.
- <sup>84</sup> **Myatt L, Kossenjans W, Sahay R, Eis A, Brockman D.** Oxidative stress causes vascular dysfunction in the placenta. *JMatern Fetal Neonatal Med*. 2000;9: 79–82.
- <sup>85</sup> **Hong J, Park EA, Kim YJ, Lee HY, et al.** Association of antioxidant vitamins and oxidative stress levels in pregnancy with infant growth during the first year of life. *Public Health Nutr*. 2008; 11:998-1005.
- <sup>86</sup> **Lee BE, Hong YC, Lee KH, Kim YJ, et al.** Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. *Eur J Clin Nutr*.2004; 58:1365-71.
- <sup>87</sup> **Hracsko Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS.** Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. *Redox Rep*. 2008; 13:11-6.
- <sup>88</sup> **Saker M, Soulimane Mokhtari N, Merzouk SA, et al.** Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 141:95-9.
- <sup>89</sup> **Arikan S, Konukoglu D, Arikan C, Akcay T, Davas I.** Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol Obstet Invest*. 2001; 51:145–9.

- 
- <sup>90</sup> **Howlader MZ, Parveen S, Tamanna S, Khan TA, Begum F.** Oxidative stress and antioxidant status in neonates born to pre-eclamptic mother. *J Trop Pediatr.* 2009; 55:363-7.
- <sup>91</sup> **Peterside IE, Selak MA, Simmons RA.** Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria of growth retarded rats alters glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* ; 2003; 285: E1258–E1264.
- <sup>92</sup> **Rodford JL, Torrens C, Siow RC, Mann GE, Hanson MA, Clough GF.** Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. *J Physiol.* 2008; 586:4709-20.
- <sup>93</sup> **Franco Mdo C, Dantas AP, Akamine EH, Kawamoto EM et al.** Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 40:501-9.
- <sup>94</sup> **Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG.** Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288:R91-96
- <sup>95</sup> **Liang C, Oest ME, Prater MR.** Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2009; 86:377-84.
- <sup>96</sup> **Racasan S, Braam B, van der Giezen DM, Goldschmeding R, et al.** Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2004; 44: 83–88.
- <sup>97</sup> **Franco Mdo C, Akamine EH, Aparecida de Oliveira M, Fortes ZB, et al.** Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42:211-217.
- <sup>98</sup> **Cambonie G, Comte B, Yzydorczyk C, Ntimbane T, et al.** Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292(3):R1236-45.
- <sup>99</sup> **Chappell LC, Seed PT, Briley AL, et al.** Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet.* 1999; 354:810–816.
- <sup>100</sup> **Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH.** Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2006; 367:1145-54.

- 
- <sup>101</sup> **Villar J, Purwar M, Merialdi M, Zavaleta N, et al.** World Health Organisation multicentre randomised trial of supplementation with vitamins C and E among pregnant women at high risk for pre-eclampsia in populations of low nutritional status from developing countries. *BJOG*. 2009; 116:780-788.
- <sup>102</sup> **Milczarek R, Klimek J, Zelewski L.** The effects of ascorbate and alpha-tocopherol on the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Mol Cell Biochem*. 2000; 210:65-73.
- <sup>103</sup> **Hung TH, Chen SF, Li MJ, Yeh YL, Hsieh TT.** Differential effects of concomitant use of vitamins C and E on trophoblast apoptosis and autophagy between normoxia and hypoxia-reoxygenation. *PLoS One*. 2010; 5:e12202.
- <sup>104</sup> **Aris A, Leblanc S, Ouellet A, Moutquin JM.** Detrimental effects of high levels of antioxidant vitamins C and E on placental function: considerations for the vitamins in preeclampsia (VIP) trial. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008; 34:504-11.
- <sup>105</sup> **Gallo C, Renzi P, Loizzo S, Loizzo A, Piacente S, et al.** Potential therapeutic effects of vitamin E and C on placental oxidative stress induced by nicotine: an in vitro evidence. *Open Biochem J*. 2010; 4:77-82.
- <sup>106</sup> **Podmore I, Griffiths HR, Herbert KE, et al.** Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998; 392:559.
- <sup>107</sup> **Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, et al.** Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104:8749-8755.
- <sup>108</sup> **Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschutter A, Beisiegel U.** Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 1996; 37:1436-1448.
- <sup>109</sup> **Hajiani M, Golestani A, Shariftabrizi A, Rastegar R, et al.** Dose-dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. *Redox Rep*. 2008; 13:60-6.
- <sup>110</sup> **Pearson P, Lewis SA, Britton J, Young IS, Fogarty A.** The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo. *BioDrugs*. 2006; 20:271-273.
- <sup>111</sup> **Ahn YM, Kim YJ, Park H, Park B, Lee H.** Prenatal vitamin C status is associated with placental apoptosis in normal-term human pregnancies. *Placenta*. 2007 ; 28:31-38.

- 
- <sup>112</sup> **Preziosi P, Galan P, Herbeth B, Valeix P, et al.** Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators and markers of the antioxidant system in adult subjects. *J Am Coll Nutr.* 1998; 17:244-249.
- <sup>113</sup> **Arnaud J, Bost M, Vitoux D, Labarère J, et al.** Effect of low dose antioxidant vitamin and trace element supplementation on the urinary concentrations of thromboxane and prostacyclin metabolites. *J Am Coll Nutr.* 2007; 26(5):405-411.
- <sup>114</sup> **Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T.** The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2003; 278:4035–4040.
- <sup>115</sup> **Antequera F, Bird A.** Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:11995–11999.
- <sup>116</sup> **Reik W.** Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 2007; 447: 425–432
- <sup>117</sup> **Zee BM, Levin RS, Dimaggio PA, et al.** Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells. *Epigenetics Chromatin.* 2010; 3(1):22.
- <sup>118</sup> **Cerda S, Weitzman SA.** Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat Res.* 1997; 386:141–152.
- <sup>119</sup> **Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC.** Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:4100–4108.
- <sup>120</sup> **Turk PW, Laayoun A, Smith SS, Weitzman SA.** DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase, *Carcinogenesis.* 1995; 16:1253–1255.
- <sup>121</sup> **Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, et al.** Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia.* 2007; 9:1111-1121.
- <sup>122</sup> **Kasai H.** Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.* 1997;387(3) :147-63,
- <sup>123</sup> **Akatsuka S, Aung TT, Dutta KK, et al.** Contrasting genome-wide distribution of 8-hydroxyguanine and acrolein-modified adenine during oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1328-42.

- 
- <sup>124</sup> **Lim SO, Gu JM, Kim MS, Kim HS, et al.** Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology*. 2008 ;135:2128-40.
- <sup>125</sup> **Min JY, Lim SO, Jung G.** Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett*. 2010;584(11):2427-32.
- <sup>126</sup> **Hong J, Resnick M, Behar J, Wang LJ, Wands J, et al.** Acid-induced p16 hypermethylation contributes to development of esophageal adenocarcinoma via activation of NADPH oxidase NOX5-S. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G697-706.
- <sup>127</sup> **O'Hagan HM, Wang W, Sen S, Destefano Shields C, et al.** Oxidative Damage Targets Complexes Containing DNA Methyltransferases, SIRT1, and Polycomb Members to Promoter CpG Islands. *Cancer Cell*. 2011; 20(5):606-19.
- <sup>128</sup> **Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO.** The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet*. 2005; 1:R139-47.
- <sup>129</sup> **Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R.** The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* .2000; 39:13005 – 13011.
- <sup>130</sup> **Day RM, Suzuki YJ, Fanburg BL.** Regulation of glutathione by oxidative stress in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2003; 5:699-704.
- <sup>131</sup> **Lertratanangkoon K, Orkiszewski RS, Scimeca JM.** Methyl-donor deficiency due to chemically induced glutathione depletion. *Cancer Res*. 1996; **56**:995–1005.
- <sup>132</sup> **Lertratanangkoon K, Wu CJ, Savaraj N, Thomas ML.** Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. *Cancer Lett*. 1997; 120:149-56.
- <sup>133</sup> **Avila MA, Carretero MV, Rodriguez EN, Mato JM.** Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1998; 114: 364–371.
- <sup>134</sup> **Corrales FJ, Perez-Mato I, Sanchez Del Pino MM, et al.** Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr*. 2002; 132:2377S–2381S.
- <sup>135</sup> **Fryer AA, Emes RD, Ismail KM, Haworth KE, et al.** Quantitative, high-resolution epigenetic profiling of CpG loci identifies associations with cord blood plasma homocysteine and birth weight in humans. *Epigenetics*. 2011; 6:86-94.

- 
- <sup>136</sup> **Rao X, Zhong J, Zhang S, Zhang Y, et al.** Loss of methyl-CpG-binding domain protein 2 enhances endothelial angiogenesis and protects mice against hind-limb ischemic injury. *Circulation*. 2011;123(25):2964-74.
- <sup>137</sup> **Vertuani S, Angusti A, Manfredini S.** The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*. 2004; 10:1677-94.
- <sup>138</sup> **Lillycrop KA, Rodford J, Garratt ES, Slater-Jefferies et al.** Maternal dietary exposure during pregnancy induces specific changes in the hepatic transcriptome of the adult offspring. *J DOHaD*. 2009; S186.
- <sup>139</sup> **Morris TJ, Vickers M, Gluckman P, Gilmour S, Affara N.** Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the developmental variations in metabolic traits. *PLoS One*. 2009 29; 4:e7271.
- <sup>140</sup> **Chawla RK, Watson WH, Jones DP.** Effect of hypoxia on hepatic DNA methylation and tRNA methyltransferase in rat: similarities to effects of methyl-deficient diets. *J Cell Biochem* 1996; 61:72-80.
- <sup>141</sup> **Patterson AJ, Xiao D, Xiong F, Dixon B, Zhang L.** Hypoxia-derived oxidative stress mediates epigenetic repression of PKC $\epsilon$  gene in foetal rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2012; 93(2):302-10.
- <sup>142</sup> **Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL.** Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics*. 2007;2(2):119-25.
- <sup>143</sup> **Ke X, Lei Q, James SJ, Kelleher SL, et al.** Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats. *Physiol Genomics*. 2006; 13;25(1):16-28.
- <sup>144</sup> **Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA.** Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest*. 2008; 118:2316-24.
- <sup>145</sup> **Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, et al.** Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105:17046-17049.
- <sup>146</sup> **Stein AD, Zybert PA, van de Bor M, Lumey LH.** Intrauterine famine exposure and body proportions at birth: The Dutch Hunger Winter. *Int J Epidemiol*. 2004; 33:831–836.
- <sup>147</sup> **Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, et al.** DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet*. 2009; 18:4046-53.

- 
- <sup>148</sup> **Khulan B, Cooper WN, Skinner BM, Bauer J, et al.** Periconceptional maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia. *Hum Mol Genet.* 2012. 21(9):2086-101.
- <sup>149</sup> **Cooper WN, Khulan B, Owens S, Elks CE, et al.** DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *FASEB J.* 2012.26(5):1782-90.
- <sup>150</sup> **Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T.** Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489:101-8.
- <sup>151</sup> **Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, et al.** The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012; 22(9):1775-89.
- <sup>152</sup> **Guttman M, Rinn JL.** Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature.* 2012; 482(7385):339-4.
- <sup>153</sup> **Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, et al.** Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(28):11667-72.
- <sup>154</sup> **Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, et al.** Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011; 25:1915–1927.
- <sup>155</sup> **Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, et al.** Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell.* 2004;116(4):499-509.
- <sup>156</sup> **Wu SC, Kallin EM, Zhang Y.** Role of H3K27 methylation in the regulation of lncRNA expression. *Cell Res.* 2010; 20(10):1109-16.
- <sup>157</sup> **Sati S, Ghosh S, Jain V, Scaria V, Sengupta S.** Genome-wide analysis reveals distinct patterns of epigenetic features in long non-coding RNA loci. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(20):10018-31.
- <sup>158</sup> **Santoro F, Mayer D, Klement RM, Warczok KE, et al.** Imprinted Igf2r silencing depends on continuous Airn lncRNA expression and is not restricted to a developmental window. *Development.* 2013;140(6):1184-95.
- <sup>159</sup> **Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM.** Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic “imprinting” of neighboring genes. *Genes Dev.* 2006; 20(10):1268-82.

- 
- <sup>160</sup> **AP, Schildkraut JM, Soubry A, et al.** Associations between antibiotic exposure during pregnancy, birth weight and aberrant methylation at imprinted genes among offspring. *Int J Obes.* 2013; 37(7):907-13.
- <sup>161</sup> **Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, et al.** Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature.* 2002; 417:945–948.
- <sup>162</sup> **Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Keverne EB, et al.** Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nat Genet.* 1999; 8:163–169.
- <sup>163</sup> **Reik W, Constância M, Fowden A, Anderson N, et al.** Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol.* 2003;547:35-44.
- <sup>164</sup> **Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins MJ.** Regional loss of “imprinting” and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet.* 2002; 32(3):426-31.
- <sup>165</sup> **Soubry A, Murphy SK, Wang F, Huang Z, et al.** Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int J Obes.* 2013. DOI: 10.1038/ijo.2013.193
- <sup>166</sup> **Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A, Wang F, et al.** Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med.* 2013;11:29.
- <sup>167</sup> **Dunk CE, Roggensack AM, Cox B, Perkins JE, et al.** A distinct microvascular endothelial gene expression profile in severe IUGR placentas. *Placenta.* 2012; 33(4):285-93.
- <sup>168</sup> **Li D, Chen G, Yang J, Fan X, Gong Y.** Transcriptome analysis reveals distinct patterns of long noncoding RNAs in heart and plasma of mice with heart failure. *PLoS One.* 2013;8(10):e77938.
- <sup>169</sup> **Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, et al.** Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet.* 2006; 51:1087–1099.
- <sup>170</sup> **UNICEF and the Micronutrient Initiative.** Vitamin and mineral deficiencies: a global progress report. Ottawa (Canada): The Micronutrient Initiative; 2004.
- <sup>171</sup> **Block G, Abrams, B.** Vitamin and Mineral status of women of childbearing potential. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 678: 244-254.
- <sup>172</sup> **Seshadri S.** Prevalence of micronutrient deficiency particularly of iron, zinc and folic acid in pregnant women in South East Asia. *Br J Nutr.* 2001; 85:S87-S92.

- 
- <sup>173</sup> **Rao S, Yajnik CS, Kanade A, Fall CH, et al.** Intake of micronutrient-rich foods in rural Indian mothers is associated with the size of their babies at birth : Pune Maternal Nutrition Study. *J Nutr.* 2001; 131: 1217-1224.
- <sup>174</sup> **Osrin D, Vaidya A, Shrestha Y, Baniya RB, et al.** Effects of antenatal multiple micronutrient supplementation on birthweight and gestational duration in Nepal: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2005; 9463:955-962.
- <sup>175</sup> **Harris B.** Commentary: The child is father of the man. The relationship between child health and adult mortality in the 19th and 20th centuries. *Int J of Epidemiology.* 2000; 30:688-696.
- <sup>176</sup> **King JC.** Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2000; 7:1218S-1225S.
- <sup>177</sup> **Ashworth CJ, Antipatis C.** Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction.* 2001;122:527-35.
- <sup>178</sup> **Venu L, Harishankar N, Krishna TP, Raghunath M.** Does maternal dietary mineral restriction per se predispose the offspring to insulin resistance?. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151: 287-294.
- <sup>179</sup> **Venu L, Harishankar N, Krishna TP, Raghunath, M.** Maternal dietary vitamin restriction increases body fat content but not insulin resistance in WNIN rat offspring up to 6 months of age. *Diabetologia.* 2004; 47:1493-1501.
- <sup>180</sup> **Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E.** Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr.* 2009; 139:1626–1631.
- <sup>181</sup> **Oteiza P, Olin K, Fraga C, Keen C.** Zn deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr.* 1995; 125:823-829.
- <sup>182</sup> **Tomat AL, Inserra F, Veiras L, Vallone MC, et al.** Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 95:R543–R549.
- <sup>183</sup> **Tomat A, Elesgaray R, Zago V, Fasoli H, et al.** Exposure to zinc deficiency in fetal and postnatal life determines nitric oxide system activity and arterial blood pressure levels in adult rats. *Br J Nutr.* 2010; 104:382-389.
- <sup>184</sup> **Hennig B, Meerarani P, Toborek M, McClain CJ.** Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J Am Coll Nutr.* 1999;18:152-158.
- <sup>185</sup> **Tang ZL, Wasserloos K, St Croix CM, Pitt BR.** Role of zinc in pulmonary endothelial cell response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: L243–L249.

- 
- <sup>186</sup> **Cortese MM, Suschek CV, Wetzel W, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V.** Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44:2002-2012.
- <sup>187</sup> **Cortese-Krott MM, Suschek CV, Wetzel W, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V.** Nitric oxide-mediated protection of endothelial cells from hydrogen peroxide is mediated by intracellular zinc and glutathione. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296:C811-820.
- <sup>187</sup> **Tang K, Sham H, Hui E, Kirkland JB.** Niacin deficiency causes oxidative stress in rat bone marrow cells but not through decreased NADPH or glutathione status. *J Nutr Biochem;* 2008; 19:746-53.
- <sup>189</sup> **Claudia A. Benavente , Elaine L. Jacobson.** Niacin restriction upregulates NADPH oxidase and reactive oxygen species (ROS) in human keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44:527-537.
- <sup>190</sup> **Kamat JP, Devasagayam TP.** Nicotinamide (vitamin B-3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria. *Redox Rep.* 1999; 4:179–184.
- <sup>191</sup> **Chong ZZ, Lin SH, Li F, Maiese K.** The sirtuin inhibitor nicotinamide enhances neuronal cell survival during acute anoxic injury through Akt, Bad, PARP, and mitochondrial associated "anti-apoptotic" pathways. *Curr Neurovasc Res.* 2005; 2:271–285.
- <sup>192</sup> **Kamat JP, Devasagayam TP.** Methylene blue plus light-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: inhibition by nicotinamide (vitamin B3) and other antioxidants. *Chem Biol Interact.* 1996; 99:1-16.
- <sup>193</sup> **Abdallah DM.** Nicotinamide alleviates indomethacin-induced gastric ulcers: a novel anti ulcer agent. *Eur J Pharmacol.* 2010; 627:276–80.
- <sup>194</sup> **Chen YH, Wang MF, Liao JW, Chang SP, Hu ML.** Beneficial effects of nicotinamide on alcohol-induced liver injury in senescence-accelerated mice. *Biofactors.* 2008; 34:97–107.
- <sup>195</sup> **Chong ZZ, Lin SH, Maiese K.** The NAD<sup>+</sup> precursor nicotinamide governs neuronal survival during oxidative stress through protein kinase B coupled to FOXO3a and mitochondrial membrane potential. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004; 24:728–743.
- <sup>196</sup> **Maiese K.** Triple play: promoting neurovascular longevity with nicotinamide, WNT, and erythropoietin in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2008; 62:218–32.
- <sup>197</sup> **Pietrzak L, Mogielnicki A, Buczek W.** Nicotinamide and its metabolite N-methylnicotinamide increase skin vascular permeability in rats. *Clin Exp Dermatol.* 2009; 34:380–384.

- 
- <sup>198</sup> **Lappas M, Permezel M.** The anti-inflammatory and antioxidative effects of nicotinamide, a vitamin B(3) derivative, are elicited by FoxO3 in human gestational tissues: implications for preterm birth. *J Nutr Biochem.* 2011;22(12):1195-201.
- <sup>199</sup> **Da Rocha RF, de Oliveira MR, Schonhofen P, De Bastiani MA, et al.** Vitamin A supplementation for different periods alters rat vascular redox parameters. *J Physiol Biochem.* 2010; 66:351-357.
- <sup>200</sup> **Ahlemeyer B, Bauerbach E, Plath M, Steuber M, et al.** Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30:1067-1077.
- <sup>201</sup> **Gatica L, Alvarez S, Gomez N, Zago MP, et al.** Vitamin A deficiency induces prooxidant environment and inflammation in rat aorta. *Free Radic Res.* 2005; 39:621–628
- <sup>202</sup> **Gatica L, Vega V, Zurulnik F, Oliveros L, Giménez MS.** Alterations in lipid metabolism of rat aorta. Effects of vitamin A deficiency. *J Vasc Res.* 2006; 43:602–610
- <sup>203</sup> **Antipatis C, Ashworth CJ, Riley SC., Hannah L, et al.** Vitamin A Deficiency During Rat Pregnancy Alters Placental TNF- $\alpha$  Signalling and Apoptosis. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47:151-158.
- <sup>204</sup> **Antipatis C, Grant G, Ashworth CJ.** Moderate maternal vitamin A deficiency affects perinatal organ growth and development in rats. *Br J Nutr.* 2000; 84:125–132.
- <sup>205</sup> **Lewin MH, Arthur JR, Riemersma RA, Nicol F, et al.** Selenium supplementation acting through the induction of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase protects the human endothelial cell line EAhy926 from damage by lipid hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1593:85-92.
- <sup>206</sup> **Miller S, Walker SW, Arthur JR, Nicol F, et al.** Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. *Clin Sci.* 2001; 100:543-550.
- <sup>207</sup> **Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Den Hond E, et al.** Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. *Eur Heart J.* 2007; 28(5):628-33.
- <sup>208</sup> **Laclaustra M, Navas-Acien A, Stranges S, Ordovas JM, Guallar E.** Serum selenium concentrations and hypertension in the US Population. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2009;2(4):369-76
- <sup>209</sup> **Reed JJ, Ward MA, Vonnahme KA, Neville TL, et al.** Effects of selenium supply and dietary restriction on maternal and fetal body weight, visceral organ mass and cellularity estimates, and jejunal vascularity in pregnant ewe lambs. *J Anim Sci.* 2007; 85:2721-2733.

- 
- <sup>210</sup> **Lekatz LA, Ward MA, Borowicz PP, Taylor JB, et al.** Cotyledonary responses to maternal selenium and dietary restriction may influence alterations in fetal weight and fetal liver glycogen in sheep. *Anim Reprod Sci.* 2010; 117:216-25.
- <sup>211</sup> **Tan M, Sheng L, Qian Y, Ge Y, et al.** Changes of serum selenium in pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 83:231-7.
- <sup>212</sup> **Mihailović M, Cvetković M, Ljubić A, Kosanović M, et al.** Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol Trace Elem Res.* 2000; 73:47-54.
- <sup>213</sup> **Rayman MP, Wijnen H, Vader H, Kooistra L, Pop V.** Maternal selenium status during early gestation and risk for preterm birth. *CMAJ.* 2011; 183:549-55.
- <sup>214</sup> **Mistry HD, Wilson V, Ramsay MM, Symonds ME, Broughton Pipkin F.** Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. *Hypertension.* 2008 ; 52:881-888.
- <sup>215</sup> **Plantinga Y, Ghiadoni L, Magagna A, Giannarelli C, et al.** Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2007 20:392-397.
- <sup>216</sup> **Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, et al.** Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation.* 2003; 108:1059-63.
- <sup>217</sup> **Skyrme-Jones RA, O'Brien RC, Berry KL, Meredith IT.** Vitamin E supplementation improves endothelial function in type I diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36:94-102.
- <sup>218</sup> **Rodríguez JA, Grau A, Eguinoa E, Nespereira B, et al.** Dietary supplementation with vitamins C and E prevents downregulation of endothelial NOS expression in hypercholesterolemia in vivo and in vitro. *Atherosclerosis.* 2002; 165:33-40.
- <sup>219</sup> **Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Gutiérrez-Castrellón P, et al.** Ensayos clínicos aleatorizados: variantes, métodos de aleatorización, análisis, consideraciones éticas y regulación. *Salud pública de México.* 2004;46:559-84.
- <sup>220</sup> **Friedman L, Furberg C, DeMets D.** Fundamentals of Clinical Trials. 3rd Edition. New York: Springer, 1998.
- <sup>221</sup> **Dupont WD, Plummer WD.** Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program. *Control Clin Trials.* 1990; 11:116-28.

- 
- <sup>222</sup> **National Research Council (US) Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs.** Recommended dietary allowances. Washington, DC: National Academy Press, 1989.
- <sup>223</sup> **Ross SM, Nel E, Naeye RL.** Differing effects of low and high bulk maternal dietary supplements during pregnancy. *Early Hum Dev.* 1985; 10: 295-302.
- <sup>224</sup> **Fawzi WW, Msamanga GI, Urassa W, Hertzmark E, Petraro P, Willett WC, Spiegelman D.** Vitamins and perinatal outcomes among HIV-negative women in Tanzania. *N Engl J Med.* 2007; 356(14):1423-31.
- <sup>225</sup> **American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).** Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period. *Obstet Gynecol.* 2002; 99:171–173.
- <sup>226</sup> **American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).** "Committee Opinion: Induced Abortion and Breast Cancer Risk." *Obstet Gynecol* 2002; 102:433-5.
- <sup>227</sup> **Villalobos-Alcázar G, Guzmán-Bárcenas J, Alonso-de la Vega P, Ortiz-Rodríguez V, Casanueva E.** Evaluación antropométrica del recién nacido. Variabilidad de los observadores. *Perinatol Reprod Hum.* 2002; 16: 74-9.
- <sup>228</sup> **ICBF.** Recomendaciones de consumo diario de calorías y nutrientes para la población colombiana. 1988.
- <sup>229</sup> **Durnin JV, Womersley J.** Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr.* 1974; 32(1):77-97.
- <sup>230</sup> **Siri, WE.** Body composition from fluid spaces and density. Analysis of methods. En: Techniques for Measuring Body Composition. *National Academy of Sciences, National Research Council.* 1961; 223-244.
- <sup>231</sup> **Pickering TG.** Recommendations for the use of home (self) and ambulatory blood pressure monitoring. American Society of Hypertension Ad HOC. *Am J Hypertens* .1996; 9:1-1.
- <sup>232</sup> **Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch WM, et al.** Non invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340: 1111-5.
- <sup>233</sup> **Correti CM, Anderson TJ.** Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial- dependent flow- mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 257-265.

- 
- <sup>234</sup> **Steghens JP, van Kappel AL, Denis I, Collombel C.** Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(2):242-9.
- <sup>235</sup> **Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M.** A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481-5.
- <sup>236</sup> **Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, et al.** Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem.* 1998 ;70:2446-53.
- <sup>237</sup> **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.. *Proc Natl Acad Sci .* 1979. 76 (9): 4350–4354.
- <sup>238</sup> **Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):671-5.
- <sup>239</sup> **Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, et al.** Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(11):1359-68.
- <sup>240</sup> **Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B.** Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat Protoc.* 2008; 3(1):8-21.
- <sup>241</sup> **Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL.** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012. 18;13:134.
- <sup>242</sup> **Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, et al.** IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 2008 ;36:W163-9.
- <sup>243</sup> **Sheskin D.** Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. *2<sup>nd</sup> edition.* 2000. Chapman & Hall/CRC.
- <sup>244</sup> **King JC.** Effect of reproduction on the bioavailability of calcium, zinc and selenium. *J Nutr.* 2001;131:1355S-8S.
- <sup>245</sup> **Vitolins MZ, Rand CS, Rapp SR, Ribisl PM, Sevick MA.** Measuring adherence to behavioral and medical interventions. *Control Clin Trials.* 2000 ;21(5 ):188S-94S.
- <sup>246</sup> **Nguyen P, Nava-Ocampo A, Levy A, O'Connor DL, et al.** Effect of iron content on the tolerability of prenatal multivitamins in pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2008; 8:17.

- 
- <sup>247</sup> **Holguín-Hernández E, Orozco-Díaz JG.** Administration of folic acid and other micronutrients to pregnant women in Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2013;34(2):99-106.
- <sup>248</sup> **Escudero LE, Parra-Sosa BE, Herrera –Mejia J, Zapata N.** Estado nutricional del hierro en gestantes adolescentes, Medellín, Colombia. *Revista Facultad Nacional De Salud Pública.* 2014; 32:72-82.
- <sup>249</sup> **Koch KL.** Gastrointestinal factors in nausea and vomiting of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 ;186(5):S198-203.
- <sup>250</sup> **Young SL, Blanco I, Hernandez-Cordero S, Peltó GH, Neufeld LM.** Organoleptic properties, ease of use, and perceived health effects are determinants of acceptability of micronutrient supplements among poor Mexican women. *J Nutr.* 2010; 140(3): 605-11.
- <sup>251</sup> **Jasti S, Siega-Riz AM, Cogswell ME, Hartzema AG, Bentley ME.** Pill count adherence to prenatal multivitamin/mineral supplement use among low-income women. *J Nutr.* 2005; 135(5):1093-101.
- <sup>252</sup> **Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, et al.** Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91, 1314–1319.
- <sup>253</sup> **Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G.** Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? *Hypertension.* 2011; 57:363–369.
- <sup>254</sup> **Mitchell GF, Parise H, Vita JA, Larson MG, et al.** Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension.* 2004; 44(2):134-9.
- <sup>255</sup> **Padilla J, Johnson BD, Newcomer SC, Wilhite DP, et al.** Adjusting flow-mediated dilation for shear stress stimulus allows demonstration of endothelial dysfunction in a population with moderate cardiovascular risk. *J Vasc Res.* 2009; 46(6):592-600.
- <sup>256</sup> **Quinton AE, Cook CM, Peek MJ.** A longitudinal study using ultrasound to assess flow-mediated dilatation in normal human pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 2007;26(3):273-81.
- <sup>257</sup> **Dørup I, Skajaa K, Sørensen KE.** Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol.* 1999; 276:H821-5.
- <sup>258</sup> **Takase B, Goto T, Hamabe A, Uehata A, et al.** Flow-mediated dilation in brachial artery in the second half of pregnancy and prediction of pre-eclampsia. *J Hum Hypertens.* 2003; 17(10):697-704.
- <sup>259</sup> **Atkinson G, Batterham AM.** Allometric scaling of diameter change in the original flow-mediated dilation protocol. *Atherosclerosis.* 2013;226(2):425-7.

- 
- <sup>260</sup> **Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi MA.** Meta-analysis on the efficacy and safety of combined vitamin C and E supplementation in preeclamptic women. *Hypertens Pregnancy*. 2009; 28(4):417-34.
- <sup>261</sup> **Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP, Hassan SS.** Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 204(6):503.e1-12.
- <sup>262</sup> **Wray DW, Uberoi A, Lawrenson L, Bailey DM, Richardson RS.** Oral antioxidants and cardiovascular health in the exercise-trained and untrained elderly: a radically different outcome. *Clin Sci*. 2009; 116(5):433-41.
- <sup>263</sup> **Donato AJ, Uberoi A, Bailey DM, Wray DW, Richardson RS.** Exercise-induced brachial artery vasodilation: effects of antioxidants and exercise training in elderly men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298(2):H671-8.
- <sup>264</sup> **Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, C, et al.** Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest*. 1994; 93(2):844-51.
- <sup>265</sup> **Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HM, Jones H, Thijssen DH.** Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension*. 2014 ;63(2):376-82.
- <sup>266</sup> **Wray DW, Witman MA, Ives SJ, McDaniel J, et al.** Does brachial artery flow-mediated vasodilation provide a bioassay for NO? *Hypertension*. 2013; 62(2):345-51.
- <sup>267</sup> **Okahara K, Sun B & Kambayashi J.** Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:1922–1926.
- <sup>268</sup> **Bellien J, Iacob M, Gutierrez L, Isabelle M, et al.** Crucial role of NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human sustained conduit arteryflow-mediated dilatation. *Hypertension*. 2006; 48(6):1088-94.
- <sup>269</sup> **Eskurza I, Monahan KD, Robinson JA, Seals DR.** Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human ageing. *J Physiol*. 2004; 556, 315–324.
- <sup>270</sup> **Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagn A, Salvetti A.** Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* .1998; 97: 2222–2229.

- 
- <sup>271</sup> **Faraci FM, Didion SP.** Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1367–1373.
- <sup>272</sup> **Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, et al.** Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. 2008. *J Exp Med* 205: 2053–2063.
- <sup>273</sup> **Larsen BT, Bubolz AH, Mendoza SA, Pritchard KA Jr, Gutterman DD.** Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 739–745.
- <sup>274</sup> **Wolin MS, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G.** Similarities in the pharmacological modulation of reactive hyperemia and vasodilation to hydrogen peroxide in rat skeletal muscle arterioles: effects of probes for endothelium-derived mediators. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990. 253: 508-512.
- <sup>275</sup> **Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, et al.** Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002. 283: H406-411.
- <sup>276</sup> **Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD.** Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res.* 2003; 92: e31-40.
- <sup>277</sup> **Liu Y, Bubolz AH, Mendoza S, Zhang DX, Gutterman DD.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circ Res.* 2011; 4:108(5):566-73.
- <sup>278</sup> **Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, et al.** Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1224–1230.
- <sup>279</sup> **Edwards DH, Li Y, Griffith TM.** Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(10):1774-81.
- <sup>280</sup> **Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, et al.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290:909–913
- <sup>281</sup> **Thomas SR, Chen K, Keaney JF.** Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277:6017–6024.
- <sup>282</sup> **Drummond GR., Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG.** Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res.* 2000; 86:347–354.

- 
- 283 **Martin A, Zulueta J, Hassoun P, Blumberg JB, Meydani M.** Effect of vitamin E on hydrogen peroxide production by human vascular endothelial cells after hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(1):99-105.
- 284 **Shimpuku H, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K.** Effect of vitamin E on the degradation of hydrogen peroxide in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* 2000; 68(3):353-9.
- 285 **Sellke FW, Simons M.** Angiogenesis in cardiovascular disease: current status and therapeutic potential. *Drugs.* 1999;58:391–396.
- 286 **Gotoh N, Niki E.** Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1115: 201–207.
- 287 **Nishikimi M.** Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 63:463–468.
- 288 **Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF.** Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res.* 1998; 83(9):916-22.
- 289 **Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(1):81-128.
- 290 **Griesser M, Boeglin WE, Suzuki T, Schneider C.** Convergence of the 5-LOX and COX-2 pathways: heme-catalyzed cleavage of the 5S-HETE-derived di-endoperoxide into aldehyde fragments. *J Lipid Res.* 2009; 50(12):2455-62.
- 291 **Esterbauer H, Cheeseman KH.** Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology.* 1990; 186: 407–421.
- 292 **Draper HH, McGirr LG, Hadley M.** The metabolism of malondialdehyde. *Lipids.* 21:305-307; 1986.
- 293 **Siu GM, Draper HH.** Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids.* 1982; 17:349-355.
- 294 **Dhanakoti, S N, Draper HH.** Response of urinary malondialdehyde to factors that stimulate lipid peroxidation in vivo. *Lipids.* 22:643-646; 1987.
- 295 **Patrick TE, Hubel CA, Roberts JM.** Evidence of increased oxidative stress, unexplained by lipid changes, is present in nulliparous black women from early gestation. *Hypertens Pregnancy.* 2004; 23:91–100

- 
- <sup>296</sup> **Wilson R, Lyall K, Smyth L, Fernie CE, Riemersma RA.** Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(2):162-8
- <sup>297</sup> **Hoving EB, Laing C, Rutgers HM, Teggeler M, et al.** Optimized determination of malondialdehyde in plasma lipid extracts using 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid: influence of detection method and relations with lipids and fatty acids in plasma from healthy adults. *Clin Chim Acta.* 1992; 208(1-2):63-76.
- <sup>298</sup> **Franke AA, Harwood PJ, Shimamoto T, Lumeng S, et al.** Effects of micronutrients and antioxidants on lipid peroxidation in human plasma and in cell culture. *Cancer Lett.* 1994;79(1):17-26.
- <sup>299</sup> **Franke C, Demmelmair H, Decsi T, Campoy C, et al.** Influence of fish oil or folate supplementation on the time course of plasma redox markers during pregnancy. *Br J Nutr.* 2010;103(11):1648-56.
- <sup>300</sup> **Mayne ST.** Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003; 133:933S-940S.
- <sup>301</sup> **Kim H, Hwang JY, Ha EH, Park H, et al.** Fruit and vegetable intake influences the association between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and a marker of oxidative stress in pregnant women. *Eur J Clin Nutr.* 2011; 65(10):1118-25.
- <sup>302</sup> **Thompson HJ, Heimendinger J, Haegele A, Sedlacek SM, et al.** Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis.* 1999; 20(12):2261-6.
- <sup>303</sup> **Argüelles S, García S, Maldonado M, Machado A, Ayala A.** Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1674(3):251-9.
- <sup>304</sup> **Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ.** Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 2004; 18(15):1791-800.
- <sup>305</sup> **Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D.** Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(10):1371-4.
- <sup>306</sup> **Sir-Petermann T, Echiburú B, Maliqueo MM, Crisosto N, et al.** Serum adiponectin and lipid concentrations in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1830-6.
- <sup>307</sup> **Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, et al.** Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2006; 49:1677-85.

- 
- 308 **Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, et al.** Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. *J Perinatol.* 2007; 27: 77–81.
- 309 **Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, et al.** Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia.* 2006; 49(6):1292-302.
- 310 **Fuglsang J, Skjaerbaek C, Frystyk J, Flyvbjerg A, Ovesen P.** A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG.* 2006;113(1):110-3.
- 311 **Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, et al.** Adiponectin multimers in maternal plasma. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008; 21:796–815.
- 312 **Mori T, Shinohara K, Wakatsuki A, Watanabe K, Fujimaki A.** Adipocytokines and endothelial function in preeclamptic women. *Hypertens Res.* 2010;33(3):250-4.
- 313 **Araki S, Dobashi K, Yamamoto Y, Asayama K, Kusuvara K.** Increased plasma isoprostane is associated with visceral fat, high molecular weight adiponectin, and metabolic complications in obese children. *Eur J Pediatr.* 2010; 169(8):965-70.
- 314 **Katsuki A, Suematsu M, Gabazza EC, Murashima S, et al.** Increased oxidative stress is associated with decreased circulating levels of adiponectin in Japanese metabolically obese, normal-weight men with normal glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 73(3):310-4.
- 315 **Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, Zilmer M, Hulthe J, Ingelsson E.** Oxidative stress and inflammatory markers in relation to circulating levels of adiponectin. *Obesity.* 2013; 21(7):1467-73.
- 316 **Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, Bernoud-Hubac N, et al.** Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(7):882-9.
- 317 **Kasimanickam RK, Kasimanickam VR.** Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPARγ and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology.* 2011;76(3):482-91.
- 318 **Landrier JF, Gouranton E, El Yazidi C, Malezet C, et al.** Adiponectin expression is induced by vitamin E via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. *Endocrinology.* 2009; 150(12):5318-25.
- 319 **Nuamah MA, Sagawa N, Yura S, Mise H, et al.** Free-to-total leptin ratio in maternal plasma is constant throughout human pregnancy. *Endocr J.* 2003; 50: 421–8.

- 
- <sup>320</sup> **Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P.** Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol.* 1997; 47: 101–6.
- <sup>321</sup> **Eriksson B, Löf M, Olausson H, Forsum E.** Body fat, insulin resistance, energy expenditure and serum concentrations of leptin, adiponectin and resistin before, during and after pregnancy in healthy Swedish women. *Br J Nutr.* 2010; 103(1):50-7.
- <sup>322</sup> **Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T.** Leptin induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295: H1514–21.
- <sup>323</sup> **Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R.** Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 1999; 13(10):1231-8.
- <sup>324</sup> **Shek EW, Brands MW, Hall JE.** Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension.* 1998; 31:409–414.
- <sup>325</sup> **Carlyle M, Jones OB, Kuo JJ, Hall JE.** Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension.* 2002; 39: 496–501.
- <sup>326</sup> **Shankar A, Xiao J.** Positive relationship between plasma leptin level and hypertension. *Hypertension.* 2010; 56(4):623-8.
- <sup>327</sup> **Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, et al.** Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9:124.
- <sup>328</sup> **Singh P, Hoffmann M, Wolk R, Shamsuzzaman AS, Somers VK.** Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(9):e302-7.
- <sup>329</sup> **De Rosa S, Cirillo P, Pacileo M, Di Palma V, et al.** Leptin stimulated C-reactive protein production by human coronary artery endothelial cells. *J Vasc Res.* 2009; 46(6):609-17.
- <sup>330</sup> **Canavan B, Salem RO, Schurgin S, Koutkia P, et al.** Effects of physiological leptin administration on markers of inflammation, platelet activation, and platelet aggregation during caloric deprivation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(10):5779-85.
- <sup>331</sup> **Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, et al.** Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290:H1862-1870.
- <sup>332</sup> **Ning JL, Mo LW, Lai XN.** Low- and high-dose hydrogen peroxide regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2. *Chin Med J.* 2010;123(8):1063-9.

- 
- <sup>333</sup> **Yu S, Khor TO, Cheung KL, Li W, et al.** Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PLoS One*. 2010; 5:e8579.
- <sup>334</sup> **Khor TO, Huang Y, Wu TY, Shu L, Lee J, Kong AN.** Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(9):1073-8.
- <sup>335</sup> **Huang Y, Khor TO, Shu L, Saw CL, et al.** Alpha-Tocopherol-Rich Mixture of Tocopherols Maintains Nrf2 Expression in Prostate Tumors of TRAMP Mice via Epigenetic Inhibition of CpG Methylation. *J Nutr*. 2012;142(5):818-23.
- <sup>336</sup> **Smolarek AK, So JY, Burgess B, Kong AN, et al.** Dietary administration of  $\delta$ - and  $\gamma$ -tocopherol inhibits tumorigenesis in the animal model of estrogen receptor-positive, but not HER-2 breast cancer. *Cancer Prev Res*. 2012;5(11):1310-20.
- <sup>337</sup> **Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, et al.** Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299(1):H18-24.
- <sup>338</sup> **Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, et al.** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98(1):115-24
- <sup>339</sup> **Davinelli S, Sapere N, Visentin M, Zella D, Scapagnini G.** Enhancement of mitochondrial biogenesis with polyphenols: combined effects of resveratrol and equol in human endothelial cells. *Immun Ageing*. 2013;10(1):28.
- <sup>340</sup> **Barrès R, Osler ME, Yan J, Rune A, et al.** Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab*. 2009;10:189-198.
- <sup>341</sup> **Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Rönn T, et al.** Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia*. 2008; 51:615-22.
- <sup>342</sup> **Gemma C, Sookoian S, Alvariñas J, García SI, et al.** Maternal pregestational BMI is associated with Methylation of the PPARGC1A promoter in newborns. *Obesity*. 2009;17:1032-9.
- <sup>343</sup> **Lin J, Handschin C, Spiegelman BM.** Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005; 1:361–370
- <sup>344</sup> **Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, Vartholomatos G, et al.** The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70(5):795-814.

- 
- <sup>345</sup> **Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, et al.** The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genetics*. 2010; 6(6):e1000992.
- <sup>346</sup> **Zhao J, Zhang X, Zhou Y, Ansell PJ & Klibanski A.** Cyclic AMP stimulates MEG3 gene expression in cells through a cAMP-response element (CRE) in the MEG3 proximal promoter region. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1808-20.
- <sup>347</sup> **Gu T, He H, Han Z, Zeng T, et al.** Expression of macro non-coding RNAs Meg8 and Irm in mouse embryonic development. *Acta Histochem*. 2012 ;114(4):392-9.
- <sup>348</sup> **Zhang X, Rice K, Wang Y, et al.** Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Noncoding Ribonucleic Acid: Isoform Structure, Expression, and Functions. *Endocrinology* 2010;151(3):939-947.
- <sup>349</sup> **Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, Zhang X, et al.** Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*. 2007; 282:24731–24742.
- <sup>350</sup> **Gordon FE, Nutt CL, Cheunsuchon P, Nakayama Y, et al.** Increased expression of angiogenic genes in the brains of mouse meg3-null embryos. *Endocrinology*. 2010; 151: 2443–2452.
- <sup>351</sup> **Manavski Y, Doddaballapur A, Zörnig M, et al.** Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res*. 2014; 114(9):1389-97.
- <sup>352</sup> **Zhang Y, Zou Y, Wang W, Zuo Q, et al.** Down-Regulated Long Non-Coding RNA MEG3 and its Effect on Promoting Apoptosis and Suppressing Migration of Trophoblast Cells. *J Cell Biochem*. 2014; doi: 10.1002/jcb.25004.
- <sup>353</sup> **McMinn J, Wei M, Schupf N, Cusmai J, et al.** Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2006;27(6-7):540-9.
- <sup>354</sup> **Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, et al.** Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics*. 2009;4(4):235-40.
- <sup>355</sup> **Karolchik D, Barber GP, Casper J, Clawson H, et al.** The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(1):D764-70.
- <sup>356</sup> **Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M.** Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP and a novel factor. *Endocrinology*. 1998; 139:1013-22.
- <sup>357</sup> **Melzner I, Scott V, Dorsch K, Fischer P, et al.** Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*. 2002;277:45420–7.

- 
- <sup>358</sup> **Marchi M, Lisi S, Curcio M, Barbuti S, et al.** Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics*. 2011; 6(10):1198-206.
- <sup>359</sup> **Hogg K, Blair JD, von Dadelszen P, Robinson WP.** Hypomethylation of the LEP gene in placenta and elevated maternal leptin concentration in early onset pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol*. 2013; 367(1-2):64-73.
- <sup>360</sup> **Xiang Y, Cheng Y, Li X, Li Q, et al.** Up-regulated expression and aberrant DNA methylation of LEP and SH3PXD2A in pre-eclampsia. *PLoS One*. 2013; 8(3):e59753.
- <sup>361</sup> **Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, et al.** Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care*. 2010; 33(11):2436-41.
- <sup>362</sup> **Xu X, Yang X, Liu Z, Wu K, et al.** Placental leptin gene methylation and macrosomia during normal pregnancy. *Mol Med Rep*. 2014; 9(3):1013-8.
- <sup>363</sup> **Lesseur C, Armstrong DA, Murphy MA, Appleton AA, et al.** Sex-specific associations between placental leptin promoter DNA methylation and infant neurobehavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 40:1-9.
- <sup>364</sup> **Watt, F, Molloy, PL.** Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988; 2: 1136–1143.
- <sup>365</sup> **Boyes J, Bird A.** DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*. 1991; 64:1123–1134.
- <sup>366</sup> **Koklu E, Akcakus M, Narin F, Saraymen R.** The relationship between birth weight, oxidative stress and bone mineral status in newborn infants. *J Paediatr Child Health*. 2007;43(10):667-72
- <sup>367</sup> **Fall C et al.** Multiple micronutrient supplementation during pregnancy in low-income countries: a meta-analysis of effects on birth size and length of gestation. *Food and Nutrition Bulletin*. 2009; 30(4):S533–S546.
- <sup>368</sup> **Ronsmans C et al.** Multiple micronutrient supplementation during pregnancy in low-income countries: a meta-analysis of effects on stillbirths and on early and late neonatal mortality. *Food and Nutrition Bulletin*. 2009; 30(4):S547–55
- <sup>369</sup> **Landmann E, Reiss I, Misselwitz B, Gortner L.** Ponderal index for discrimination between symmetric and asymmetric growth restriction: percentiles for neonates from 30 weeks to 43 weeks of gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006 ;19(3):157-60.

---

<sup>370</sup> **Grande RM, Gutierrez E, Argüelles F, Susanne C.** Ponderal Índices at birth. *Int J Anthropol.* 1999; 14:153-160

## Anexo 1

### Registro del ensayo clínico en Clinical Trials

**ClinicalTrials.gov**

A service of the U.S. National Institutes of Health

#### Effect of Micronutrients and Exercise During Pregnancy on Factors Related With Non-Transmissible Chronic Diseases

Verified January 2011 by Universidad del Valle, Colombia.  
Recruitment status was Not yet recruiting

**Sponsor:**  
Universidad del Valle, Colombia

**Collaborators:**  
Fundación FES  
Fundación Cardiovascular de Colombia  
Instituto Nacional de Salud  
University College, London

**Information provided by:**  
Universidad del Valle, Colombia

**ClinicalTrials.gov Identifier:**  
NCT00872365

First received: March 27, 2009  
Last updated: January 8, 2011  
Last verified: January 2011

#### ► Purpose

At the moment, most of efforts to prevent non-transmissible chronic diseases at population level have been centered in promoting healthful behaviors like physical activity, consumption of fruits and vegetables, and discouraging from the consumption of tobacco and alcohol in adult population, but the results have been little hopeful. In the last years, manifold studies have indicated the relation between metabolic alterations and of the fetal growth with the development of non-transmissible chronic diseases in adult age. More recently, it has been proposed that maternal factors (endothelial function, oxidative stress and alterations in adipokines) and placental ones (mitochondrial dysfunction) are the precursory mechanisms of fetal metabolic alterations and of the later development of non-transmissible chronic diseases. Also, it has been suggested that possibly supplementation with micronutrients and the physical exercise during the gestation can regulate these maternal and placental factors. For the reasons just mentioned, it is necessary to clarify if these proposed factors are related to fetal metabolic alterations and if the supplementation during the gestation with micronutrients and/or the physical exercise can regulate them, which would be an early and novel alternative to fortify the prevention of non-transmissible chronic diseases in the population.

#### Purpose

1. To evaluate the effect of associated both the maternal and placental metabolic factors to non-transmissible chronic diseases in newborn.
2. To evaluate the effect of the physical exercise and the complementation with micronutrients during the pregnancy either in the endothelial function, the levels of adipokines, the oxidative stress of the mother and the newborn, as in the placental mitochondrial function and the anthropometry of newborn.

| Condition                                               | Intervention                                                                                                                       | Phase              |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Preeclampsia<br>Pregnancy<br>Micronutrients<br>Exercise | Behavioral: Regular aerobic physical exercise<br>Dietary Supplement: Micronutrients<br>Other: Activities of daily living + placebo | Phase 2<br>Phase 3 |

Study Type: Interventional  
Study Design: Allocation: Randomized  
Endpoint Classification: Efficacy Study  
Intervention Model: Factorial Assignment  
Masking: Double Blind (Investigator, Outcomes Assessor)  
Primary Purpose: Basic Science

Official Title: Effect of Micronutrients and Exercise During Pregnancy on Factors Related With Non-Transmissible Chronic Diseases

#### Resource links provided by NLM:

[Genetics Home Reference](#) related topics: [preeclampsia](#)

[MedlinePlus](#) related topics:

[Genetic and Rare Diseases Information Center](#) resources: [Eclampsia](#)

[U.S. FDA Resources](#)

Further study details as provided by Universidad del Valle, Colombia:

## Anexo 2

### Acta del comité de ética humana

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana  
Facultad de Salud



#### ACTA DE APROBACIÓN N° 017-08

Proyecto: EFECTO DE LA COMPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES Y DEL EJERCICIO FISICO DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE FACTORES MATERNOS Y PLACENTARIOS RELACIONADOS CON ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES

Sometido por: DR.CECILIA AGUILAR DE PLATA/JULIO CESAR MATEUS/PATRICIO LOPEZ/BLANCA SALAZAR/MYRIAM ROMERO/BEATRIZ GRACIA/ISABELLA ECHEVERRI/JOSE GUILLERMO ORTEGA/ROBINSON RAMÍREZ/WILMAR SALDARRIAGA

Código Interno: -125-08 Fecha en que fue sometido: 26 06 2008

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica** que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

- |                                                                                 |                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Resumen del proyecto                        | <input checked="" type="checkbox"/> Protocolo de investigación                |
| <input checked="" type="checkbox"/> Formato de consentimiento informado         | <input checked="" type="checkbox"/> Instrumento de recolección de datos       |
| <input type="checkbox"/> Folleto del investigador (si aplica)                   | <input checked="" type="checkbox"/> Cartas de las instituciones participantes |
| <input type="checkbox"/> Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) |                                                                               |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

☐ SIN RIESGO ☒ RIESGO MÍNIMO ☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

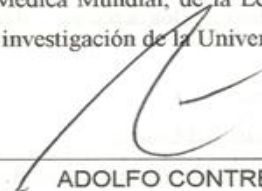
4. Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
  - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
  - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
  - a. Lesiones a sujetos humanos.

- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de 1 año a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
- Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
  - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
  - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
  - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
  - cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
  - La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
  - El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:  Fecha: 07 08 2008  
Nombre: LAURA PIEDRAHITA.  
Capacidad representativa: PRESIDENTE (E) Teléfono: 5185677

#### CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Ley 44 de 1993 de la república de Colombia y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle

Firma:  Fecha: 07 08 2008  
Nombre: ADOLFO CONTRERAS R.  
Capacidad representativa: VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD Teléfono: 5185680

## Anexo 3

### Consentimiento informado para mayores de edad



#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### **EFFECTO DE LA COMPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES Y DEL EJERCICIO FISICO DURANTE LA GESTACION SOBRE FACTORES MATERNOS Y PLAENTARIOS RELACIONADOS CON ENFERMEADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES.**

#### ***MUJERES MAYORES DE 18 AÑOS DE EDAD***

**Investigadores Principales:** Ana Cecilia Aguilar de Plata, BIOL, MSc.  
Julio Cesar Mateus, MD., MEpi.

**Institución ejecutora:** Grupo de Nutrición. Universidad del Valle.  
División Salud. Fundación FES Social.

#### **Cuál es el propósito del estudio?**

Usted ha sido invitada a participar en el estudio **EFFECTO DE LA COMPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES Y DEL EJERCICIO FISICO DURANTE LA GESTACION SOBRE FACTORES MATERNOS Y PLAENTARIOS RELACIONADOS CON ENFERMEADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES**

Este proyecto de investigación a cargo del Grupo de Nutrición de la Universidad del Valle y de la División Salud de la Fundación FES Social tiene por objetivos determinar si durante el embarazo factores como la desnutrición, el sedentarismo y problemas circulatorios entre otros pueden alterar el desarrollo del feto (problemas circulatorios, crecimiento) como la salud de la madre. Igualmente se quiere conocer si el ejercicio físico y/o tomar vitaminas como Pro-vit.A, B3, C, E y minerales como zinc y selenio previenen alteraciones en la salud de la madre y el feto.

#### **Qué pasará durante el estudio?**

En este estudio participarán 400 embarazadas que recibirán atención prenatal habitual del Servicio de Salud que incluye consulta médica, educación psicoprofiláctica, asesoría nutricional y complementación con hierro, calcio y ácido fólico según recomendaciones del Ministerio de Protección Social. Además, todas las participantes recibirán tratamiento en forma de cápsulas que tendrán complementos nutricionales con vitaminas y minerales (**Zinc 30 mg, Selenio 70 ug, ácido ascórbico 300 mg, nicotinamida 135 mg, Vitamina E 78.6 mg y Vitamina A 2.4 mg (1200UI) o placebo**). Estas cantidades de nutrientes se encuentran usualmente en frutas, verduras y carnes. Ni las participantes ni el personal del estudio, conocerán quien está recibiendo micronutrientes o placebo. Todas las participantes serán distribuidas al azar y podrán pertenecer a uno de los siguientes grupos: **Grupo control** (sin ejercicio y con placebo), **Grupo con ejercicio y placebo**, **Grupo con complemento nutricional y sin ejercicio**, y **Grupo con complemento nutricional y ejercicio**. Los grupos con ejercicio realizarán actividad física de manera regular y controlada con intensidad moderada, por 45 minutos, 3 veces a la semana durante 3 meses y complementará el entrenamiento con 2 sesiones de caminatas no supervisadas por semana.

Si usted acepta participar en este estudio una auxiliar de enfermería le preguntará sus datos personales, hábitos, consumo de medicamentos y le realizará un examen físico complementario al del control prenatal. Un ginecólogo le realizará una ecografía para establecer su edad gestacional y adicionalmente, un fisioterapeuta le realizará una prueba en bicicleta estática con diferentes grados de dificultad. La duración de la prueba suele ser de 5 a 12 min y sirve para valorar su estado físico.

Con estos datos determinaremos si su participación en este estudio no significa ningún riesgo para usted o para su bebé, en caso de que no pueda continuar en el estudio le explicaremos cuáles fueron las razones para su retiro y le daremos las indicaciones adecuadas para que siga en tratamiento con el médico del control prenatal. Si encontramos que no existe riesgo para usted o para su bebé con la participación en este estudio, le programaremos una cita en ayunas (última comida consumida a las 8 pm del día anterior) para la realización de los siguientes exámenes de laboratorio:

Una ecografía para determinar el funcionamiento de sus arterias, durante la cual se le coloca un brazaletes en el

brazo izquierdo con presión durante 5 min y se mide la respuesta de su arteria a esta presión. Después se le tomarán aproximadamente 10 mL de sangre y en caso de dificultad para obtener la muestra se realizará solamente un segundo intento. En esta muestra de sangre se medirán sustancias relacionadas con el funcionamiento celular y de sus vasos sanguíneos. Una encuesta dietaria para darle recomendaciones con respecto a su alimentación durante el embarazo. Terminados estos procedimientos (más o menos una hora) se le dará desayuno, se le indicará si usted tiene que realizar actividad física o no y se le entregarán las cápsulas para consumir una diaria antes de acostarse.

El programa de ejercicio lo realizará en la Universidad del Valle – Sede San Fernando. Es importante que informe a los investigadores sobre su tiempo disponible para estas actividades. El ejercicio será orientado por profesionales y estudiantes de Educación Física y Fisioterapia de la Universidad del Valle acompañados siempre por un médico. Para la realización del ejercicio, la asistencia a las charlas, y la asistencia a las pruebas usted tendrá servicio de transporte y un refrigerio adecuado. Para las personas que no están realizando ejercicio se programará una cita mensual para entregarle las pastas y para consultar con respecto al curso de su embarazo.

En la semana 32 de embarazo (3 a 4 meses después) se repetirán los exámenes de laboratorio y estaremos pendientes de la fecha posible de parto para tomar muestras de la placenta y del cordón umbilical. La toma de estas muestras no afectará a su bebé, pues se tomarán después de que su bebé ha nacido y por lo general tanto la placenta como el cordón umbilical son desechadas después del parto. Con estas muestras se realizarán estudios de la función de la placenta y de las células del cordón umbilical.

Tanto los exámenes que se le practiquen a usted, a su bebé y las muestras que se tomen de la placenta y del cordón umbilical también serán utilizadas para otros proyectos que busquen complementar los resultados del presente estudio.

Finalmente, cuando termine el estudio se le darán a conocer los resultados de los exámenes realizados y del estudio en general.

#### **¿Cuánto tiempo durará su participación en el estudio?**

Su participación será desde el momento que ingrese al estudio hasta el parto, es decir, más o menos 4 a 6 meses. Durante todo este tiempo los investigadores mantendrán comunicación telefónica permanente con usted.

#### **Cómo se podría beneficiar si participa en el estudio?**

Las asesorías nutricionales y los exámenes realizados le darán información adicional acerca del curso de su embarazo. Los resultados de la investigación servirán para definir si se debe recomendar el ejercicio y la complementación con micronutrientes, durante el embarazo, por sus efectos benéficos sobre la madre y el niño. Si los resultados del estudio muestran beneficios para la madre y el bebé, se buscará que todas las embarazadas y sus bebés de la ciudad y del país tengan la oportunidad de tener mejor salud.

#### **Qué daños podrían ocurrirle al participante si hace parte del estudio?**

Durante la evaluación inicial puede que quede cansada después de montar bicicleta, pero el reposo adecuado le permitirá recuperarse. Los exámenes de sangre son similares a los exámenes de rutina y no ocasionarán un riesgo para su salud o la del feto, salvo por las molestias propias que puede ocasionar la extracción de sangre, de las cuales la más común podría ser la formación de un morado pasajero en el sitio de la punción. En caso de presentarse cualquier molestia por el ejercicio o la complementación nutricional o durante los exámenes de laboratorio, usted será atendida de forma inmediata y todos los costos del manejo de estos inconvenientes serán cubiertos por el estudio. El brazalete, durante la ecografía de la función arterial, podría causar pequeños morados que desaparecen en dos o tres días. En este estudio no se le administrará ningún medicamento o realizarán procedimientos que puedan alterar su embarazo o la salud de su bebé.

### Confidencialidad

La información obtenida será utilizada únicamente para propósitos del estudio. Su nombre no aparecerá en ningún reporte o publicación.

### Costo de su participación

Ninguno. El estudio asume el costo de las pruebas de laboratorio, el pago del programa de ejercicio, el complemento nutricional, las asesorías nutricionales y psicoprofilácticas adicionales, el transporte para las actividades del estudio y los desayunos y refrigerios.

### Sus derechos en el estudio

Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Si usted no quiere participar, no tendrá ninguna consecuencia. Adicionalmente, después de iniciado el estudio, usted podrá retirarse en cualquier momento y por cualquier razón, esto tampoco traerá consecuencias. Usted tiene derecho a conocer nuevas informaciones con respecto al estudio en el caso de que las hubiera. Su compromiso con el estudio es asistir a las rutinas de ejercicio, tomarse debidamente el complemento nutricional y asistir periódicamente a las asesorías, decir la verdad en las encuestas y asistir a los exámenes que se solicitan. En caso de que tenga preguntas adicionales sobre el estudio usted puede contactar a la Dra. Cecilia Aguilar Tels: 518 56 03 – 5185604 o al Dr. Julio Cesar Mateus al Tel. 6534141 ext 131 ó 113 o al comité de Ética Humana de la Universidad del Valle al tel. 518 56 77.

Con su firma usted acepta que ha leído o alguien le ha leído este documento, que se han respondido satisfactoriamente a sus preguntas y aclarado las posibles dudas, y que acepta participar voluntariamente en el presente estudio.

Usted recibirá además una copia del presente documento.

Nombre de la participante  
Cédula

Firma

Nombre de la pareja o testigo  
Cédula

Firma

Nombre del testigo  
Cédula

Firma

Nombre del investigador  
Cédula

Firma

INICIALES DEL ENCUESTADOR:

HORA DE REALIZACION:

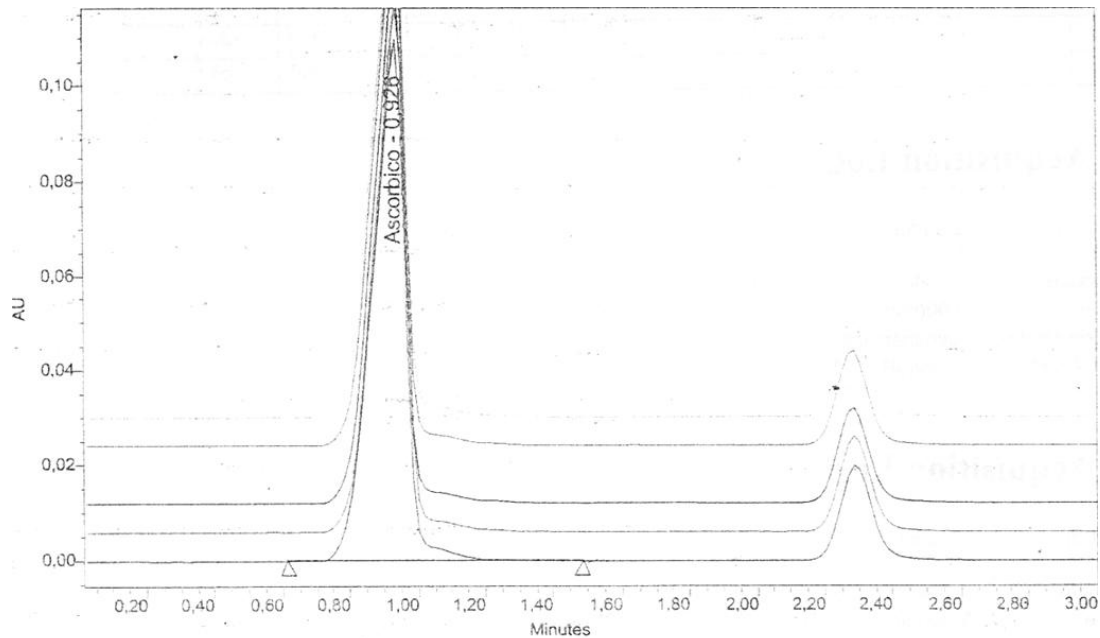
  :   AM  PM 

FECHA DE DILIGENCIAMIENTO:

  /   /     (dd/mm/aaaa)

## Anexo 4

### Análisis de estabilidad del suplemento



Peak Summary with Statistics

|      | Sample Name                    | Vial | Inj. | Peak Name | RT (min) | Area (V*sec) | % Area | Height (V) | Amount  | Units  |
|------|--------------------------------|------|------|-----------|----------|--------------|--------|------------|---------|--------|
| 1    | Multivitaminale P12 M1 41C* m1 | 2    | 2    | Ascorbico | 0,926    | 747583       | 100,00 | 110800     | 296,215 | mg/cap |
| 2    | Multivitaminale P12 M1 41C* m1 | 2    | 1    | Ascorbico | 0,926    | 748972       | 100,00 | 109890     | 296,765 | mg/cap |
| 3    | Multivitaminale P12 M1 41C* m2 | 3    | 2    | Ascorbico | 0,926    | 737816       | 100,00 | 110612     | 292,898 | mg/cap |
| 4    | Multivitaminale P12 M1 41C* m2 | 3    | 1    | Ascorbico | 0,928    | 742583       | 100,00 | 110594     | 294,791 | mg/cap |
| 5    | Multivitaminale P12 M1 41C* m3 | 4    | 2    | Ascorbico | 0,926    | 725185       | 100,00 | 109588     | 285,719 | mg/cap |
| 6    | Multivitaminale P12 M1 41C* m3 | 4    | 1    | Ascorbico | 0,926    | 727591       | 100,00 | 109859     | 286,668 | mg/cap |
| Mean |                                |      |      |           | 0,926    | 738288,443   |        | 110223,935 | 292,176 |        |

Activo trazador el acido ascórbico

m1: muestra mes 1

m2: muestra mes 2

m3: muestra mes 3

## Anexo 5

### Formato de captación de las participantes

**"Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles"**

|                                 |    |    |                 |  |
|---------------------------------|----|----|-----------------|--|
| DD                              | MM | AA |                 |  |
| NOMBRE _____                    |    |    |                 |  |
| PERSONA QUE REALIZA LA ENCUESTA |    |    | CENTRO DE SALUD |  |
|                                 |    |    |                 |  |
| FECHA DE NACIMIENTO             |    |    |                 |  |
|                                 |    |    |                 |  |
| DD                              | MM | AA |                 |  |
| EDAD _____ AÑOS                 |    |    |                 |  |

| CRITERIOS DE INCLUSION                          | SI                       | NO                       | FUENTE                   |                          |
|-------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                                 |                          |                          | HC                       | PARTICIPANTE             |
| PRIMIGESTANTE                                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| EDAD ENTRE 16 A 30 AÑOS                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| EDAD GESTACIONAL ENTRE 16 A 20 SEMANAS          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| CONTROL PRENATAL EN LA ESE LADERA               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| AFILIACIÓN AL REGIMEN CONTRIBUTIVO O SUBSIDIADO | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DISPOSICIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**SI ALGUNA DE LAS RESPUESTAS ANTERIORES FUERON NEGATIVAS, AGRADEZCALE A LA PERSONA POR SU TIEMPO Y NO LA INCLUYA EN EL ESTUDIO**

| CRITERIOS DE EXCLUSION                                              | SI                       | NO                       | FUENTE                   |                          |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                                                     |                          |                          | HC                       | PARTICIPANTE             |
| DIAGNOSTICO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL O CONSUMO DE ANTIHIPERTENSIVOS | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| CIRUGÍA O TRAUMA MAYOR EN EL ULTIMO AÑO                             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIAGNOSTICO DE CANCER                                               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ANTECEDENTES DE 2 O MAS ABORTOS ESPONTANEOS                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIAGNOSTICO DE EPOC, ASMA O BRONQUITIS                              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| INFECCIONES SISTEMICAS                                              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ANTECEDENTES DE PROBLEMAS RENALES                                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD OSTEOMUSCULAR                             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR                            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| DIAGNOSTICO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL O CONSUMO DE ANTIHIPERTENSIVOS | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**SI ALGUNA DE LAS RESPUESTAS ANTERIORES FUERON POSITIVAS, AGRADEZCALE A LA PERSONA POR SU TIEMPO Y NO LA INCLUYA EN EL ESTUDIO**

| CRITERIOS DE EXCLUSION                                                           | SI                       | NO                       |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>ESTA PARTE SOLO PUEDE SER COMPLETADA POR EL GINECOLO DURANTE LA ECOGRAFIA</b> |                          |                          |
| EDAD GESTACIONAL ENTRE 16 A 20 SEMANAS                                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| EMBARAZO MULTIPLE                                                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| HEMORRAGIA VAGINAL                                                               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| PLACENTA PREVIA                                                                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| AMENAZA DE ABORTO                                                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| INCOMPETENCIA CERVICAL                                                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| MALFORMACIONES FETALES                                                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| INCOMPETENCIA CERVICAL                                                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| POLIHIDRAMNIO U OLIGOHIDRAMNIO                                                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**OBSERVACIONES:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Anexo 6  
Formato de valoración ginecológica

| "Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----|----|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| DD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | MM                                                                      | AA                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| NOMBRE _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| PERSONA QUE REALIZA LA ENCUESTA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                         | CENTRO<br>DE SALUD                                                      | <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 5px;">SILOE (1)</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 5px;">MELENDEZ (2)</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 5px;">CAÑADERALEJO (3)</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 5px;">OTRO (4)</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> <div>CUAL? _____</div> </div> |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| FECHA DE NACIMIENTO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| DD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | MM                                                                      | AA                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| EDAD _____ AÑOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| HEMOGLOBINA _____ g/dL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| <p><b>ESTA PARTE SOLO PUEDE SER COMPLETADA CON MEDIDAS TOMADAS EN EL LABORATORIO</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; border-bottom: 1px solid black;">CRITERIOS DE EXCLUSION</th> <th style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">SI</th> <th style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">NO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">HEMOGLOBINA &lt; 9 g/dL</td> <td style="text-align: center; width: 40px;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center; width: 40px;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">IMC &lt;18 o &gt;30</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">PRESION ARTERIAL &gt;140/90</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> </tbody> </table> <p><b>ESTA PARTE SOLO PUEDE SER COMPLETADA POR EL GINECOLO DURANTE LA ECOGRAFIA</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">EDAD GESTACIONAL ENTRE 11 A 20 SEMANAS</td> <td style="text-align: center; width: 40px;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center; width: 40px;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">EMBARAZO MULTIPLE</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">HEMORRAGIA VAGINAL</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">PLACENTA PREVIA</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">MALFORMACIONES FETALES</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">POLIHIDRAMNIOS U OLIGOHIDRAMNIOS</td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> <td style="text-align: center;"><div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div></td> </tr> </tbody> </table> <p><b>OBSERVACIONES:</b> _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p><b>VISTO BUENO DEL GINECO-OBSTETRA:</b> _____</p> |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CRITERIOS DE EXCLUSION | SI | NO | HEMOGLOBINA < 9 g/dL | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | IMC <18 o >30 | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | PRESION ARTERIAL >140/90 | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | EDAD GESTACIONAL ENTRE 11 A 20 SEMANAS | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | EMBARAZO MULTIPLE | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | HEMORRAGIA VAGINAL | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | PLACENTA PREVIA | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | MALFORMACIONES FETALES | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | POLIHIDRAMNIOS U OLIGOHIDRAMNIOS | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |
| CRITERIOS DE EXCLUSION                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | SI                                                                      | NO                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| HEMOGLOBINA < 9 g/dL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| IMC <18 o >30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| PRESION ARTERIAL >140/90                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| EDAD GESTACIONAL ENTRE 11 A 20 SEMANAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| EMBARAZO MULTIPLE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| HEMORRAGIA VAGINAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| PLACENTA PREVIA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| MALFORMACIONES FETALES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| POLIHIDRAMNIOS U OLIGOHIDRAMNIOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |
| <p style="text-align: center;">SI ALGUNA DE LAS RESPUESTAS ANTERIORES FUERON POSITIVAS, O EL GINECO-OBSTETRA NO DIO EL VISTO BUENO, AGRADEZCALE A LA PERSONA POR SU TIEMPO Y NO LA INCLUYA EN EL ESTUDIO</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |    |    |                      |                                                                         |                                                                         |               |                                                                         |                                                                         |                          |                                                                         |                                                                         |                                        |                                                                         |                                                                         |                   |                                                                         |                                                                         |                    |                                                                         |                                                                         |                 |                                                                         |                                                                         |                        |                                                                         |                                                                         |                                  |                                                                         |                                                                         |

## Formato de asistencia a las pruebas del estudio

Este es un formato de control de asistencia de acuerdo a la programación entregada por la auxiliar de captación este formato debe ser diligenciado el día anterior a la toma de muestras y debe ser firmado por la participante al finalizar la misma

OBSERVACIONES

## Anexo 8

### Bloques de aleatorización

| BLOQUE No. 33 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| WA            | 257 |        |
| SB            | 258 |        |
| ZC            | 259 |        |
| RD            | 260 |        |
| DE            | 261 |        |
| KF            | 262 |        |
| CG            | 263 |        |
| EH            | 264 |        |

| BLOQUE No. 29 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| HZ            | 225 |        |
| TY            | 226 |        |
| MX            | 227 |        |
| NW            | 228 |        |
| VV            | 229 |        |
| GU            | 230 |        |
| XT            | 231 |        |
| JS            | 232 |        |

| BLOQUE No. 45 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| NA            | 353 |        |
| MB            | 354 |        |
| GC            | 355 |        |
| VD            | 356 |        |
| JE            | 357 |        |
| XF            | 358 |        |
| TG            | 359 |        |
| HH            | 360 |        |

| BLOQUE No. 25 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| KP            | 193 |        |
| DO            | 194 |        |
| EN            | 195 |        |
| CM            | 196 |        |
| ZK            | 197 |        |
| WJ            | 198 |        |
| RI            | 199 |        |
| SH            | 200 |        |

| BLOQUE No. 31 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| JI            | 241 |        |
| XJ            | 242 |        |
| NK            | 243 |        |
| GL            | 244 |        |
| TM            | 245 |        |
| VN            | 246 |        |
| MO            | 247 |        |
| HP            | 248 |        |

| BLOQUE No. 19 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| XJ            | 145 |        |
| JI            | 146 |        |
| MH            | 147 |        |
| NG            | 148 |        |
| VF            | 149 |        |
| GE            | 150 |        |
| HD            | 151 |        |
| TC            | 152 |        |

| BLOQUE No. 13 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| SI            | 97  |        |
| DJ            | 98  |        |
| RK            | 99  |        |
| CL            | 100 |        |
| WM            | 101 |        |
| EN            | 102 |        |
| KO            | 103 |        |
| ZP            | 104 |        |

| BLOQUE No. 48 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| HG            | 377 |        |
| XF            | 378 |        |
| VE            | 379 |        |
| MD            | 380 |        |
| NC            | 381 |        |
| GB            | 382 |        |
| JA            | 383 |        |
| TZ            | 384 |        |

| BLOQUE No. 44 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| CQ            | 345 |        |
| SR            | 346 |        |
| DS            | 347 |        |
| ET            | 348 |        |
| WU            | 349 |        |
| KV            | 350 |        |
| ZW            | 351 |        |
| RX            | 352 |        |

| BLOQUE No. 24 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| GQ            | 185 |        |
| TR            | 186 |        |
| HS            | 187 |        |
| NT            | 188 |        |
| VU            | 189 |        |
| JV            | 190 |        |
| XW            | 191 |        |
| MX            | 192 |        |

| BLOQUE No. 34 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| DY            | 265 |        |
| WZ            | 266 |        |
| ZA            | 267 |        |
| KB            | 268 |        |
| SC            | 269 |        |
| CE            | 270 |        |
| EF            | 271 |        |
| RG            | 272 |        |

| BLOQUE No. 23 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| RY            | 177 |        |
| ZX            | 178 |        |
| KW            | 179 |        |
| WV            | 180 |        |
| CU            | 181 |        |
| DT            | 182 |        |
| SS            | 183 |        |
| CR            | 184 |        |

| BLOQUE No. 47 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| WG            | 369 |        |
| SH            | 370 |        |
| DI            | 371 |        |
| CJ            | 372 |        |
| RK            | 373 |        |
| KL            | 374 |        |
| EM            | 375 |        |
| ZN            | 376 |        |

| BLOQUE No. 2 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| VT           | 9  |        |
| MS           | 10 |        |
| GR           | 11 |        |
| NQ           | 12 |        |
| HP           | 13 |        |
| TO           | 14 |        |
| XN           | 15 |        |
| JM           | 16 |        |

| BLOQUE No. 21 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| JH            | 161 |        |
| GI            | 162 |        |
| TJ            | 163 |        |
| NK            | 164 |        |
| XL            | 165 |        |
| VM            | 166 |        |
| HN            | 167 |        |
| MO            | 168 |        |

| BLOQUE No. 42 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| KI            | 329 |        |
| DH            | 330 |        |
| EG            | 331 |        |
| CF            | 332 |        |
| RE            | 333 |        |
| SD            | 334 |        |
| ZC            | 335 |        |
| WB            | 336 |        |

| BLOQUE No. 9 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| GO           | 65 |        |
| TP           | 66 |        |
| NQ           | 67 |        |
| JR           | 68 |        |
| GS           | 69 |        |
| HT           | 70 |        |
| MU           | 71 |        |
| XV           | 72 |        |

| BLOQUE No. 43 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| VD            | 337 |        |
| XC            | 338 |        |
| JB            | 339 |        |
| MA            | 340 |        |
| HZ            | 341 |        |
| TY            | 342 |        |
| GX            | 343 |        |
| NW            | 344 |        |

| BLOQUE No. 8 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| CP           | 57 |        |
| DQ           | 58 |        |
| WR           | 59 |        |
| SS           | 60 |        |
| RT           | 61 |        |
| ZU           | 62 |        |
| KV           | 63 |        |
| EW           | 64 |        |

| BLOQUE No. 1 |   |        |
|--------------|---|--------|
| CODIGO       |   | Nombre |
| MA           | 1 |        |
| VZ           | 2 |        |
| NY           | 3 |        |
| GX           | 4 |        |
| HW           | 5 |        |
| TV           | 6 |        |
| XU           | 7 |        |
| JT           | 8 |        |

| BLOQUE No. 14 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| WW            | 105 |        |
| ZX            | 106 |        |
| DY            | 107 |        |
| KZ            | 108 |        |
| SA            | 109 |        |
| CB            | 110 |        |
| EC            | 111 |        |
| RD            | 112 |        |

| BLOQUE No. 17 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| HN            | 129 |        |
| MM            | 130 |        |
| NL            | 131 |        |
| VK            | 132 |        |
| GJ            | 133 |        |
| XI            | 134 |        |
| JH            | 135 |        |
| TG            | 136 |        |

| BLOQUE No. 22 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| NX            | 169 |        |
| GY            | 170 |        |
| JZ            | 171 |        |
| TA            | 172 |        |
| MB            | 173 |        |
| HC            | 174 |        |
| XD            | 175 |        |
| VE            | 176 |        |

| BLOQUE No. 7 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| ES           | 49 |        |
| CR           | 50 |        |
| RQ           | 51 |        |
| ZP           | 52 |        |
| SO           | 53 |        |
| WN           | 54 |        |
| KM           | 55 |        |
| DL           | 56 |        |

| BLOQUE No. 38 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| SC            | 297 |        |
| DD            | 298 |        |
| WE            | 299 |        |
| CF            | 300 |        |
| EG            | 301 |        |
| ZH            | 302 |        |
| KI            | 303 |        |
| RJ            | 304 |        |

| BLOQUE No. 50 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| VA            | 393 |        |
| MZ            | 394 |        |
| HY            | 395 |        |
| XX            | 396 |        |
| JW            | 397 |        |
| TB            | 398 |        |
| SU            | 399 |        |
| GT            | 400 |        |

| BLOQUE No. 41 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| JK            | 321 |        |
| GL            | 322 |        |
| XM            | 323 |        |
| TN            | 324 |        |
| NO            | 325 |        |
| MP            | 326 |        |
| HQ            | 327 |        |
| VR            | 328 |        |

| BLOQUE No. 11 |    |        |
|---------------|----|--------|
| CODIGO        |    | Nombre |
| WS            | 81 |        |
| ST            | 82 |        |
| DU            | 83 |        |
| KV            | 84 |        |
| CW            | 85 |        |
| EX            | 86 |        |
| RY            | 87 |        |
| ZZ            | 88 |        |

| BLOQUE No. 32 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| KR            | 249 |        |
| ZQ            | 250 |        |
| WP            | 251 |        |
| RO            | 252 |        |
| DN            | 253 |        |
| EM            | 254 |        |
| CL            | 255 |        |
| SK            | 256 |        |

| BLOQUE No. 3 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| EL           | 17 |        |
| RK           | 18 |        |
| KJ           | 19 |        |
| CI           | 20 |        |
| SH           | 21 |        |
| DG           | 22 |        |
| ZF           | 23 |        |
| WE           | 24 |        |

| BLOQUE No. 30 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| RB            | 233 |        |
| ZA            | 234 |        |
| SZ            | 235 |        |
| WY            | 236 |        |
| EX            | 237 |        |
| KW            | 238 |        |
| CB            | 239 |        |
| DU            | 240 |        |

| BLOQUE No. 6 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| RV           | 41 |        |
| ZU           | 42 |        |
| ET           | 43 |        |
| WS           | 44 |        |
| KR           | 45 |        |
| SQ           | 46 |        |
| CP           | 47 |        |
| DO           | 48 |        |

| BLOQUE No. 12 |    |        |
|---------------|----|--------|
| CODIGO        |    | Nombre |
| XQ            | 89 |        |
| MP            | 90 |        |
| VO            | 91 |        |
| HM            | 92 |        |
| TN            | 93 |        |
| GL            | 94 |        |
| NK            | 95 |        |
| JJ            | 96 |        |

| BLOQUE No. 39 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| ZF            | 305 |        |
| RE            | 306 |        |
| KD            | 307 |        |
| EC            | 308 |        |
| CB            | 309 |        |
| DA            | 310 |        |
| SZ            | 311 |        |
| WY            | 312 |        |

| BLOQUE No. 20 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| CD            | 153 |        |
| SE            | 154 |        |
| WF            | 155 |        |
| ZG            | 156 |        |
| EH            | 157 |        |
| RI            | 158 |        |
| DJ            | 159 |        |
| KK            | 160 |        |

| BLOQUE No. 15 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| JL            | 113 |        |
| XM            | 114 |        |
| TN            | 115 |        |
| NO            | 116 |        |
| GP            | 117 |        |
| HQ            | 118 |        |
| MR            | 119 |        |
| VS            | 120 |        |

| BLOQUE No. 38 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| SC            | 297 |        |
| DD            | 298 |        |
| WE            | 299 |        |
| CF            | 300 |        |
| EG            | 301 |        |
| ZH            | 302 |        |
| KI            | 303 |        |
| RJ            | 304 |        |

| BLOQUE No. 50 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| VA            | 393 |        |
| MZ            | 394 |        |
| HY            | 395 |        |
| XX            | 396 |        |
| JW            | 397 |        |
| TB            | 398 |        |
| SU            | 399 |        |
| GT            | 400 |        |

| BLOQUE No. 41 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| JK            | 321 |        |
| GL            | 322 |        |
| XM            | 323 |        |
| TN            | 324 |        |
| NO            | 325 |        |
| MP            | 326 |        |
| HQ            | 327 |        |
| VR            | 328 |        |

| BLOQUE No. 11 |    |        |
|---------------|----|--------|
| CODIGO        |    | Nombre |
| WS            | 81 |        |
| ST            | 82 |        |
| DU            | 83 |        |
| KV            | 84 |        |
| CW            | 85 |        |
| EX            | 86 |        |
| RY            | 87 |        |
| ZZ            | 88 |        |

| BLOQUE No. 32 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| KR            | 249 |        |
| ZQ            | 250 |        |
| WP            | 251 |        |
| RO            | 252 |        |
| DN            | 253 |        |
| EM            | 254 |        |
| CL            | 255 |        |
| SK            | 256 |        |

| BLOQUE No. 3 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| EL           | 17 |        |
| RK           | 18 |        |
| KJ           | 19 |        |
| CI           | 20 |        |
| SH           | 21 |        |
| DG           | 22 |        |
| ZF           | 23 |        |
| WE           | 24 |        |

| BLOQUE No. 30 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| RB            | 233 |        |
| ZA            | 234 |        |
| SZ            | 235 |        |
| WY            | 236 |        |
| EX            | 237 |        |
| KW            | 238 |        |
| CB            | 239 |        |
| DU            | 240 |        |

| BLOQUE No. 6 |    |        |
|--------------|----|--------|
| CODIGO       |    | Nombre |
| RV           | 41 |        |
| ZU           | 42 |        |
| ET           | 43 |        |
| WS           | 44 |        |
| KR           | 45 |        |
| SQ           | 46 |        |
| CP           | 47 |        |
| DO           | 48 |        |

| BLOQUE No. 12 |    |        |
|---------------|----|--------|
| CODIGO        |    | Nombre |
| XQ            | 89 |        |
| MP            | 90 |        |
| VO            | 91 |        |
| HM            | 92 |        |
| TN            | 93 |        |
| GL            | 94 |        |
| NK            | 95 |        |
| JJ            | 96 |        |

| BLOQUE No. 39 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| ZF            | 305 |        |
| RE            | 306 |        |
| KD            | 307 |        |
| EC            | 308 |        |
| CB            | 309 |        |
| DA            | 310 |        |
| SZ            | 311 |        |
| WY            | 312 |        |

| BLOQUE No. 20 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| CD            | 153 |        |
| SE            | 154 |        |
| WF            | 155 |        |
| ZG            | 156 |        |
| EH            | 157 |        |
| RI            | 158 |        |
| DJ            | 159 |        |
| KK            | 160 |        |

| BLOQUE No. 15 |     |        |
|---------------|-----|--------|
| CODIGO        |     | Nombre |
| JL            | 113 |        |
| XM            | 114 |        |
| TN            | 115 |        |
| NO            | 116 |        |
| GP            | 117 |        |
| HQ            | 118 |        |
| MR            | 119 |        |
| VS            | 120 |        |

## Anexo 9

### Formato de seguimiento del consumo del suplemento

**FORMATO DE SEGUIMIENTO DE INTERVENCIONES NUTRICIONALES EFECTO DE LA COMPLEMENTACION CON MICRONUTRIENTES Y DEL EJERCICIO FISICO DURANTE LA GESTACION SOBRE FACTORES MATERNOS Y PLACENTARIOS RELACIONADOS CON ENFERMEDADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES.**

|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------|--|------------|-------------------------------------------------|--|
| Fecha de Apertura                                                                                                                                                               | <table border="1"><tr><td>Día</td><td>Mes</td><td>Año</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table> | Día | Mes                                                | Año                                          |                                              |                  |                                              | Historia Clínica     | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |  | SUPLEMENTO | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>    |  |
| Día                                                                                                                                                                             | Mes                                                                                                         | Año |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| NOMBRE                                                                                                                                                                          | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     |                                                    | APELLIDOS                                    | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| CC                                                                                                                                                                              | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     | TI                                                 | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                              | No.              | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| BARRIO                                                                                                                                                                          | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| DIRECCION                                                                                                                                                                       | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     |                                                    | TELEFONO                                     | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| CELULAR                                                                                                                                                                         | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Fecha Control                                                                                                                                                                   | <table border="1"><tr><td>Día</td><td>Mes</td><td>Año</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table> | Día | Mes                                                | Año                                          |                                              |                  |                                              | Semanas de Gestacion | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |  | Peso       | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> Kg |  |
| Día                                                                                                                                                                             | Mes                                                                                                         | Año |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Tension                                                                                                                                                                         | <table border="1"><tr><td></td><td>/</td><td></td></tr></table>                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  | /                                            |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 | /                                                                                                           |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 1. Considera que su estado de salud en este momento es?                                                                                                                         |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Bueno                                                                                                                                                                           | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     | Regular                                            | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                              | Malo             | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Por que? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                                           |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 2. Ha consumido en el ultimo mes el suplemento? SI <table border="1"><tr><td></td></tr></table> NO <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Si la respuesta es NO Porque ? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                     |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 2.3 Cuantas capsulas quedan en el recipiente. Cuentelas directamente <table border="1"><tr><td></td></tr></table> Capsulas                                                      |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| OBSERVACIONES <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                                      |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 2.4. Alguien mas en la casa a consumido el suplemento? NO <table border="1"><tr><td></td></tr></table> SI <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                          |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Si la respuesta es SI Quien? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                       |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 3. Esta consumiendo otro multivitamico en este momento ? NO <table border="1"><tr><td></td></tr></table> SI <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                        |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Si la respuesta es SI Cual? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                        |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Desde que fecha lo esta consumiendo? <table border="1"><tr><td>Día</td><td>Mes</td><td>Año</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>                                |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              | Día              | Mes                                          | Año                  |                                              |  |            |                                                 |  |
| Día                                                                                                                                                                             | Mes                                                                                                         | Año |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 4. En este momento esta consumiendo alguna droga o medicamento NO <table border="1"><tr><td></td></tr></table> SI <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                  |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Si la respuesta es SI Cual? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                        |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Porque motivo lo esta tomado? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                      |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Desde que fecha lo esta consumiendo? <table border="1"><tr><td>Día</td><td>Mes</td><td>Año</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>                                |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              | Día              | Mes                                          | Año                  |                                              |  |            |                                                 |  |
| Día                                                                                                                                                                             | Mes                                                                                                         | Año |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 4. En el ultimo mes ha presentado alguno de los siguiente sintomas repetidamente:                                                                                               |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Nauseas                                                                                                                                                                         | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     | Ruborizacion                                       | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                              | Acidez Estomacal | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Diarrea                                                                                                                                                                         | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     | Vomito                                             | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                              | Brote en la piel | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Gases intestinales                                                                                                                                                              | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     | Mareos                                             | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                              | Vision Borrosa   | <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Sangrado Vaginal                                                                                                                                                                | <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                |     | OTROS <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| 5. Tenias algunos de estos sintomas antes de iniciar el consumo del suplemento? NO <table border="1"><tr><td></td></tr></table> SI <table border="1"><tr><td></td></tr></table> |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Si la respuesta es SI cuales? <table border="1"><tr><td></td></tr></table>                                                                                                      |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |
| Firma _____                                                                                                                                                                     |                                                                                                             |     |                                                    |                                              |                                              |                  |                                              |                      |                                              |  |            |                                                 |  |

Anexo 10  
Formato de registro de datos VMF

|  |                            |                      |                      |                      |                      |                      |                                                                                     |
|--|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Código del Participante    | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |  |
|  | Iniciales del participante | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |                                                                                     |

**LECTURA VMF / EVALUADOR 1**

|                                          |                                           |                              |
|------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
| 1. DIAMETRO BASAL ARTERIA BRAQUIAL.....  | <input style="width: 100%;" type="text"/> | Milímetros                   |
| 2. VELOCIDAD PICO BASAL.....             | <input style="width: 100%;" type="text"/> | centímetros/seg <sup>2</sup> |
| 3. DIAMETRO POST-HIPEREMIA (60 Seg)..... | <input style="width: 100%;" type="text"/> | Milímetros                   |
| 4. VELOCIDAD PICO POST-HIPEREMIA .....   | <input style="width: 100%;" type="text"/> | centímetros/seg <sup>2</sup> |

|                                        |                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                         |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| BRAZO EN EL CUAL SE REALIZA LA PRUEBA: | Derecho <input style="width: 30px;" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                         | Izquierdo <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> |
| Temperatura ambiente.....              | <input style="width: 100%;" type="text"/>                                                                                                                                                                                                                     | Grados centígrados                                      |
| Frecuencia Cardíaca Basal.....         | <input style="width: 100%;" type="text"/>                                                                                                                                                                                                                     | Latidos por minuto                                      |
| Presión Arterial al minuto 0.....      | <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> / <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> | MmHg                                                    |
| Presión Arterial al minuto 5.....      | <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> / <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> | MmHg                                                    |
| Presión Arterial al minuto 10.....     | <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> / <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/> | MmHg                                                    |

|                            |                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| INICIALES DEL ENCUESTADOR: | <input style="width: 100%;" type="text"/>                                                                                                                                               |
| HORA DE REALIZACION:       | <input style="width: 30px;" type="text"/> : <input style="width: 30px;" type="text"/> AM <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> PM <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> |
| FECHA DE DILIGENCIAMIENTO: | <input style="width: 30px;" type="text"/> / <input style="width: 30px;" type="text"/> / <input style="width: 60px;" type="text"/> (dd/mm/aaaa)                                          |

Universidad del Valle  
 Escuela de Ciencias Básicas. Departamento de Ciencias Fisiológicas.  
 Sección Bioquímica. Edificio 116. Oficina 5004.  
 Calle 4B 36-00 Sede San Fernando.  
 Santiago de Cali, Valle del Cauca. Colombia.  
 Teléfono N° (+572) - 518 5603

1

## Anexo 11

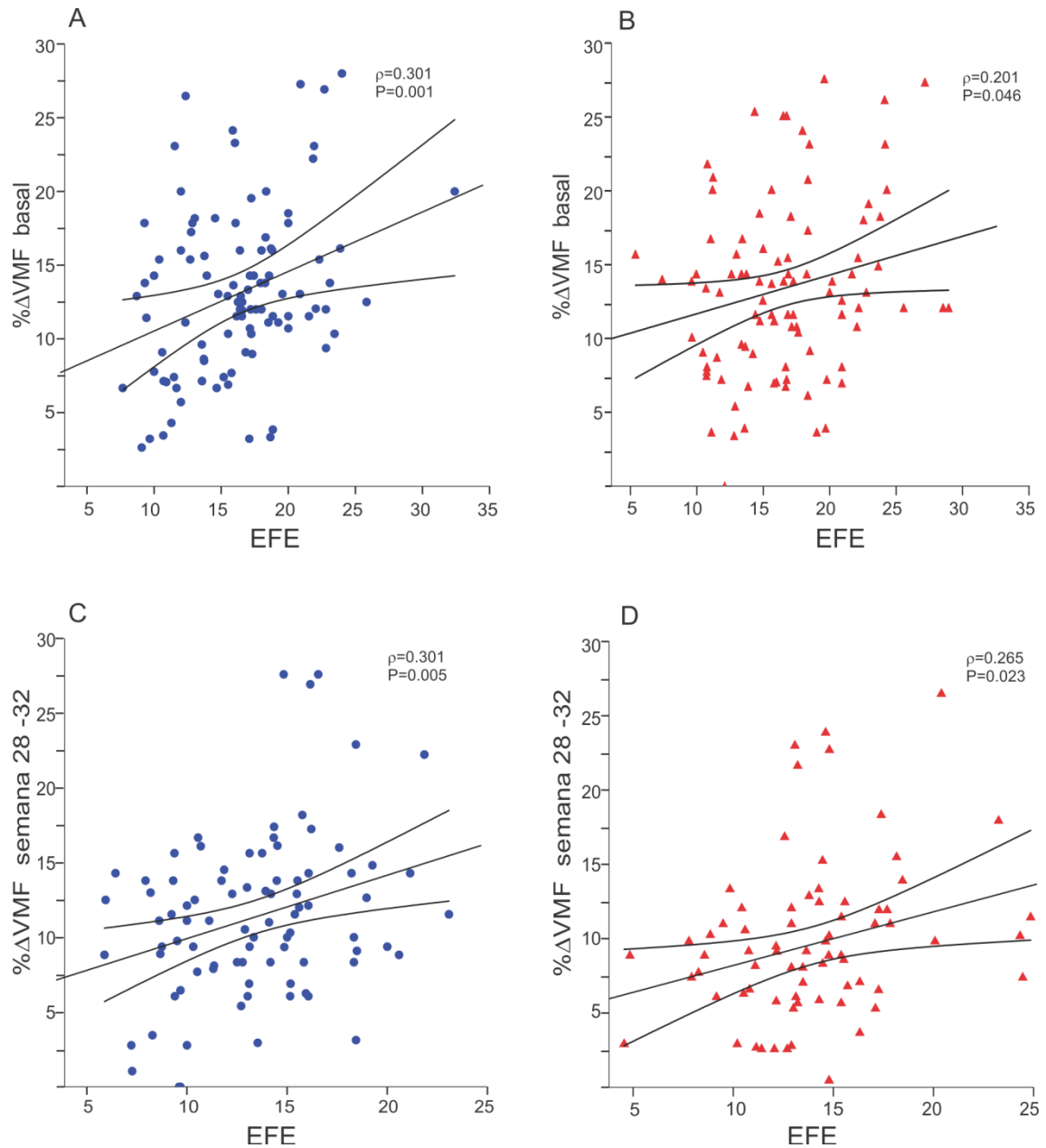
Tabla consumo de nutrientes de las embarazadas al inicio del estudio.

| Parámetro          | RDA  | Grupo Control     |       | Grupo Antioxidantes |       | <i>p</i><br>Intergrupos |
|--------------------|------|-------------------|-------|---------------------|-------|-------------------------|
|                    |      | $\bar{X} \pm DE$  | PA    | $\bar{X} \pm DE$    | PA    |                         |
| Kilocalorías       | 2400 | 2272 $\pm$ 629    | 94,6  | 2179 $\pm$ 640      | 90,8  | 0,451                   |
| Proteína (gr)      | 75   | 57,5 $\pm$ 21,8   | 76,7  | 54,6 $\pm$ 22,5     | 73,1  | 0,298                   |
| Carbohidratos (gr) | 360  | 241,7 $\pm$ 83    | 67,1  | 231,9 $\pm$ 84      | 67,4  | 0,440                   |
| Grasa (gr)         | 80   | 121,9 $\pm$ 40    | 152   | 118,9 $\pm$ 45      | 148   | 0,800                   |
| Colesterol (mg)    | 300  | 314,5 $\pm$ 271   | 104,8 | 293,7 $\pm$ 279     | 97,9  | 0,424                   |
| Sodio (mg)         | 3000 | 1022 $\pm$ 951    | 34,0  | 949 $\pm$ 857       | 31,6  | 0,685                   |
| Calcio (mg)        | 1300 | 497 $\pm$ 316     | 38,26 | 435 $\pm$ 278       | 33,8  | 0,205                   |
| Fosforo (mg)       | 1300 | 858 $\pm$ 371     | 66,0  | 791 $\pm$ 324       | 61,3  | 0,421                   |
| Magnesio (mg)      | 320  | 128 $\pm$ 50,8    | 40    | 127 $\pm$ 76,1      | 39,7  | 0,353                   |
| Hierro (mg)        | 57   | 9,6 $\pm$ 5,0     | 16,9  | 9,5 $\pm$ 4,9       | 16,7  | 0,875                   |
| Zinc (mg)          | 9    | 6,4 $\pm$ 3,1     | 71,9  | 6,8 $\pm$ 3,9       | 75,9  | 0,865                   |
| Cobre (ug)         | 2    | 0,52 $\pm$ 0,39   | 26,26 | 0,56 $\pm$ 0,43     | 28,32 | 0,391                   |
| Vitamina A (UI)    | 5000 | 3834 $\pm$ 3676   | 76,6  | 4544 $\pm$ 4872     | 90,89 | 0,363                   |
| Vitamina E (UI)    | 950  | 686 $\pm$ 1230    | 72,3  | 720 $\pm$ 1255      | 75,8  | 0,944                   |
| Tiamina (mg)       | 1,5  | 0,73 $\pm$ 0,41   | 49,25 | 0,74 $\pm$ 0,46     | 49,5  | 0,664                   |
| Riboflavina (mg)   | 1,7  | 1,03 $\pm$ 0,65   | 60,7  | 0,99 $\pm$ 0,64     | 58,4  | 0,501                   |
| Niacina (mg)       | 17,8 | 10,1 $\pm$ 6,0    | 56,8  | 10,1 $\pm$ 7,3      | 56,8  | 0,914                   |
| Vitamina B6 (mg)   | 2,6  | 0,92 $\pm$ 0,42   | 35,6  | 0,96 $\pm$ 0,92     | 37,3  | 0,366                   |
| Vitamina B12 (ug)  | 2,5  | 4,2 $\pm$ 12,2    | 154   | 4,1 $\pm$ 12,6      | 144   | 0,295                   |
| Ácido Fólico (ug)  | 460  | 148,2 $\pm$ 124,1 | 32,2  | 160,1 $\pm$         | 35,4  | 0,916                   |
| Ácido Ascórbico    | 80   | 56,6 $\pm$ 39,1   | 70,8  | 71,1 $\pm$ 95,6     | 89,1  | 0,173                   |

El valor *p* se calculó con la prueba U de Mann-Whitney bilateral.  $\bar{X}$ : Media, DE: Desviación estándar, PA: Porcentaje de adecuación.

## Anexo 12

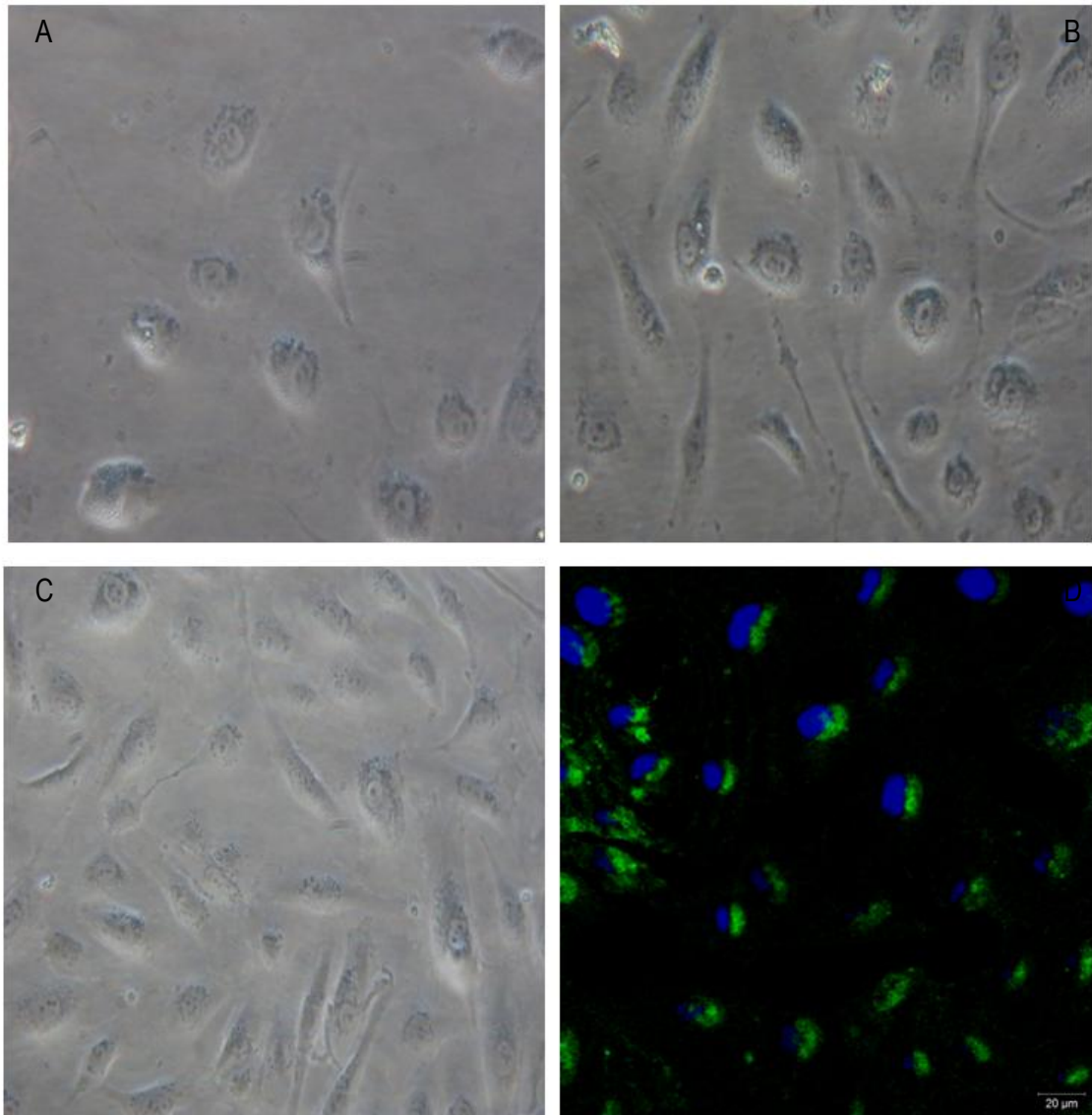
### Correlaciones entre el %ΔVMF y el EFE por grupos



Las gráficas **A y B** muestran la correlación entre %ΔVMF y el EFE en el grupo control (círculos de color azul) y el grupo con antioxidantes (triángulos de color rojo) antes de iniciar el estudio. **Graficas C y D** muestran la correlación entre %ΔVMF y el EFE entre la Post-intervención de gestación, en grupo control y tratado con antioxidantes respectivamente. Las líneas curvadas delimitan el IC del 95% de la media. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) a un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

### Anexo 13

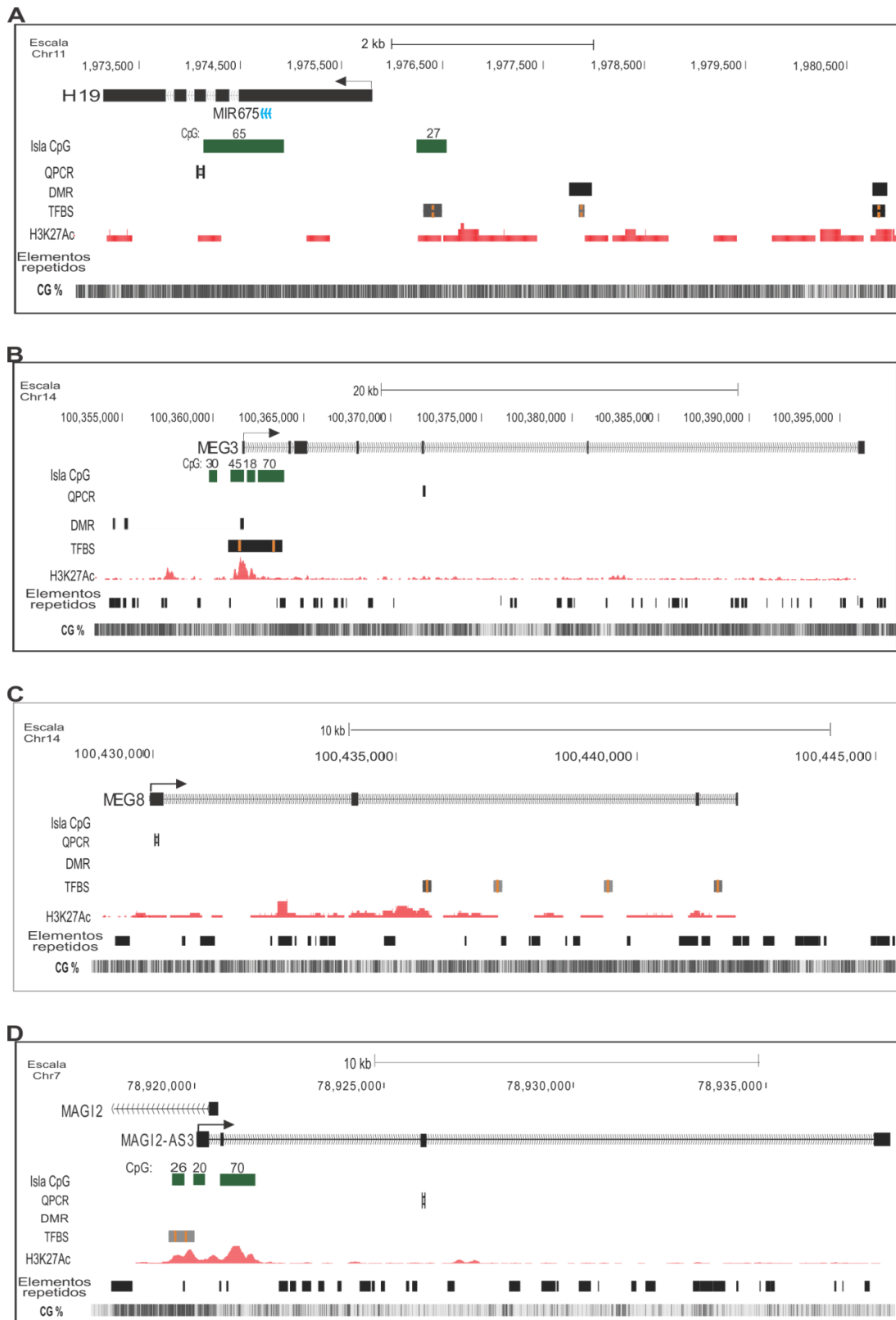
#### Imágenes de cultivo de células endoteliales

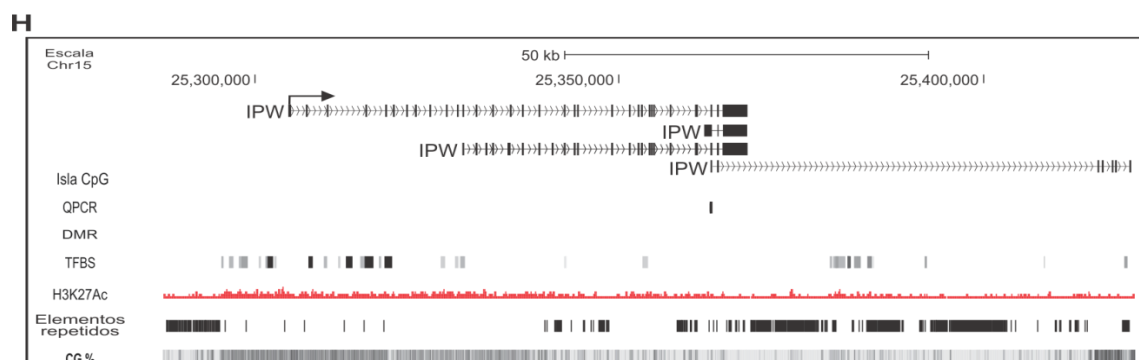
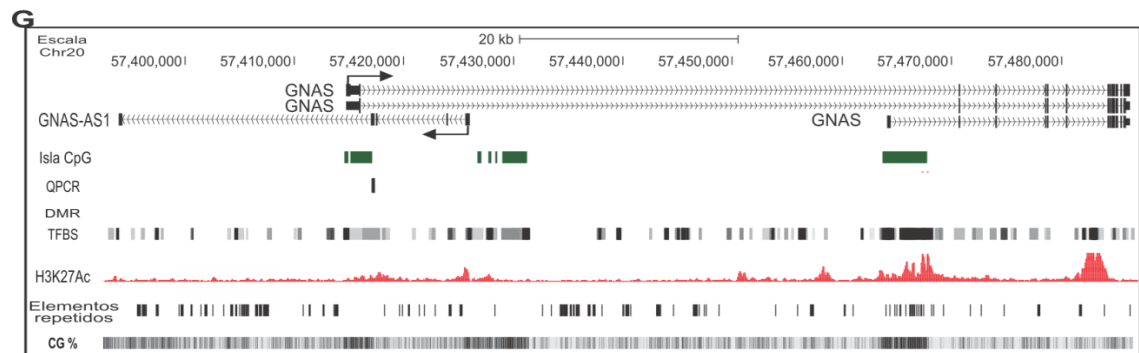
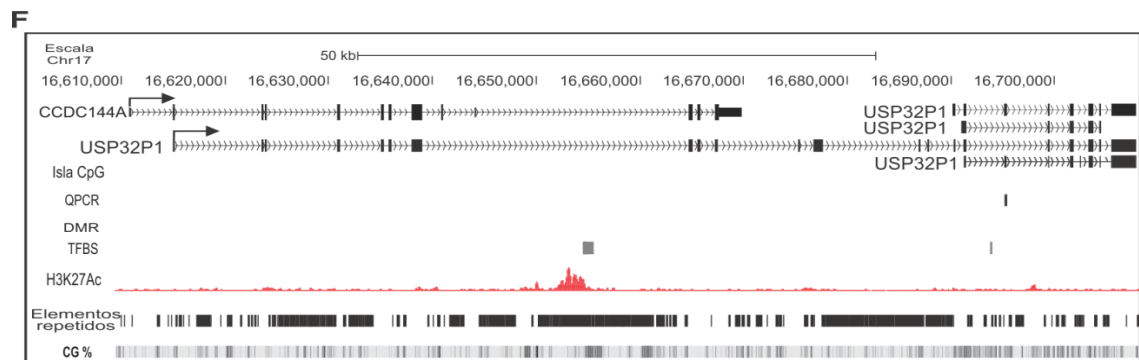
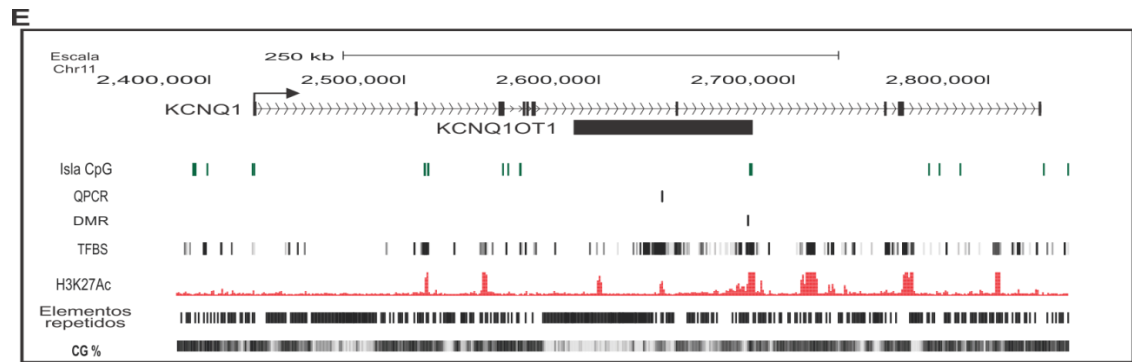


Observación microscópica con el objetivo de 20X de células endoteliales de la vena de cordón umbilical en cultivo. **A.** 24 horas. **B.** 48 horas y **C.** 96 horas. **D.** Inmunofluorescencia con anti-CD31 (color verde) y DAPI (fluorescencia azul) para confirmar la pureza del cultivo.

## Anexo 14

### Mapas génicos de lncRNAs evaluados por RT-PCR en placenta

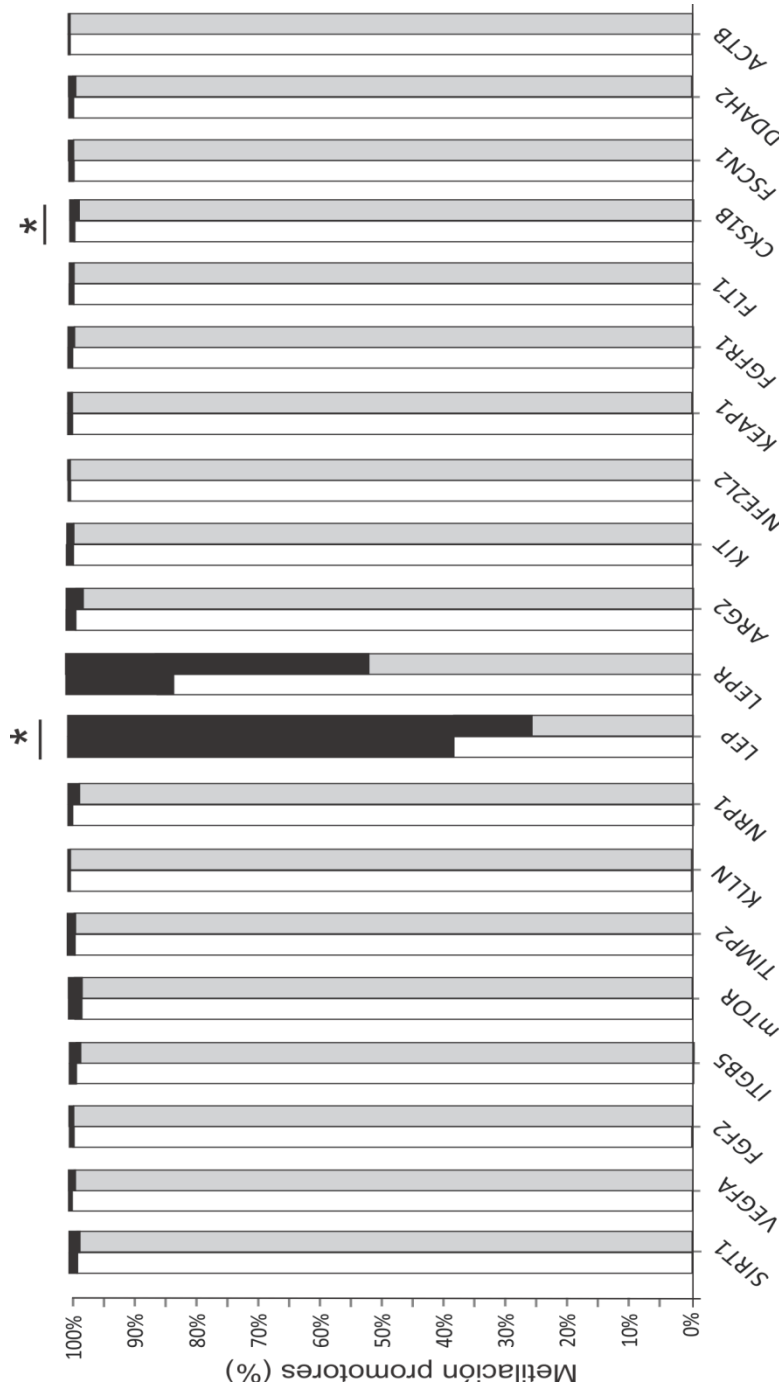




A. Gen H19 B. Gen MEG3. C. Gen MEG8. D. Gen MAGI-AS3. E. Gen KCNQ1OT1. F. Gen USP32P1. G. Gen GNAS-AS1. H. Gen IPW QPCR: Región amplificada. TFBS: Sitios de unión de factores de transcripción. H3K27Ac: Acetilación de la Histona 3 en la lisina 27.

## Anexo 15

Metilación en placenta de regiones promotoras de genes relacionados con angiogénesis y biodisponibilidad del NO



Porcentaje de metilación de citosinas en muestras de placentas, en regiones promotoras de genes relacionados con procesos angiogénicos y de biodisponibilidad del NO. La barra de color blanco representa la media porcentual de desmetilación del grupo control. Las barras de color gris representan la media porcentual de desmetilación del grupo tratado con antioxidantes. Las barras de color negro representan la media de metilación de cada promotor evaluado. Las barras con asterisco indican diferencias significativas (calculadas con la prueba U de Mann-Whitney bilateral ( $p < 0,05$ )).

Anexo 16

Tabla de correlaciones del MDA plasmático de sangre de cordón umbilical con variables maternas en primer y tercer trimestre

| Parámetro         |                          | MDA sangre de cordón |              |                     |          |
|-------------------|--------------------------|----------------------|--------------|---------------------|----------|
|                   |                          | Grupo control        |              | Grupo Antioxidantes |          |
|                   |                          | <i>Rho</i>           | <i>P</i>     | <i>Rho</i>          | <i>P</i> |
| Semana 16-20      | Edad (años)              | 0.077                | 0.754        | -0.058              | 0.782    |
|                   | Peso (Kg)                | -0.191               | 0.434        | 0.058               | 0.784    |
|                   | Talla (cm)               | -0.299               | 0.213        | 0.280               | 0.175    |
|                   | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | -0.016               | 0.949        | -0.037              | 0.862    |
|                   | Grasa corporal (%)       | -0.074               | 0.764        | 0.196               | 0.347    |
|                   | TAS (mm de Hg)           | -0.069               | 0.778        | -0.044              | 0.835    |
|                   | TAD (mm de Hg)           | -0.163               | 0.506        | 0.036               | 0.865    |
|                   | ΔVMF                     | 0.136                | 0.578        | -0.360              | 0.084    |
|                   | VMFn                     | 0.183                | 0.452        | -0.309              | 0.142    |
|                   | MDA (uM)                 | 0.544                | <b>0.016</b> | 0.279               | 0.187    |
|                   | Adiponectina (ug/mL)     | 0.378                | 0.225        | 0.160               | 0.584    |
|                   | Leptina (ng/mL)          | -0.392               | 0.208        | -0.147              | 0.615    |
|                   | CRP (mg/mL)              | -0.382               | 0.247        | 0.029               | 0.923    |
|                   |                          |                      |              |                     |          |
| Post-intervención | Peso (Kg)                | -0.248               | 0.321        | -0.008              | 0.969    |
|                   | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | -0.142               | 0.573        | -0.105              | 0.619    |
|                   | Grasa corporal (%)       | -0.056               | 0.826        | 0.288               | 0.163    |
|                   | TAS (mm de Hg)           | -0.178               | 0.481        | 0.133               | 0.528    |
|                   | TAD (mm de Hg)           | -0.263               | 0.292        | 0.159               | 0.448    |
|                   | ΔVMF                     | -0.096               | 0.705        | -0.075              | 0.722    |
|                   | VMFn                     | -0.102               | 0.687        | 0.075               | 0.722    |
|                   | MDA (uM)                 | 0.121                | 0.633        | -0.178              | 0.395    |
|                   | Adiponectina (ug/mL)     | 0.384                | 0.272        | -0.112              | 0.729    |
|                   | Leptina (ng/mL)          | -0.517               | 0.085        | -0.110              | 0.721    |
|                   | CRP (mg/mL)              | -0.035               | 0.914        | 0.068               | 0.817    |

Se calcularon con el coeficiente de *rho* de Spearman a un nivel de significancia 0,05 bilateral.

## Anexo 17

Tabla de análisis de las variables morfométricas de placenta

| Parámetro           | Grupo Control |                   |             | Grupo Antioxidantes |                  |             | <i>p</i><br>Intergrupos |
|---------------------|---------------|-------------------|-------------|---------------------|------------------|-------------|-------------------------|
|                     | n             | $\bar{x} \pm DE$  | IC 95%      | n                   | $\bar{x} \pm DE$ | IC 95%      |                         |
| Peso (gr)           | 66            | 449,5 $\pm$ 100,1 | 424,9-474,1 | 73                  | 460,0 $\pm$ 88,5 | 439,3-480,7 | 0,514                   |
| Grosor (cm)         | 66            | 1,32 $\pm$ 0,33   | 1,24 -1,40  | 71                  | 1,37 $\pm$ 0,43  | 1,27 – 1,47 | 0,451                   |
| Diámetro (cm)       | 53            | 18,5 $\pm$ 1,8    | 18,0-19,0   | 71                  | 18,8 $\pm$ 2,7   | 18,1-19,4   | 0,546                   |
| Circunferencia (cm) | 66            | 56,8 $\pm$ 4,8    | 55,6-58,0   | 71                  | 57,3 $\pm$ 4,5   | 56,2-58,4   | 0,514                   |

La diferencia entre grupos fue estimada por la prueba t de Student para muestras independientes.  $\bar{x}$ : Media, DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza de la media.