

**EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS QUE CONTROLAN EL MECANISMO DE
DEFENSA ANTI ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PLACENTA**

FRANKLY JAVIER URBANO CERON



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2014

**EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS QUE CONTROLAN EL MECANISMO DE
DEFENSA ANTI ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PLACENTA**

FRANKLY JAVIER URBANO CERON

Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en Ciencias Biomédicas

DIRECTORA

ANA CECILIA AGUILAR DE PLATA

CO-DIRECTOR

ANDRES ORLANDO CASTILLO



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2015

La tesis de grado titulada “Evaluación de proteínas que controlan el mecanismo de defensa anti estrés oxidativo en la placenta”, presentado por el estudiante FRANKLY JAVIER URBANO CERON, para optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

ANA CECILIA AGUILAR DE PLATA
Facultad de Salud -Universidad del Valle
Director

ANDRES ORLANDO CASTILLO
Facultad de Salud -Universidad del Valle
Co-Director

JOSE MARIA SATIZABAL
Jurado

ADOLFO CONTRERAS RENGIFO
Jurado

ENRRIQUE HERRERA CASTAÑEDA
Jurado

Ciudad y fecha

Santiago de Cali, febrero 6 de 2015

Dedicatoria:

Este trabajo está dedicado, a mi hijo José Miguel, quien ha sido fuente de mi inspiración y su existencia me mantiene siempre en pie.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a los Doctores Ana Cecilia Aguilar de Plata y Andres Orlando Castillo por haberme dado la oportunidad de ser parte del su grupo de investigación; su colaboración, apoyo y soporte académico han sido fundamentales para el desarrollo de este proceso.

Mi gratitud al Doctor Harry Pachajoa Ramirez, quien apoyo este trabajo en conjunto con la universidad ICESI.

Por la amistad, apoyo y ayuda durante este proceso quiero agradecer a mis compañeros del grupo de Nutrición.

A mi familia por su amor incondicional, entendimiento, soporte y colaboración durante estos años.

A las entidades financiadoras de este trabajo, el Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología (Colciencias), La Fundación para el desarrollo de la Investigación del Banco de la Republica, la Fundación FES, la Universidad del Valle y la Universidad ICESI.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
AGRADECIMIENTOS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
 CAPITULO 1: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUE MODULAN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN MUJERES GESTANTES QUE SUFREN PREECLAMPSIA.	 9
1. RESUMEN	9
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. ANTECEDENTES	12
3.1 Nrf2 y Keap 1 como controladores de estrés oxidativo	13
3.2 Relación de Nrf2 y Keap1 en preeclampsia	14
4. MARCO TEORICO	15
4.1 Preeclampsia.	15
4.2 Placenta.	17
4.3 Relación preeclamsia y respuesta antioxidante en placenta.	18
4.4 Sistema Keap1 - Nrf2 – ARE.	19
4.5 Epigenetica en preeclampsia.	20
5. OBJETIVOS.	22
5.1 Objetivo General.	22
5.2 Objetivos específicos.	22
6. MATERIALES Y METODOS.	23
6.1 Diseño metodológico.	23
6.2 Selección de muestras.	23
6.3 Evaluación de la expresión de proteínas keap1 y nrf2 en placenta.	24
6.3.1 Extracción de Proteína Total de Placenta.	24
6.3.2 Western Blot.	25
6.3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.	25

6.3.2.2	Electro transferencia (Blotting)	25
6.3.2.3	Inmuno Blot.	26
6.3.2.4	Revelado.	26
6.4	Extracción de ADN de Placenta.	27
6.5	Análisis de metilación de los promotores de Keap1 y Nrf2.	27
6.6	Análisis estadístico.	28
6.7	Consideraciones Éticas.	29
7.	RESULTADOS.	30
7.1	Análisis por Western Blott de las muestras de placenta y evaluación del estado de metilación de las regiones promotoras.	30
8.	DISCUSIÓN.	34
9.	CONCLUSIONES	38
10.	BIBLIOGRAFIA.	39

CAPITULO 2: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE MODULAN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN MUJERES PRIMIGESTANTES QUE RECIBIERON TRATAMIENTO CON MICRONUTRIENTES.		45
1.	RESUMEN.	45
2.	JUSTIFICACIÓN.	48
3.	ANTECEDENTES	50
3.1	La mala nutrición durante el embarazo y los efectos sobre la descendencia	50
3.2	Efecto de la dieta en procesos epigenéticos.	51
3.3	Estrés oxidativo y respuesta antioxidante en el embarazo.	52
4.	MARCO TEÓRICO.	55
4.1	Nutrición en el Embarazo.	55
4.2	Función de los Micronutrientes antioxidantes.	57
4.2.1	Vitamina C.	57
4.2.3	Vitamina E	58
4.2.4	Selenio.	59
4.2.5	Vitamina A y Carotenoides	60
4.2.6	Nicotinamida.	63

4.2.8	Zinc.	63
4.3	Mecanismos epigenéticos en la programación fetal.	65
4.4	El estrés oxidativo.	68
4.5	Mecanismo de respuesta antioxidante	70
5.	OBJETIVOS.	72
5.1	Objetivo General	72
5.2	Objetivos específicos	72
6	MATERIALES Y METODOS.	73
6.1	Diseño metodológico.	73
6.2	Selección de muestras.	73
6.3	Evaluación de la expresión de proteínas keap1 y nrf2 en placenta.	74
6.3.1	Extracción de Proteína Total de Placenta.	74
6.3.2	Western Blot.	75
6.3.2.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.	75
6.3.2.2	Electro transferencia Blotting	75
6.3.2.3	Inmuno Blott.	75
6.3.2.4	Revelado.	76
6.4	Extracción de ADN de Placenta.	76
6.5	Análisis de metilación de los promotores de Keap1 y Nrf2.	77
6.6	Análisis estadístico.	78
7.	RESULTADOS.	79
7.1	Evaluación de los niveles de las proteínas Nrf2 y Keap1.	79
7.2	Estado de metilación de los genes Nrf2 y Keap1.	83
8.	DISCUSION.	85
9.	CONCLUSIONES.	91
10.	PERSPECTIVAS	92
11.	BIBLIOGRAFÍA	93

LISTA DE ABREVIATURAS

RLO	Radicales libres de oxígeno
RLN	Radicales libres de nitrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
MDA	Malondialdehído
GSH	Glutathión
PGF-2 α	F2 α -prostaglandinas
oxLDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
SOD	Super oxido dismutasa
CAT	Capacidad antioxidante total
mRNA	<i>Ribonucleic acid messenger</i>
GSR	Glutathión reductasa
IMC	Índice de masa corporal
PE	Preeclampsia
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
OH	Hemo Oxigenasa
Gpx	Glutathión Peroxidasa
EO	Estrés Oxidativo
Cys	Cisteína
miRNA	<i>Micro Ribonucleic acid messenger</i>
ADAM	Adenosin deaminasa
LEP	Leptina
CGB	Transcortina
Pappa	Proteína A asociada al embarazo
SDS- PAGE	Dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida
kDa	Kilo Daltons
TBST	<i>Buffer Tris NaCl – Tween</i>
UV	Ultravioleta
Q-PCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

CT	<i>Cycle threshold</i>
kDa	Kilo Dalton
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
RCIU	Restricción del crecimiento intrauterino
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1
NQO2	NRH quinona oxidoreductasa 2
GST	Glutation S trasferasa
GCS	Glutamato cisteína sitetasa
AA	Acido Ascorbico
TRs	Tioredoxin reductasas
AR	Acido retinoico
RAR	Receptores de ácido retinoico
RXR	Receptores retinoides X
ERAR	Elementos de respuesta a ácido retinoico
RHT	Receptores de hormona tiroidea
UI	Unidades Internacionales
DNMT	ADN metiltransfererasas
SAM	S-adenosilmetionina
MAT	Metionina adenosil transferasa
NO	Oxido nítrico
FES	Fundación para la Educación y Desarrollo Social

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1.

	Pag
Figura 1 Resumen de la patogénesis de la preeclampsia.	15
Figura 2 Western Blot de las proteínas de interés. Cada banda representa muestras de placenta del grupo de preeclampsia	31
Figura 3 Diagramas de barras para el nivel de proteínas y estado de metilación para los dos genes.	32
Figura 4 Gráficos de dispersión para la correlación del nivel Keap1 y las variables diámetro, grosor y peso de la placenta.	33

Capítulo 2.

Figura 1 Esquema del mecanismo de respuesta antioxidante mediado por Nrf2/ARE.	71
Figura 2 Western Blot para las muestras de estudio.	80
Figura 3 Diagrama de barras para el nivel de proteínas Keap1 y Nrf2 en los grupos de estudio.	83

LISTA DE TABLAS

Capítulo 1

	Pag
Tabla 1 Datos de la concentración de proteína estándar.	24
Tabla 2 Características de las gestantes.	30
Tabla 3 Nivel de proteínas y estado de metilación de las regiones promotoras	31
Tabla 4 Correlación de Keap1 y Nrf2 con co-variables en el grupo de gestantes que sufrieron Preclampsia.	33

Capítulo 2

Tabla 1 Características de las gestantes y de la placenta.	79
Tabla 2 Cuantificación de Nrf2.	81
Tabla 3 Cuantificación de Keap1.	81
Tabla 4 Niveles de proteínas y estado de metilación de las regiones promotoras de los genes en los grupos de estudio.	82
Tabla 5 Correlación del nivel de Keap1 y Nrf2 con co-variables clínicas en el grupo control.	84
Tabla 6 Correlación de expresión de Keap1 y Nrf2 con co-variables clínicas en el grupo de gestantes suplementado con micronutrientes.	84

CAPITULO 1

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUE MODULAN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN GESTANTES CON PREECLAMPSIA.

1. RESUMEN.

La preeclampsia es un desorden del embarazo que afecta entre el 7 y el 10% de las gestantes. Es una enfermedad que se caracteriza por tener origen multisistémico y es la principal causa de morbilidad y mortalidad en madres, feto y neonatos. Se desarrolla a partir de la semana 20 del periodo gestacional o frecuentemente al término del mismo, se presenta como una triada de signos como edema, presión arterial elevada y en algunos casos proteinuria. La preeclampsia se ha relacionado con el estado de estrés oxidativo de la circulación materna.

La placenta es un órgano transitorio con una alta actividad metabólica y biosintética, debido a que es responsable del control del transporte de nutrientes y desechos durante el embarazo y es susceptible al daño oxidativo debido a posible deficiencia en la respuesta antioxidante. En estado de preeclampsia los efectos de la baja perfusión sanguínea son mayores, lo cual conlleva a hipoxia tisular con el subsecuente aumento del estrés oxidativo y se ha observado también disminución de algunos marcadores de defensa antioxidante. Las proteínas Nrf2 y Keap1 son dos factores de transcripción encargados de modular la respuesta antioxidante y son pocos los estudios que se han adelantado en relación con su función en preeclampsia. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de Nrf2 y Keap1 en la placenta y establecer la asociación con los eventos de preeclampsia en las gestantes.

Para alcanzar los objetivos se utilizaron muestras de placenta e información de la base de datos sociodemográficos del ensayo clínico “Efecto de los micronutrientes y del ejercicio en el embarazo, sobre factores relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles” código: NCT00872365, se

seleccionaron muestras de de mujeres embarazadas sanas y de aquellas que manifestaron preeclamsia al final del embarazo. Las muestras fueron lisadas para obtener el extracto de proteína total. Estos extractos se analizaron utilizando la técnica de inmuno-detección por Western Blot y el nivel de las proteínas Nrf2 y Keap1 se cuantificó por densidad óptica. Los resultados encontrados en este trabajo muestran que en la placenta de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, los niveles de Nrf2 tienden a ser más elevados, en contraposición con los niveles de Keap 1 que se pueden encontrar bajos. También las regiones promotoras de los genes de Nrf2 y Keap1 se encontraron totalmente desmetiladas. Por tanto los mecanismos que regulan los niveles de Nrf2 y Keap1 en preeclampsia no son explicables a través de la metilación del ADN.

Palabras Claves: preeclampsia, epigenética, estrés oxidativo, factores nucleares, Keap1, Nrf2, metilación del ADN, respuesta antioxidante, placenta, enfermedades crónicas,

2. JUSTIFICACIÓN

En el mundo cerca de 500 mil mujeres embarazadas mueren cada año durante el parto, de estas muertes, entre el 10 y el 15 % son atribuidas a la preeclampsia y en Colombia cerca del 42 % de los casos de patologías del embarazo corresponden a esta enfermedad . Esta patología se encuentra asociada a la muerte perinatal con una tasa del 10% anual y se ha convertido en tema de salud pública porque afecta a un número representativo de la población gestante. Algunas investigaciones indican que la disfunción endotelial generalizada y promovida por factores inmunológicos, genéticos y hereditarios pueden estar influenciando sobre la patogénesis de la preeclampsia, también se ha encontrado que las mujeres que sufren trastornos de este tipo durante el embarazo, presentan estados de estrés oxidativo elevado en comparación con mujeres sanas.

Se conoce que el estrés oxidativo en las células se caracteriza por el aumento de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres de nitrógeno (RLN), y que una forma de contrarrestar el efecto de estas moléculas pro-oxidantes, es la eficiente respuesta celular antioxidante. Dos proteínas asociadas con la regulación de la respuesta de antioxidantes son Nrf2 y Keap1, las cuales se activan en presencia de moléculas pro-oxidantes, por lo tanto es de nuestro interés saber si existe alguna relación entre el nivel de dichas proteínas en placenta y la preeclampsia de la mujer en embarazo, como una forma de contribuir al conocimiento de la etiología de esta enfermedad y a futuro se puedan diseñar estrategias encaminadas a la prevención de la misma.

3. ANTECEDENTES

Existen estudios que asocian la preeclampsia en el embarazo con los altos niveles de estrés oxidativo y la disminuida capacidad anti oxidante. Un estudio reciente en el cual se evaluó el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO) en arterias uterinas utilizando un modelo animal, mostró que el tejido vascular presenta una mayor producción de ERO's en aquellas muestras que provenían de especímenes en embarazo comparado con muestras tomadas a ejemplares no embarazadas¹, en otro estudio en el cual se tomaron muestras a 25 pacientes que presentaron preeclampsia y a 20 mujeres sanas, encontró que el Índice de Estrés Oxidativo en sangre materna y de cordón, aumentó significativamente en preeclámticas al comparar con el grupo de gestantes sanas². De igual manera, Shaker *et al* (2013), incorporaron en su estudio a 25 pacientes que presentaron preeclampsia y los parearon con igual número de pacientes sanas para establecer las implicaciones de algunos marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica en preeclampsia. Encontraron que los niveles de malondialdehído (MDA) marcador de peroxidación lipídica e indicador de estrés oxidativo en tejido placentario, fue significativamente alto comparado con el grupo control, demostrando alto estado de estrés oxidativo en pacientes con trastornos hipertensivos como la preeclampsia³. Rani *et al* (2010) realizaron un estudio similar en la India, donde se recolectaron 60 placentas, 30 de las cuales pertenecían a mujeres que sufrieron preeclampsia y 30 pacientes normotensas. En esta investigación se evaluaron marcadores de estrés oxidativo en la placenta, y se halló que los niveles de pro oxidantes medidos como MDA, fueron significativamente altos en placentas de mujeres preeclámticas, por otro lado, los niveles de antioxidantes medidos como glutatión (GSH) fueron bajos en este grupo comparado con gestantes normales, la sensibilidad y especificidad del método fue del 87% en la medida del MDA y para el caso del GSH la especificidad y sensibilidad fueron del 77%⁴. En concordancia con el estudio anterior, Genc H *et al* (2011), evaluaron marcadores de estrés oxidativo como MDA, F2 α -prostaglandinas (PGF-2 α) y LDL oxidada (oxLDL), así como parámetros de estado antioxidante, super

óxido dismutasa (SOD) y capacidad antioxidante total (CAT), en sangre de gestantes que presentaron preeclampsia *versus* gestantes normales. Sus hallazgos mostraron que hacia las semanas 10-14 y 20-24 de gestación, los niveles de MDA, PGF-2 α y oxLDL fueron significativamente altos ($p < 0,001$), mientras que los de SOD y CAT fueron significativamente bajos ($p < 0,001$, $p < 0,05$ respectivamente), al comparar con los valores obtenidos para las mismas variables en gestantes sanas. Este comportamiento en los marcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en el grupo de preeclámpticas ponen de manifiesto su asociación con la etiología de la preeclampsia⁵.

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de preeclampsia y se encuentra aumentado en la placenta en la etapa temprana de la enfermedad estimulando la producción de factores circulantes que generan síndromes maternos⁶. Se ha encontrado que en preeclampsia las ERO están incrementadas, mientras que los niveles de enzimas detoxificantes están reducidos⁷. De acuerdo con lo anterior, Stepan *et al.* (2004) encontraron una correlación entre la perfusión uteroplacental y la disminución de la capacidad antioxidante en plasma. Ellos demuestran que hacia el segundo trimestre, embarazadas con perfusión uterina patológica se caracterizan por tener disminuida la capacidad antioxidante total en la circulación materna⁸.

3.1 Nrf2 y Keap 1 como controladores de estrés oxidativo

El complejo Keap1 – Nrf2 contribuye al control y regulación del mecanismo de defensa celular. Harvey *et al* (2009), utilizaron fibroblastos embrionarios y de pulmón provenientes de ratones que no expresan Nrf2 y encontraron que los niveles de mRNA, de proteína y de actividad de glutatión reductasa (GSR), enzima antioxidante, fueron bajos comparados con aquellas células de ratón del tipo salvaje que expresaron Nrf2, indicando la influencia de Nrf2 en la regulación del sistema antioxidante en la célula⁹. En esta línea Vasanthi *et al* (2012), estudiaron el efecto del ejercicio sobre el miocardio del corazón de ratones salvajes Knock-out para la expresión de Nrf2, y encontraron que en

este tipo de tejido, el estrés oxidativo aumentó al comparar con ratones salvajes normales y sedentarios¹⁰. Simonds *et al* (2011), evaluaron el efecto de metales pesados sobre la expresión de Nrf2 en cinco líneas celulares humanas diferentes, puesto que se conoce que los metales pesados inducen estrés oxidativo en la célula. Estos investigadores usaron un gen reportero de la enzima lucifereasa en cada línea celular. Los resultados mostraron que la potencia de activación de Nrf2 aumentó con la exposición a cada metal, pero la respuesta fue heterogénea para las líneas celulares, lo que pone de manifiesto que el comportamiento de la expresión del Nrf2 varía con el tipo de tejido ante el aumento del estrés oxidativo¹¹.

3.2 Relación de Nrf2 y Keap1 en preeclampsia

Wruck *et al.* (2009) presentaron los primeros datos experimentales que muestran el aumento de la actividad de Nrf2 dentro del citotrofoblasto de placentas preeclámpicas comparados con gestantes normales tomadas como grupo control y sugieren que existe una relación directa entre el mecanismo de defensa celular contra estrés oxidativo y la toxicidad en la placenta como parte de la etiología de la preeclampsia¹². Sin embargo, son necesarios los estudios con respecto a la función de Nrf2 y Keap1 en preeclampsia.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1 Preeclampsia.

Es un síndrome sistémico común en el embarazo y aparece como la principal causa de morbilidad y mortalidad en la madre y el infante. Una inadecuada o fallida invasión del trofoblasto y la consecutiva remodelación deficiente de las arterias espirales, están asociadas con preeclampsia¹³. Numerosas teorías sobre los mecanismos fisiopatológicos de la preeclampsia han sido planteadas, pero hasta ahora no existe una causa unificada conocida¹⁴.

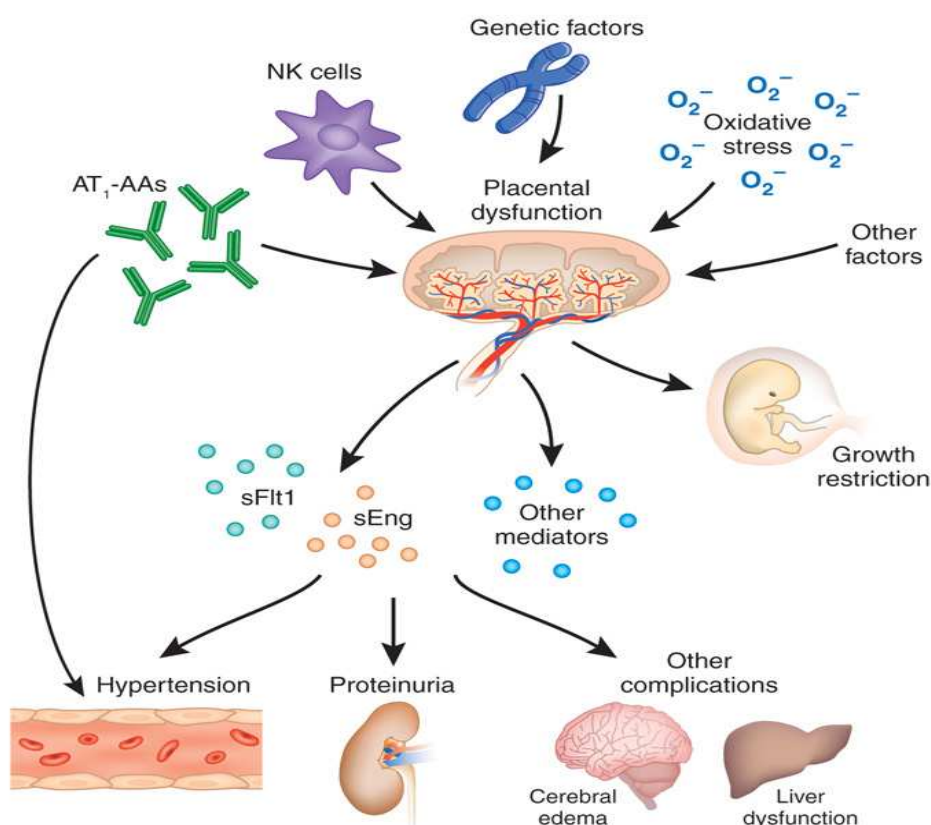


Figura 1. Resumen de la patogénesis de la preeclampsia; anticuerpos activados por los receptores tipo I de la angiotensina II (AT-AAs), factores inmunológicos, estrés oxidativo, y otros factores (como aumento del factor de hipoxia), pueden provocar disfuncionalidad en la placenta, esto conlleva a la liberación de factores antiangiogénicos (como [sFlt1] y endoglina soluble [sEng]) para producción preeclampsia. NK: *natural killer*. Tomado de: Nature Medicine 14, 810 - 812 (2008)

De acuerdo con los criterios de *“National High Blood Pressure Education Program Working Group report on High Blood Pressure in Pregnancy”*, la definición aceptada de preeclampsia es el diagnóstico de hipertensión inducida con presión diastólica de 90 mmHg medida después de las 20 semanas de gestación y proteinuria que se puede presentar como 300 mg de proteína por día o relación de proteína/creatinina de 30 mg/ml. Cuando la paciente presenta disfunción hepática, trombocitopenia y hemólisis, la preeclampsia se clasifica como Síndrome de HELLP¹⁵.

Aunque la definición está enfocada en simples medidas de parámetros clínicos, la preeclampsia se reconoce como un desorden multi sistémico, el cual puede afectar el cerebro, pulmones, riñón e hígado. Se cree que la preeclampsia se presenta en dos estados: El primero es reducción de la perfusión placentaria, a menudo secundaria a la anormal implantación y desarrollo de la vasculatura placentar. El segundo estado es la respuesta materna a esta condición, se caracteriza por inflamación generalizada y disfunción de las células endoteliales maternas¹⁶. El sobrepeso y el estrés oxidativo predisponen a la mujer para un leve y severo desorden hipertensivo del embarazo y los mecanismos que explican esta condición no han sido bien estudiados. Estudios de cohorte predominantemente de casos de preeclampsia leve, muestran la fuerte relación lineal entre índice de masa corporal (IMC) y riesgo de preeclampsia, medidas como Proteína C reactiva, un marcador de inflamación sistémica y triglicéridos¹⁷. Otros mediadores importantes de desórdenes hipertensivos pueden ser el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina, la disfunción endotelial, función inmune reducida o factores de estilo de vida como pobre dieta prenatal o inactividad física¹⁸.

En el mundo, la incidencia de preeclampsia alcanza valores del 2-10% de los embarazos y varía según la región siendo esta patología precursora de la Eclampsia. La Organización mundial de la Salud estima que la incidencia de preeclampsia es 7 veces mayor en los países subdesarrollados que en los desarrollados. En Europa y Norteamérica el indicador de incidencia de

Eclapmsia es similar y se estima entre 5 a 7 nuevos casos por cada 10.000 partos, en contraste con los países en via de desarrollo donde el indicador es hetereogeneo, tomando valores desde 1 caso por cada 100 embarazos a 1 caso por cada 1700 embarazos, en Colombia el 42% de las patologías del embarazo corresponden a preeclampsia y existe una proporción de mortalidad perinatal del 10% de los casos de desordenes hipertensivos^{18,19,20, 21}.

4.2 Placenta.

La placenta humana es un órgano transitorio que permite el desarrollo del feto. Se origina con la implantación de blastocisto en la pared endometrial del útero, en este proceso se forma el saco coriónico que se ha incluido por sí mismo en el endometrio. En el embrión, Las células del trofoblasto de rápido crecimiento se diferencian en citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, esta última capa celular invade la pared endometrial erosionando las células a través de procesos enzimáticos. Con el avance de este proceso aparecen proyecciones celulares del sincitiotrofoblasto formando las vellosidades coriónicas primarias, las cuales se consideran como la unidad estructural y funcional de la placenta. Las vellosidades coriónicas, se presentan como un tejido estructurado cerca del día 21 de gestación²².

La placenta se comporta como órgano feto-materno constituido por dos porciones de tejido, la porción fetal que se desarrolla a partir del saco coriónico y la porción materna derivada del endometrio o decidua basal, la cual es reemplazada casi por completo por el componente fetal hacia el cuarto mes de gestación. Su forma depende del tipo de invasión realizada por parte de las vellosidades coriónicas, pero generalmente es de tipo discoideo. La placenta y el cordón umbilical facilitan o están encargados de la relación entre el feto y la madre. A través de la placenta, los nutrientes pasan de la sangre materna a la sangre fetal y los materiales de desecho del feto pasan a la madre. Las principales funciones de este órgano son: protección, nutrición, respiración, excreción y producción de hormonas²³.

El corion vellosa se une con la porción materna de la placenta por el citotrofoblasto, las vellosidades coriónicas erosionan el tejido materno para unirse firmemente a la decidua basal (endometrio). Al mismo tiempo, las arterias y venas maternas presentes pasan en forma libre a través de hendiduras en el citotrofoblasto abriéndose espacio hacia la región inter vellosa para permitir la circulación de sangre materna y que se cumpla la función de intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos²⁴. En sus inicios este proceso implica la remodelación de la pared de la arteria espiral permitiendo la desaparición de la capa muscular y el reemplazo de células endoteliales por el trofoblasto (trofoblasto endovascular)²⁵. La invasión endovascular trofoblástica es de gran importancia para la fisiología feto-placentaria: previene la conexión intra arterial del trofoblasto endovascular hasta la semana 11 de gestación, el ingreso de sangre materna al espacio inter vellosa y por tanto protege el *conceptus* de altas concentraciones de oxígeno durante este periodo crítico del desarrollo ²⁶. Adicionalmente el remodelamiento arterial deficiente está relacionado con pre-eclampsia (PE), un desorden propio de mujeres embarazadas que se manifiesta en el segundo trimestre de embarazo, con hipertensión materna y proteinuria²⁷.

4.3 Relación preeclampsia y respuesta antioxidante en placenta.

Como se ha indicado, en preeclampsia, la invasión poco profunda del trofoblasto trae como resultado la remodelación defectuosa de las arterias espirales seguida de la alta resistencia de los vasos y la baja perfusión placentaria²⁸. En consecuencia el mantenimiento de la vaso-reactividad en algunos segmentos de las arterias del miometrio implica la perfusión intermitente en el espacio intervilloso y por lo tanto la fluctuación de las concentraciones de oxígeno que repercuten en el aumento del estrés oxidativo placentario²⁹.

La exposición celular a ERO como radicales libres, peroxinitritos y lípidos peroxidados, productos de la hipoxia, activan una maquinaria genética que codifica enzimas antioxidantes. Esta respuesta coordinada es regulada por la secuencia de DNA denominada Elemento de Respuesta Antioxidante (siglas en inglés ARE) contenido en las regiones promotoras de genes denominados “guardianes o safe-guard”^{30,31}. El factor eritroride -2 (Nrf2) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son activados como consecuencia del estrés oxidativo para unirse al elemento ARE y amplificar la transcripción de genes guardianes que protegen la célula contra las ERO y un amplio rango de toxinas³². De esta manera, las células de la placenta producen varias especies antioxidantes que incluyen Hemo Oxigenasas (OH-1, OH-2), Super Oxido Dismutasa – cobre- zinc (SOD) y Glutation Peroxidasa (GPx) para contrarrestar el estrés oxidativo³³.

4.4 Sistema Keap1 - Nrf2 – ARE.

Keap1 y Nrf2 son factores de transcripción que pertenecen a una de las principales vías de regulación de defensa celular contra EO. Nrf2 es un factor nuclear de transcripción del tipo cremallera de leucina presente en casi todos los tejidos, se conoce como el principal activador de la transcripción de proteínas de respuesta antioxidante dependiente de ARE, la región con carácter básico de la proteína es la encargada de unirse al ADN, y posee otra región tipo Cap ‘N’ Collar, altamente conservada entre la familia Nrf’s. Nrf2 es regulado por la proteína citoplasmática Keap1, que lo secuestra por corto tiempo siguiendo dos probables vías: La primera se refiere a la degradación de Nrf2 a través de la formación del dímero Keap1–Nrf2, donde Keap1 tiene dominios que son reconocidos por el complejo proteico ubiquitin ligasa que en condiciones normales de las células, mantiene los niveles basales de Nrf2 por flaqueamiento continuo y degradación mediada por la ubiquitina. La segunda vía se activa cuando la presencia de ERO se encuentra exacerbada y Keap1 que actúa como un sensor de estrés oxidativo, se modifica en el residuo Cys151, permitiendo la fosforilación de Nrf2 en el residuo Ser40 con su

subsecuente liberación. Nrf2 se estabiliza en citosol, se transloca al núcleo celular donde forma heterodímeros con Maf o Jun y se une a ARE permitiendo la expresión coordinada de genes³⁴.

4.5 Epigenética en preeclampsia.

La epigenética se define como el estudio de los factores no genéticos que intervienen en la expresión de genes y que ocurre sin la modificación de la secuencia del ADN³⁹.

La generación de EROs y la alteración del metabolismo del glutatión intervienen en un numero de procesos epigenéticos entre los que se incluyen: metilación de DNA, modificación de histonas, modulación de los procesos transcripcionales por miRNA y la impronta genómica^{35,39}. Tianjiao *et al*, realizaron un análisis sistemático de patrones de metilación del DNA placentario en 24 mujeres con preeclampsia y 24 mujeres sanas, encontrando disminución de la metilación global del DNA en las placentas de preeclampsia³⁶. Wensheng *et al*, incluyeron en su estudio 43 mujeres con preeclampsia y 78 con embarazos normales, analizando muestras de sangre de cordón umbilical y determinando el estado de metilación del DNA, y se encontró hipometilación de la 11-Beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, proteína implicada en la producción de glucocorticoides fetales y cuyo estado de hipometilación está relacionado con el aumento de producción de corticoides fetales³⁷. En otro estudio Blair *et al*, analizaron el estado de metilación de genes que codifican para distintas proteínas entre las que se incluyen ADAM 12, LEP, CGB, Pappa (Adenosin deaminasa, leptina, transcortina, Proteína A asociada al embarazo) encontrando un aumento de la expresión de estos genes en placentas de pacientes con preeclampsia instaurada en el tercer trimestre, dicho aumento debido a la alteración del estado de metilación de las mismas. Lo descrito en dicho estudio puede ser de utilidad en la aplicación de métodos diagnósticos ya que es posible en la actualidad hacer una determinación sérica de estas proteínas³⁸. Otro estudios

incluyen el análisis del estado de metilación de las regiones promotoras de VEFG (factor de crecimiento endotelial) encontrando hipometilación de las mismas y aumento de la expresión de este gen en pacientes con esta patología, sin embargo hay poca literatura disponible que permita conocer el estado de metilación para Nrf2 en placentas de pacientes que sufren de preeclampsia.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General.

Estudiar las proteínas que modulan respuesta antioxidante en la placenta de mujeres que presentaron preeclampsia y su posible asociación con la enfermedad.

5.2 Objetivos específicos.

5.2.1 Evaluar el nivel de las proteínas Nrf2 y Keap1 en la placenta de mujeres diagnosticadas con preeclampsia.

5.2.3 Establecer el estado de metilación de las regiones control de los genes Keap1 y Nrf2 en la placenta de mujeres con diagnostico de preeclampsia.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Diseño metodológico.

En este estudio se utilizó un banco de muestras de placenta humana conformado previamente para la ejecución del proyecto “Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles” financiado por Colciencias/Universidad del Valle/FES (Cód. 11064592). Las placentas fueron recolectadas en el momento del parto y transportadas bajo refrigeración en buffer PBS 1X. De cada placenta se tomaron 2 muestras de tejido de la cara materna, una cerca a la inserción del cordón umbilical (fracción A) y la otra de la periferia (fracción B), estos fragmentos fueron preservados a -70 °C hasta el momento del estudio.

Se tomaron como casos aquellas madres diagnosticadas con preeclampsia de acuerdo con la base de datos del mencionado estudio.

6.2 Selección de muestras.

Las muestras de placenta tomadas para evaluar las proteínas, fueron divididas en dos grupos.

Como casos se seleccionaron aquellos códigos de gestantes del **grupo control** con diagnóstico de preeclampsia, 10 en total. Como control se tomaron 14 muestras de placenta de gestantes sanas. Para establecer el estado de metilación se utilizaron 5 muestras de DNA de placenta del grupo de preeclampsia y 5 muestras del grupo control.

6.3 Evaluación de la expresión de proteínas keap1 y nrf2 en placenta.

6.3.1 Extracción de Proteína Total de Placenta.

Preparación de las muestras:

Se tomaron 500 mg de tejido placentario (fracción A + fracción B), en 3 ml de buffer CellLytic con inhibidor de proteasas, la muestras se homogenizaron y se trataron con ultrasonido para obtener del tejido una solución homogénea, se incubó en baño frío por 30 min y se centrifugó a 1000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se mantuvo a -70 °C para preservar inocuas las proteínas de interés.

Una vez homogenizada la solución de células rotas provenientes del tejido, se procedió a cuantificar la proteína por medio de la técnica de ácido bicinoninico con kit (Sigma) en microplacas de 96 pozos teniendo en cuenta los siguientes pasos:

Preparación del reactivo de trabajo: Mezcla de 50 partes de reactivo A más una parte de reactivo B hasta obtener el color verde claro.

Curva de calibración desde 200mg/ml a 1000µg/ml en tubos ependorf de 1.5ml según tabla.

Tabla 1. Datos de la concentración de proteína estándar.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Concentración (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
Solución proteína estándar (µl)	0	12	24	36	48	60
Buffer de lisis (µl)	60	48	36	24	12	0

Se adicionaron 25 µL del blanco de cada estándar y de cada muestra en los pozos. Se adicionaron 200 µl de la solución W, Se incubó por 30 min a 37°C. Se leyó la absorbancia a 562nm.

De acuerdo con el valor de proteína total encontrado en cada muestra, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad proteína a servir en cada pozo, con el fin de encontrar la concentración que permitiera una buena separación de las proteínas durante la electroforesis. Para el caso de las muestras de placenta la mejor separación se logró con una concentración de 50 µg/µl.

6.3.2 Western Blott.

6.3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Una vez obtenida la concentración de proteína total para usar, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato de sodio ó SDS-PAGE. Este gel fue preparado en el laboratorio y consiste en dos fases de poliacrilamida a diferente concentración, la primera corresponde al gel de separación con 10 % de polímero, la segunda fase de gel es la de apilamiento contiene 4% del polímero y corresponde al lugar donde están los pozos de disposición de las muestras. Cada muestra fue sembrada intercalando los grupos de estudio, en conjunto con un marcador de peso molecular para proteínas (Bench mark). La electroforesis se llevó a cabo haciendo una pre-corrída de 30 min a 60 voltios y luego se aplicaron 125 voltios por 90min, se usó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad, empleando Tris-glicina (pH 8.8) como buffer.

6.3.2.2 Electro transferencia Blotting.

Culminado el proceso anterior y obtenido el perfil proteico, se recuperó el gel, esta vez se desechó la porción al 4% y el gel remanente, se situó sobre el soporte de nitrocelulosa, para proceder a realizar electro transferencia de las proteínas de placenta. La electro- transferencia se llevó a cabo a voltaje

constante de 100 voltios durante 90 min, se usó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad, empleando Tris-glicina (pH 8.6) como buffer a 4 °C.

6.3.2.3 Inmuno Blot.

La membrana de nitrocelulosa se incubó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas y observar el patrón de separación. Tomando como referencia el marcador de peso molecular, se realizaron cortes en la membrana, teniendo en cuenta los pesos de las proteínas de interés Keap1 (70 kDa), Nrf2 (68 kDa), β -actina (38 kDa), esta última usada como control interno para normalizar los resultados. Los fragmentos de membrana, fueron lavados con buffer TBST y se bloquearon con leche al 2% para evitar la fijaciones inespecíficas del anticuerpo primario, posteriormente se incubaron toda la noche con su respectivo anticuerpo policlonal marca Abcam, anti actina (1:2000), anti Nrf2 (1:500) y anti Keap1 (1:500). Luego cada membrana fue incubada con anticuerpo secundario (Santacruz) por 1 hora, lo cual favorece la identificación de las proteínas de interés. Finalmente se retira el anticuerpo y aplican lavados con buffer TBST.

6.3.2.4 Revelado.

En cuarto oscuro se procedió a aplicar luminol a cada membrana con el fin de generar luminiscencia en las proteínas Keap1, Nrf2 y β -Actina, se observó la presencia de bandas luminosas en cada carril de muestra a los 7 min, 2 min y 1 min respectivamente. Para medir la intensidad de las bandas se expusieron películas radiofotográficas o fotosensibles (Kodak) en cada membrana y se revelaron con soluciones de la misma casa comercial. Estas películas fueron llevadas al escáner para digitalización de las imágenes para luego cuantificar por densidad óptica utilizando el software libre Image J.

6.4 Extracción de ADN de Placenta.

De las muestras seleccionadas se realizó la extracción de ADN a partir de 30 mg de tejido de placenta usando el kit comercial All prep DNA/RNA/protein mini Kit (QIAGEN) según el protocolo suministrado por la casa comercial. Una vez extraído el ADN de cada muestra, se cuantificó su concentración y calidad, usando los valores de absorbancia a 260/280 nm por espectroscopía de UV.

6.5 Análisis de metilación de los promotores de Keap1 y Nrf2.

Para este análisis se utilizó el Kit de análisis de metilación de la casa comercial Quiagen (Analyzing EpiTect Methyl II PCR Array). El método se basó en la detección de la muestra de ADN después de digestión con una enzima de restricción sensible a metilación y una enzima de restricción dependiente de metilación, estas enzimas digieren el ADN metilado y demetilado respectivamente. En la siguiente reacción el ADN no digerido en cada reacción enzimática individual es cuantificado por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR, siglas en inglés), usando primers que flanquean la región promotora de interés. La fracción relativa de ADN metilado y demetilado es subsecuentemente determinada por la comparación de la cantidad de ADN en cada reacción simulada donde no se adiciona enzimas.

El protocolo de este sistema, utiliza el ADN previamente extraído, el cual es fraccionado en cuatro porciones iguales para digestión simulada sin enzimas, digestión con enzima de restricción sensible a metilación, con enzima de restricción dependiente de metilación y digestión con enzima dependiente de metilación y sensible a metilación. Las enzimas de restricción son mezcladas directamente con un máster-MIX para Q-PCR y son servidas en el plato de 96 pozos para Q-PCR, que contienen servidas con anterioridad las mezclas de primers según diseño del plato.

El Q-PCR se programó usando las condiciones específicas indicadas en el protocolo diseño del PCR Array, finalmente los valores de obtenidos de ΔCT fueron llevados a una planilla para análisis de datos proporcionada por la casa

comercial, la cual automáticamente calcula las cantidades relativas de fracción de ADN metilado y desmetilado.

El producto de la digestión simulada representa la cantidad de ADN de entrada detectado. En la digestión sensible a metilación (MS), la enzima de restricción digiere el ADN parcialmente metilado y demetilado. El ADN restante hipermetilado, en el cual todo los sitios CpG están metilados puede ser detectados por Q-PCR.

En la reacción de digestión dependiente de metilación (MD) la enzima de restricción preferiblemente digiere DNA metilado, el ADN desmetilado restante es detectado por Q-PCR.

En la reacción de digestión doble (MSD), ambas enzimas están presentes y todas las moléculas de DNA es decir regiones desmetiladas y metiladas son digeridas. Esta reacción mide la fracción de ADN que no fue digerida por las enzimas de restricción.

Este sistema provee el estado de metilación en porcentaje de ADN desmetilado y porcentaje de ADN metilado, lo desmetilado representa la fracción del ADN de entrada que contenía sitios CpG no metilados en la región amplificada del gen, lo metilado representa la fracción de ADN genómico de entrada que contenía 2 ó más sitios CpG metilados en la región del gen objetivo o flanqueada.

6.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS (ver 21), aplicando la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney para establecer las diferencias entre la expresión de las proteínas de estudio en los grupos, también se aplicó la prueba T de Student para determinar la diferencia entre las medias de las variables clínicas. Para determinar si existen asociaciones entre las variables y co-variables se usó la prueba estadística de correlación de Spearman.

Se aceptó el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

6.7 Consideraciones Éticas.

Las muestras de placenta manejadas en este estudio procedían de madres participantes en el proyecto “Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles” aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad del Valle (Acta No 017-08 y Acta No 04-013), las gestantes autorizaron en el consentimiento informado el uso de las muestras para posteriores estudios.

7. RESULTADOS.

En la tabla 2, se muestran los datos antropométricos de las gestantes y de la placenta.

Tabla 2. Características de las gestantes.

Grupo	Control (n=14)	Preeclampsia (n=10)	Valor de P^a
<i>Características antropométricas de las mujeres gestantes</i>			
Edad (años)	21.2 ± 3.75	20.7 ± 3,56	0.738
Peso (Kg)	61.9 ± 10.06	65.9 ± 8.18	0.311
Talla (cm)	155.9 ± 4.41	154.1 ± 6.08	0.401
IMC (Kg/m²)	25.2 ± 3.66	27.7 ± 2.94	0.084
Edad gestacional (Sem)	39.7 ± 0.85	38.1 ± 1.37	0.003*
Etnia			
Mestiza (%)	100	90	
Negra (%)	-	10	
<i>Características de la Placenta</i>			
Peso (g)	436.7 ± 102.63	436.0 ± 125.51	0.988
Diametro (cm)	14.39 ± 7.83	14.48 ± 7.88	0.979
Grosor (mm)	1.4 ± 0.32	1.0 ± 0.40	0.022*

Valores presentados como la media ± Desviación estándar (SD).

^a Estadístico de contraste T de student.

*p<0.05 comparado con embarazadas normales.

7.1 Análisis por Western Blott de las muestras de placenta y evaluación del estado de metilación de las regiones promotoras.

La cuantificación de proteínas por Western Blot muestra para Keap1, banda de 70 kDa, y en el caso de Nrf2 una banda de 68 kDa, para b-actina, la banda aparece a 38 kDa. No se observan bandas inespecíficas en el inmuno blot (figura 1). Se utiliza el mismo tejido de placenta como control positivo.

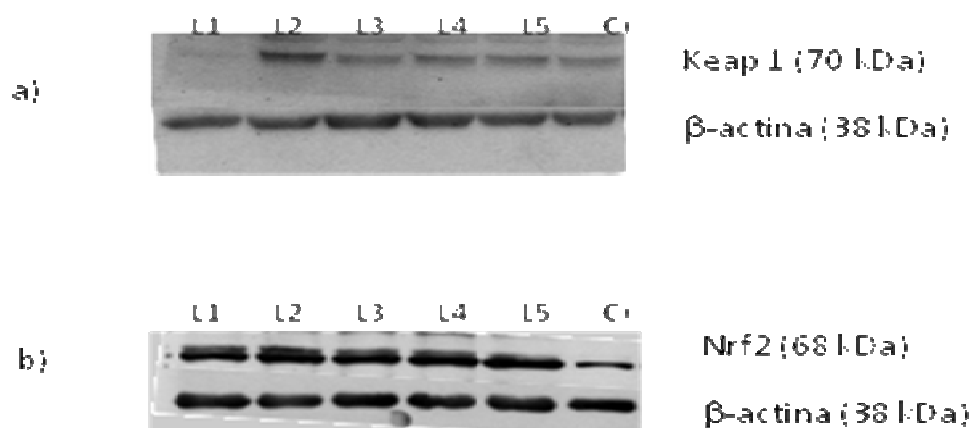


Figura 2. Western Blot de las proteínas de interés. Cada banda representa muestras de placenta del grupo de preeclampsia: a) Keap1 y b) Nrf2, la última banda corresponde al control positivo (C+).

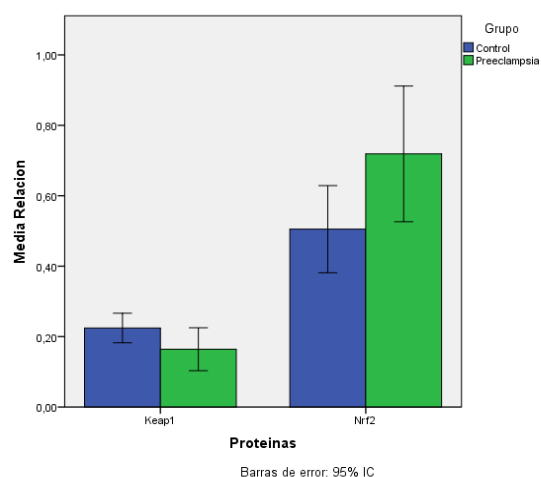
Tabla 3. Nivel de proteínas y estado de metilación de las regiones promotoras.

Grupo	Control (n=14)	Preeclampsia (n=10)	Valor de P ^a
Expresión de las proteínas en Placenta			
KEAP 1*	0.22 ± 0.07	0.16 ± 0.09	0.053
NRF2 *	0.51 ± 0.21	0.72 ± 0.27	0.084
Estado de metilación de las regiones promotoras^b			
Keap1			
Metilado (%)	0	0	
Desmetilado (%)	100	100	
Nrf2			
Metilado (%)	0	0	
Desmetilado (%)	100	100	

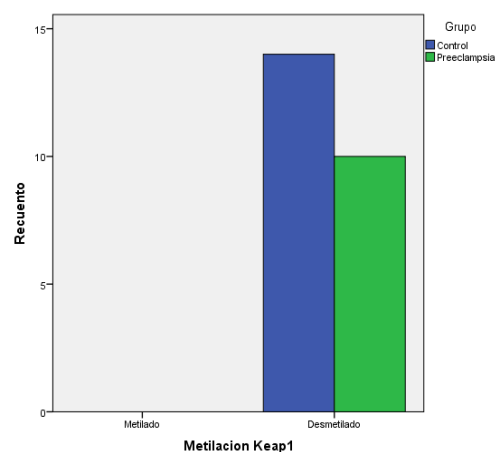
* Corresponde a la relación Proteína/β-Actina

a. Prueba U de Mann Whitney

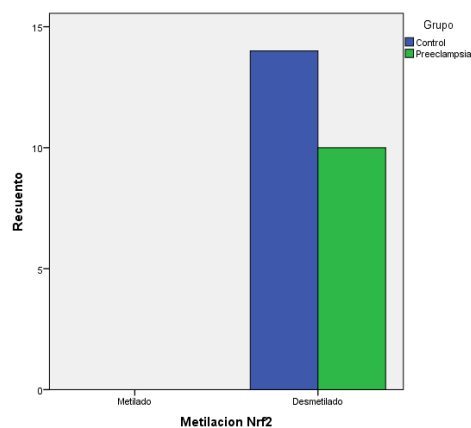
b. Estado de metilación por PCR array methylation.



a)



b)



c)

Figura 3. Diagramas de barras para el nivel de proteínas (a) y estado de metilación para los dos genes (b y c).

En la tabla 3 se observan la expresión de Nrf2 y Keap1 expresadas como relación de áreas de proteína de interés vs. área B-actina obtenida por intensidad de la banda con el software Image J.

Utilizando los valores de la tabla 3, se procedió a aplicar la prueba de rangos de Mann Whitney para comparar los niveles de las proteínas en los grupos de estudio. Se observa que los valores críticos de p en la prueba para Nrf2 y Keap1 son 0.084 y 0.053 respectivamente, indicando significancia marginal probablemente como consecuencia del tamaño de la muestra.

La correlación bi-variada de Spearman se utilizó para determinar el grado de asociación entre dos variables con muestras pequeñas. En este estudio se evaluó la asociación entre las variables resultado, expresión de Nrf2 y Keap1 frente a co-variables antropométricas como edad, peso, talla, Índice de masa corporal (IMC) y características de la placenta (peso, diámetro y grosor) en cada grupo de estudio. Los resultados de las correlaciones para el grupo de gestantes sanas no evidenciaron ningún tipo de correlación entre las variables. En el grupo de gestantes que sufrieron preeclampsia, la expresión de Keap1 presentó una correlación positiva con el peso de la placenta ($r= 0,733$; $p=0.025$), diámetro de la placenta ($r= 0,685$; $p=0.029$) y el grosor de la placenta ($r= 0,652$; $p=0.041$) (tabla 4) (grafico1).

Tabla 4. Correlación de Keap1 y Nrf2 con co-variables en el grupo de gestantes que sufrieron Preclampsia.

Variable	Nrf2		Keap1	
	r^*	P	r^*	P
Edad	-0.359	0.309	-0.097	0.789
Peso	0.030	0.934	0.200	0.580
Talla (cm)	-0.189	0.601	-0.256	0.475
IMC	0.207	0.567	0.383	0.275
Edad gestacional	-0.086	0.812	0.056	0.879
Diámetro de placenta	-0.306	0.390	0.685	0.029 [§]
Grosor de la placenta	-0.128	0.724	0.652	0.041 [§]
Peso de placenta	-0.600	0.088	0.733	0.025 [§]

*coeficiente de correlación de Spearman. [§] $p < 0.05$

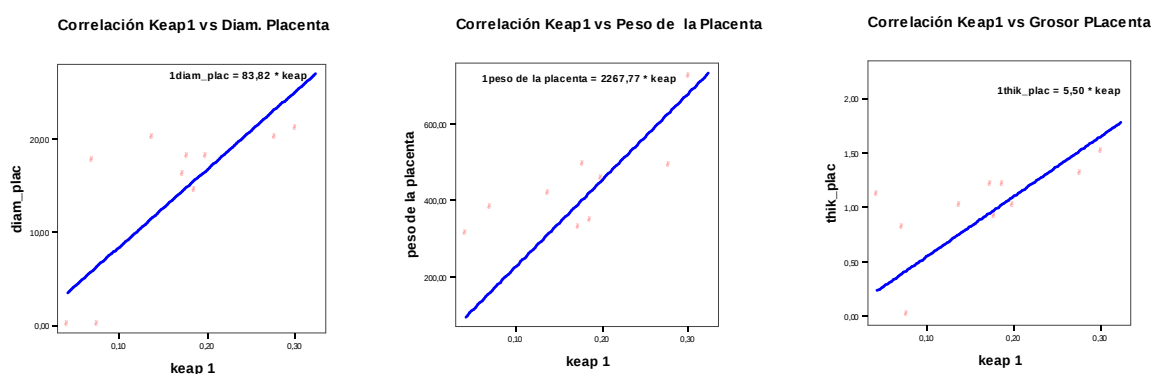


Figura 4. Gráficos de dispersión para la correlación del nivel Keap1 y las variables diámetro, grosor y peso de la placenta.

8. DISCUSIÓN.

Esta parte del estudio se enfocó en la medición del nivel de dos proteínas que modulan la respuesta antioxidante en la placenta de mujeres que sufrieron preeclampsia y cómo, estos valores pueden presentar diferencias asociadas con la enfermedad. Lo anterior para ampliar el conocimiento y entendimiento que permitan desarrollar estrategias para el manejo de esta patología y así disminuir los índices de morbi-mortalidad materna y fetal.

Keap1 y Nrf2 son dos proteínas del citosol, bien reconocidas por cumplir la función de sensor de moléculas pro-oxidantes como ERO y a su vez participar en la modulación del mecanismo de respuesta anti oxidante celular. Nrf2, actúa como factor de transcripción al unirse a la secuencia de nucleótidos ARE^{40,41}, que es el sitio del ADN donde se controla la transcripción de un conjunto de genes que están involucrados directamente con la respuesta antiredox y que se expresan de forma coordinada ante la presencia de moléculas pro-oxidantes. Por otra parte Keap1 forma un dímero con Nrf2 que en condiciones normales es degradado constantemente en el proteasoma pero ante la presencia de EO o un electrofílico, libera a Nrf2 para que se trasloque al núcleo y cumpla su función⁴².

En condiciones normales se conoce que el EO materno aumenta con el desarrollo del embarazo, de igual manera esta situación se presenta en la placenta debido a los bajos niveles de oxígeno o hipoxia del tejido placentario. En la preeclampsia, la baja perfusión sanguínea de la placenta genera hipoxia del tejido y se cree que los mecanismos de respuesta antioxidantes modulados por Keap1 y Nrf2 se encuentran activos ante el EO.

En este estudio utilizando el estadístico de contraste no paramétrico U de Mann Whitney (Tabla 3) muestra que las proteínas evaluadas probablemente tienen sociación con la enfermedad, con valores de significancia marginal de 0,053 para Keap1 y 0,084 para Nrf2 en los grupos de estudio, situación que se

puede evidenciar en las barras de la Figura 2 donde se observa que keap1 se presenta en menor proporción en preeclampsia comparado con el grupo control; al contrario Nrf2 se encuentra en mayor proporción en las placentas de mujeres con esta patología, esto se puede asociar al mecanismo conocido de la relación de keap1-Nrf2, ya que se requiere que Nrf2 esté libre para que cumpla su función en la vía de respuesta anti estrés como factor de transcripción en el núcleo, es decir que los niveles de Nrf2 se espera estén altos y los de keap1 bajos para evitar la degradación de Nrf2. Esta tendencia es congruente con los hallazgos de Loset *et al.* (2012), quienes, tomaron muestras de la decidua basal de la placenta de mujeres que presentaron preeclampsia y realizaron un estudio de vías canónicas y redes de genes que probablemente jugaban un papel importante en la patogénesis de la preeclampsia. Ellos reportan que el mecanismo de respuesta a estrés oxidativo mediada por Nrf2 estuvo altamente representado en la decidua de pacientes con preeclampsia⁴³. En contraste, otro estudio (Chigusa *et al* 2012) donde se analizaron muestras de placenta de mujeres preeclámpicas, muestran que existe baja actividad de Nrf2 asociada con el bajo nivel de los mRNA de hemo-oxigenasa (HO-1) y el receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada (LOX-1), este último conocido por ser receptor de LDL oxidada (oxLDL) y activador de Nrf2; asociando estos comportamientos moleculares con la patogénesis de la preeclampsia⁴⁴. Los estudios recientes relacionados con la actividad antioxidante, revelan que la función de Nrf2 se ve afectada en placentas de pacientes que presentaron preeclampsia por interrupción en la señalización y explican que se pueden esperar posibles efectos benéficos de Nrf2 sobre esta enfermedad cuando se induce su expresión a través de otros mecanismos^{45,46}.

El aumento de peso está asociado con alteraciones en las proteínas lipídicas y esto a su vez con el aumento de marcadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno, también relacionadas con la preeclampsia¹⁵, se ha reportado en la literatura que con el desarrollo del embarazo, la madre aumenta de 2 a 3 kilos por mes y que la hiperlipidemia materna es un cambio común y notable que se refleja con el aumento de marcadores lipídicos tales como las

LDL y oxLDL entre otros^{47,48}. En mujeres con preeclampsia, los niveles séricos de oxLDL están más altos que en embarazadas normales⁴⁹ y en la placenta el receptor transmembranal de oxLDL (LOX-1) se encuentra altamente expresado⁵⁰. Se ha señalado que la expresión de LOX-1 tiene relación con la activación de Nrf2⁵¹, pero en preeclampsia, Chigusa *et al* (2012) encontraron que tanto el receptor LOX-1 como Nrf2 se encuentran atenuados³⁶. Sin embargo para nuestro estudio los valores de IMC no mostraron correlación estadísticamente significativa con respecto al aumento de los niveles de las proteínas en estudio.

En el presente trabajo se encontró que los niveles de Keap1 en las placentas de mujeres que sufrieron preeclampsia (Figura 2, tabla 3) se encuentran bajos y que a la vez existe una correlación positiva entre el grosor, peso y diámetro de la placenta y Keap1 ($p= 0,041$; $0,025$; $0,029$ respectivamente, ver Tabla 4); lo que concuerda con el menor grosor de la placenta de preeclampticas con respecto al grupo control (Tabla 2). Nuestros hallazgos están acordes con lo descrito en el estudio de Kajantie *et al*, quienes evaluaron las placentas de 284 pacientes con preeclampsia encontrando una relación significativa $p<0.0001$ para el tamaño de la placenta siendo este menor a mayor severidad de la enfermedad, y contrasta con el grosor el cual fue mayor en preeclampticas en el mencionado estudio $p<0,001$.⁵²

El estudio de análisis de metilación con arreglo de genes, evidenció que tanto en las muestras del grupo control como en los casos, las regiones promotoras de Keap1 y Nrf2 se encontraron desmetiladas en un 100%. Debido a que el control epigenético por metilación del ADN es uno de los mecanismos por el cual se regula la expresión de genes, en este caso al no encontrarse sitios CpG's metilados en las regiones promotoras de Keap1 y Nrf2, se puede inferir que los resultados observados de las proteínas evaluadas en los grupos de estudio, no se pueden explicar por los mecanismos epigenéticos que involucran la metilación del ADN. Lo anteriormente descrito podría entonces asociarse a la relación entre Keap1 y Nrf2. Como se ha mencionado anteriormente Keap1 actúa como un sensor electrofílico debido a que posee

múltiples residuos de cisteínas reactivas ricas en grupos thiol, las cuales al reaccionar con electrofilos liberan a Nrf2 para que se acumule en el núcleo. En preeclampsia se conoce que los niveles de ERO aumentan, por tanto Nrf2 se debe elevar en respuesta a esta condición. Por otro lado el aumento de VEFG activa también la vía de producción de Nrf2 sin necesidad de la presencia de ERO³⁷. Sundrani *et.al* han encontrado una reducción global de los niveles de la misma en el DNA en placentas de embarazadas con partos pretermino e hipometilación de las regiones promotoras de VEFG lo que lleva a un aumento de la expresión del gen de VEFG y podría explicar la mencionada vía alterna de producción de Nrf2 no dependiente de los niveles de Keap1^{53,54}. Otro posible mecanismo por el cual los niveles de Nrf2 se pueden ver elevados es que por defectos conformacionales de la proteína y en consecuencia disminución en su actividad, el organismo responda aumentando los niveles de la proteína defectuosa para compensar la falla dentro de la vía de respuesta antioxidante.

Teniendo en cuenta lo anterior resulta necesario explorar los mecanismos tanto enzimáticos como genéticos con el fin de encontrar la vía por la cual se están modificando los niveles de Nrf2 y Keap1 en preeclampsia.

El mecanismo de respuesta antioxidante es solo una de las vías que se ve implicada en el desarrollo de la preeclampsia, puesto que existen otros mecanismos fisiológicos que intervienen en el desarrollo de la enfermedad haciendo de esta una patología de origen multifactorial.

9. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que en la placenta de mujeres con diagnóstico de preeclampsia, los niveles de Nrf2 tienden a ser más elevados, en contraposición a los niveles de Keap 1 que se pueden encontrar bajos.

En la placenta de mujeres con diagnóstico de preeclampsia se detectó que las regiones promotoras de los genes de Nrf2 y Keap 1 se encontraron totalmente desmetiladas. Por tanto la baja expresión de Keap1, no se puede atribuir a una regulación epigenética por metilación en su región promotora.

La relación de Nrf2-Keap1, la interacción de VEFG y la compensación por función alterada de Nrf2 pueden ser los mecanismos a través de los cuales los niveles de proteínas Nrf2 y Keap1 se ven alterados en la preeclampsia.

10. BIBLIOGRAFIA.

- 1- Xiao D, Hu XQ, Huang X, Zhou J, Wilson SM, Yang S, et al. Chronic hypoxia during gestation enhances uterine arterial myogenic tone via heightened oxidative stress. *PLoS One*. 2013;8(9):e73731.
- 2- Hilali N, Kocyigit A, Demir M, Camuzcuoglu A, Incebiyik A, Camuzcuoglu H, et al. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;170(2):377-80.
- 3- Shaker OG, Sadik NA. Pathogenesis of preeclampsia: Implications of apoptotic markers and oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32(11):1170-8.
- 4- Rani N, Dhingra R, Arya DS, Kalaivani M, Bhatla N, Kumar R. Role of oxidative stress markers and antioxidants in the placenta of preeclamptic patients. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010;36(6):1189-94.
- 5- Genc H, Uzun H, Benian A, Simsek G, Gelisgen R, Madazli R, et al. Evaluation of oxidative stress markers in first trimester for assessment of preeclampsia risk. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284(6):1367-73.
- 6- Redman CW. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne*. 2011;32 Suppl 1:S41-4.
- 7- Miranda Guisado ML, Vallejo-Vaz AJ, Garcia Junco PS, Jimenez Jimenez L, Garcia Morillo S, Muniz Grijalvo O, et al. Abnormal levels of antioxidant defenses in a large sample of patients with hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res*. 2012;35(3):274-8.
- 8- Stepan H, Heihoff-Klose A, Faber R. Reduced antioxidant capacity in second-trimester pregnancies with pathological uterine perfusion. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004;23(6):579-83.
- 9- Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(4):443-53.
- 10- Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ,

- Boehme C, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(2):366-76.
- 11- Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, Ramabhadran R. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr Chem Genomics*. 2011;5:1-12.
 - 12- Wruck CJ, Huppertz B, Bose P, Brandenburg LO, Pufe T, Kadyrov M. Role of a fetal defence mechanism against oxidative stress in the aetiology of preeclampsia. *Histopathology*. 2009;55(1):102-6.
 - 13- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
 - 14- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag*. 2011;7:467-74.
 - 15- Zavala-Gomez AB. Obesity and oxidative stress: a direct link to preeclampsia? *Arch Gynecol Obstet*. 2011;283(3):415-22.
 - 16- Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*. 2000;21(7):597-602.
 - 17- Bodnar LM, Ness RB, Harger GF, Roberts JM. Inflammation and triglycerides partially mediate the effect of prepregnancy body mass index on the risk of preeclampsia. *Am J Epidemiol*. 2005;162(12):1198-206.
 - Ahmed R, Dunford J, Mehran R, Robson S, Kunadian V. Pre-eclampsia and future cardiovascular risk among women: a review. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(18):1815-22.
 - 18- Vargas-Hernández VM. Enfermedad hipertensiva durante el embarazo. *Rev Hosp Jua Mex* 1999;6:125-34.
 - 19- Myers JE, Baker PN. Hypertensive diseases and eclampsia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002;14:119-25
 - 20- World Health Organization. Global Program to Conquer Preeclampsia/Eclampsia. 2002.
 - 21- Satizábal Soto José María, Moreno Giraldo Lina J., Montoya Julio César, García Vallejo Felipe. Preeclampsia, problema de salud pública latente:

Etiología genética y molecular. *El Hombre y la Máquina* 2010, 35: 82-100.

- 22- Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res.* 2003;13 Suppl A:S34-7.
- 23- Moore Keith I. *Embriología Clínica*. Quinta Ed.1995. Pag 122-130
- 24- V. Tsatsaris, A. Malassiné, T. Fournier, K. Handschuh, J.-P. Schaaps, J.-M. Foidart, D. Evain-Brion, *Placenta humana*, EMC - Ginecología-Obstetricia, Volume 42, Issue 2, 2006, Pages 1-23, ISSN 1283-081X
- 25- Sosa Olavarría Alberto, Alonzo F., Reigosa Yanis Aldo. Biopsia del lecho placentario y de las vellosidades coriales en gestaciones normales y de alto riesgo. *Gaceta Médica de Caracas* 1995; 103:358-374.
- 26- James JL, Stone PR, Chamley LW. The effects of oxygen concentration and gestational age on extravillous trophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2699-705.
- 27- Whitley GS, Cartwright JE. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *J Anat.* 2009;215(1):21-6.
- 28- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003;69(1):1-7.
- 29- Murray AJ. Oxygen delivery and fetal-placental growth: beyond a question of supply and demand? *Placenta.* 2012;33 Suppl 2:e16-22.
- 30- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(9):1304-9.
- 31- Wruck CJ, Streetz K, Pavic G, Gotz ME, Tohidnezhad M, Brandenburg LO, et al. Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter. *J Biol Chem.* 2011;286(6):4493-9.
- 32- Kweider N, Fragoulis A, Rosen C, Pecks U, Rath W, Pufe T, et al. Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): implications for preeclampsia. *J Biol Chem.* 2011;286(50):42863-72.

- 33- Atia A, Abdullah A. The Nrf2-Keap1 signalling pathway: Mechanisms of ARE transcription regulation in antioxidant cellular defence. *International Journal Of Pharmtech Research* (2014, Jan 1),6(1): 154-167
- 34- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:89-116.
- 35- Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res*. 2004;94(5):609-16.
- 36- Kajantie E, Thornburg KL, Eriksson JG, Osmond C, Barker DJ. In preeclampsia, the placenta grows slowly along its minor axis. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):469-73.
- 37- Kweider N, Wruck C. J. and Rath W. New Insights into the Pathogenesis of Preeclampsia – The Role of Nrf2 Activators and their Potential Therapeutic Impact. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2013; 73(12): 1236-1240.
- 38- Sundrani DP, Reddy US, Chavan-Gautam PM, Mehendale SS, Chandak GR, Joshi SR. Altered Methylation and Expression Patterns of Genes Regulating Placental Angiogenesis in Preterm Pregnancy. *Reprod Sci*. 2014.
- 39- Choudhury M, Friedman JE. Epigenetics and microRNAs in preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2012;34(5):334-41.
- 40- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: Nrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1304-9.
- 41- Wruck CJ, Streetz K, Pavic G et al. Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL- 6 promoter. *J Biol Chem* 2011; 286: 4493 – 4499.
- 42- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011;16(2):123-40.
- 43- Loset M, Mundal SB, Johnson MP, Fenstad MH, Freed KA, Lian IA, et al. A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia. *Am J Obstet*

- Gynecol. 2011;204(1):84.e1-27.
- 44- Chigusa Y, Tatsumi K, Kondoh E, Fujita K, Nishimura F, Mogami H, et al. Decreased lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) and low Nrf2 activation in placenta are involved in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(10):E1862-70.
 - 45- Kweider N, Wruck CJ, Rath W. New Insights into the Pathogenesis of Preeclampsia - The Role of Nrf2 Activators and their Potential Therapeutic Impact. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013;73(12):1236-40.
 - 46- Kweider N, Huppertz B, Wruck CJ, Beckmann R, Rath W, Pufe T, et al. A role for Nrf2 in redox signalling of the invasive extravillous trophoblast in severe early onset IUGR associated with preeclampsia. *PLoS One.* 2012;7(10):e47055.
 - 47- Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EM, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis.* 2004;177(2):391-9.
 - 48- Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res.* 2006;65 Suppl 3:59-64.
 - 49- Branch DW, Mitchell MD, Miller E, Palinski W, Witztum JL. Pre-eclampsia and serum antibodies to oxidised low-density lipoprotein. *Lancet.* 1994;343(8898):645-6.
 - 50- Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* 1997;386(6620):73-7.
 - 51- Chu T, Bunce K, Shaw P, Shridhar V, Althouse A, Hubel C, et al. Comprehensive analysis of preeclampsia-associated DNA methylation in the placenta. *PLoS One.* 2014;9(9):e107318.
 - 52- Hu W, Weng X, Dong M, Liu Y, Li W, Huang H. Alteration in methylation level at 11ss-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene promoter in infants born to preeclamptic women. *BMC Genet.* 2014;15(1):96.
 - 53- Blair JD, Yuen RK, Lim BK, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson

- WP. Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(10):697-708.
- 54- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:245-54.

CAPITULO 2

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE MODULAN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN MUJERES PRIMIGESTANTES QUE RECIBIERON TRATAMIENTO CON MICRONUTRIENTES.

1. RESUMEN.

El embarazo es una etapa crítica en la cual se presentan cambios metabólicos en la madre, estos cambios tienen como objetivo principal garantizar las condiciones adecuadas para el desarrollo del embrión y posteriormente del feto. El ambiente uterino toma gran importancia durante esta etapa debido a que factores ambientales que están influyendo sobre el estado de la gestante pueden alterar considerablemente el fenotipo y el genotipo del feto en formación, y provocar desórdenes patológicos en la madre y en su progenie. Algunos estudios plantean que deficiencias nutricionales en la madre pueden generar trastornos patológicos, como preeclampsia, diabetes gestacional y retardo de crecimiento intra uterino. También se ha considerado la hipótesis de que las alteraciones metabólicas *in utero* condicionan al feto a sufrir problemas de salud en la etapa neonatal y en la edad adulta, este tipo de condicionamiento se ha denominado Programación Fetal. Diversos procesos fisiológicos normales propios del embarazo están involucrados con las diferentes patologías, entre ellos se incluyen los mecanismos epigenéticos, estrés oxidativo, que pueden llegar a producir entre otros disfunción en la placenta y alteraciones endocrinas.

Investigaciones recientes han encontrado que los niveles de estrés oxidativo se encuentran elevados en la placenta y que existen mecanismos de respuesta anti oxidante que se activan para mantener el equilibrio redox en el tejido placentario. De igual manera diversos estudios han planteado la hipótesis de que la suplementación con micronutrientes antioxidantes ayuda a prevenir trastornos en la salud tanto de la madre como del feto, sin embargo, aún no es

claro como estos suplementos están influyendo sobre la salud materna y la fetal.

Es por ello, que el presente trabajo se desarrolló para establecer el efecto de la suplementación con micronutrientes antioxidantes sobre los moduladores de respuesta antioxidante Nrf2 y Keap1 en la placenta de mujeres primigestantes.

En el diseño metodológico se utilizó un banco de muestras conformado en el estudio “Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre factores maternos y placentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles”.(Universidad de Valle-Colciencias-FES.) Catorce muestras de placenta fueron tomadas del grupo de gestantes que consumió micronutrientes antioxidantes y del grupo control, al cual se le suministró un placebo. Cada muestra fué tratada para obtener el extracto protéico y se evaluó la expresión de las proteínas Nrf2 y Keap1 en los grupos de estudio, utilizando la técnica de electro inmuno-transferencia o Western Blot. De igual manera se evaluó preliminarmente el estado de metilación de las regiones promotoras de los genes, utilizando el kit para PCR cuantitativa (Analyzing EpiTect Methyl II PCR Array).

Los resultados mostraron que no hubo alteración en los niveles de expresión de Nrf2 y Keap1 en los grupos de estudio y que las regiones promotoras de estos genes se mantuvieron desmetiladas. Por tanto se considera que en las condiciones del estudio la suplementación con micronutrientes antioxidantes usados, no afecta la expresión Nrf2 y Keap1 y que el mecanismo de respuesta antioxidante que involucra dichas proteínas en la placenta puede estar activo ante la presencia de radicales libres de oxígeno con o sin la suplementación con micronutrientes (vitamina A, E, C, B3, Zn, Se), manteniendo el equilibrio redox en el tejido placentario.

Palabras Claves: micronutrientes antioxidantes, epigenética, estrés oxidativo, factores nucleares, Keap1, Nrf2, metilación del ADN, respuesta antioxidante, placenta, enfermedades crónicas.

2. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son la causa más común de morbilidad y mortalidad en el mundo, superando estadísticamente a aquellas enfermedades causadas por agentes infecciosos. Las ECNT más frecuentes son la diabetes *mellitus*, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares.

El desarrollo de las ECNT en la edad adulta se ha asociado a factores del estilo de vida como sedentarismo, malnutrición y consumo de cigarrillo. Estos factores también se han asociado con el estado de estrés oxidativo (EO) celular, el cual se plantea como uno de los mecanismos fisiopatológicos de las ECNT. El EO es el resultado del desequilibrio entre el incremento en la formación de especies oxidantes como los radicales libres de oxígeno (RLO) y de nitrógeno (RLN) y el sistema antioxidante del cuerpo humano.

El embarazo se caracteriza por el aumento en la producción de RLO y RLN que han mostrado tanto *in vivo* como *in vitro* capacidad de inducir EO y también cambios en la expresión génica ¹. El EO se ha relacionado con la aparición de enfermedades vasculares durante la gestación, como preeclampsia e hipertensión inducida por el embarazo, siendo estas, algunas de las principales causas de morbi-mortalidad en mujeres gestantes, de abortos espontáneos y de nacimientos prematuros, debido al deficiente desarrollo placentario ². Se ha propuesto entonces, que el uso de terapias antioxidantes como la complementación con micronutrientes durante este período sería importante para la prevención de este tipo de patologías mediante una adecuada respuesta antioxidante en el tejido placentario.

Existe evidencia de que los factores de transcripción Keap1 y Nrf2 cumplen la función de censar el EO celular e inducir la transcripción coordinada de enzimas antioxidantes, las cuales neutralizan los RLO y RLN, xenobioticos y otras moléculas que puedan causar daño a la célula. A través de este

mecanismo se logra mantener un equilibrio en el estado redox. Se conoce que la hipermetilación de las regiones promotoras de estos genes, inhibe su transcripción y dependiendo de cuál de ellos se encuentre reprimido se puede atenuar o exacerbar la respuesta antioxidante ³. Con relación al embarazo, el EO en la madre como en la placenta aumenta con el avance del período gestacional, razón por la cual la repuesta antioxidante debe ser proporcional al estado oxidativo celular, necesario para el buen desarrollo fetal y placentario.

De acuerdo con lo anterior, el propósito de la investigación fué evaluar si la complementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación puede afectar el grado de metilación de genes en las regiones control de los factores de transcripción Keap1 y Nrf2 y sus niveles proteicos en placenta de mujeres primigestantes sanas. Con el conocimiento generado en el estudio se espera contribuir a prevenir algunas patologías que se generan en el embarazo o que puedan derivar en afecciones a futuro en madres e hijos.

3. ANTECEDENTES.

3.1 La mala nutrición durante el embarazo y los efectos sobre la descendencia

Durante el período conocido como la “*Hambruna Holandesa*”, los hijos de las madres que estuvieron sometidas a carencia de nutrientes al final del embarazo presentaron una menor tasa de obesidad al alcanzar la etapa de adultos jóvenes al compararlos con los hijos de madres que padecieron la hambruna en el primer semestre. Por ello se planteó la idea, que durante la gestación existen períodos críticos para el desarrollo fetal ⁴. En experimentos de restricción calórica con ratas durante la gestación se demostró que en las crías se desarrolla obesidad, diabetes e hipertensión arterial ^{5,6,7} y son propensas a sufrir diabetes tipo 2 pues se generan menos células β -pancreáticas ⁸.

Se demostró entonces, el gran impacto que tiene el consumo de macro y micronutrientes en la salud del recién nacido. El bajo suministro de nutrientes, que afectó el ambiente intrauterino del feto, hizo que sus genomas expresaran una respuesta metabólica a estas condiciones extremas de hambruna caracterizada por el aumento de los depósitos de grasa para la obtención de energía, lo que se conoce como “la hipótesis del fenotipo ahorrador” ^{9,10}

Posteriormente, en estudios sobre los orígenes tempranos de la isquemia cardíaca en la etapa adulta, se encontró bajo peso al nacer como factor de riesgo de esta anomalía. Lo anterior llevó a David Baker y colaboradores en 1989 a proponer la hipótesis de la Programación fetal ¹¹, la cual postula que la inducción, eliminación o la alteración en el desarrollo de una estructura o el “ajuste” de un sistema fisiológico por un estímulo o una agresión que opera durante un período “vulnerable” del desarrollo temprano, trae consecuencias a largo plazo para la función de la estructura. En este orden de ideas se considera que los factores endógenos, exógenos y placentarios durante el embarazo pueden producir cambios estructurales y/o metabólicos en el feto,

poco o nada reversibles durante el crecimiento neonatal y la edad adulta, y se piensa que el período gestacional es punto crítico para el desarrollo de ECNT. A los efectos gestacionales de dichos factores se les ha dado el nombre de programación fetal de ECNT ¹².

3.2 Efecto de la dieta en procesos epigenéticos.

Se ha reportado que los procesos epigenéticos pueden ser afectados dinámicamente por la dieta y que la metilación global del ADN es susceptible al exceso o a la deficiencia de ciertos nutrientes. . Algunos de estos elementos como folato, colina, biotina, zinc y selenio, entre otros, son micronutrientes que como cofactores enzimáticos o antioxidantes cumplen en menor o mayor medida funciones en el proceso de desarrollo estructural de los individuos. ¹³. En modelos animales, se ha encontrado que la dieta materna puede influenciar el transcriptoma de las crías, alterando la expresión de genes principalmente relacionados con el transporte de iones, el metabolismo de ácidos grasos, la función mitocondrial y de respuesta al estrés oxidativo ^{14,15}. Los autores proponen que gran parte de esas alteraciones en la expresión genética están relacionadas con modificaciones epigenéticas.

En modelos murinos *in vitro* se han encontrado alteraciones en la metilación del ADN bajo condiciones de hipoxia y de desnutrición intrauterina, las cuales se asocian al incremento en la producción de RLO ^{16,17}. Shahrzad *et al* reportaron, en cultivos celulares y de tejidos, relación inversa entre áreas hipóxicas y la metilación global del ADN ¹⁸. Lane *et al*, demostraron que la insuficiencia útero placentaria en ratas, modifica globalmente el patrón epigenético del ADN y de las histonas¹⁹.

La expresión de genes con impronta puede jugar papel en el proceso de transferencia de nutrientes, en principio influyen sobre el crecimiento de la placenta ²⁰, y en consecuencia varían los requerimientos de nutrientes del feto, controlando su crecimiento ²¹. Se ha demostrado en modelos con ratones, que

en las gestantes con dietas ricas en metionina se provocan cambios epigenéticos^{22,23}. Sin embargo, los efectos nutricionales sobre los mecanismos moleculares de la programación *in útero* son aun desconocidos.

3.3 Estrés oxidativo y respuesta antioxidante en el embarazo.

En el embarazo normal se incrementan los RLO, como consecuencia de ello se presenta el aumento moderado y progresivo en los niveles de biomarcadores de EO^{24,25,26,27} como los F2-Isoprostanos, productos de la peroxidación lipídica, considerados los marcadores más sensibles de EO. Según Palm *et al*, con el avance del embarazo se presenta la disminución de moléculas antioxidantes como el alfa-tocoferol²⁸. Sin embargo, altos niveles de marcadores de EO han sido frecuentemente asociados con algunas complicaciones del embarazo, como son: la preeclampsia^{29,30}, la diabetes gestacional^{31,32}, el RCIU³³ y la obesidad³⁴. Incluso, se ha reportado en embarazos sin complicaciones una correlación entre el EO materno y la disminución del peso al nacer del neonato^{35,36,37}. Se considera que la placenta se desarrolla en condiciones deficientes de oxígeno, lo que puede inducir una posible excesiva producción de RLO con una subsecuente disfunción vascular³⁸.

Se atribuye como la principal causa de morbi-mortalidad materna y fetal a las enfermedades vasculares como preeclampsia y la hipertensión arterial inducida, con una incidencia del 5-10% en América Latina³⁹. Estas patologías han sido asociadas a defectos en la implantación del blastocisto lo cual condiciona a los tejidos a que probablemente disminuya la capacidad de reconocimiento del trofoblasto y consecuentemente a que se genere hipersensibilidad en los vasos sanguíneos placentarios produciendo vasoespasmo, que se incrementa gradualmente, generando aumento de la resistencia vascular e hipoperfusión uteroplacentaria, lo cual induce hipoxia e isquemia tisular. Esta condición favorece el desarrollo de un estado de estrés oxidativo celular, el cual es característico, a nivel histológico, del daño en la placenta y el endotelio⁴⁰. Sin embargo, aún no son claros los mecanismos que conducen a incrementar la

producción de RLO durante el embarazo, y aún menos sus consecuencias a largo plazo en la gestante y en su descendencia. Hong *et al* (2008), reportaron una asociación entre estados de EO en embarazos normales con una menor tasa de crecimiento postnatal en el primer año de vida ⁴¹. Lee *et al* (2004), encontraron un mayor peso y talla en neonatos de embarazadas que presentaron mayores concentraciones de vitaminas antioxidantes como ácido ascórbico y tocoferol en el segundo trimestre de embarazo ⁴². Otros estudios han observado una alta correlación de niveles de sustancias antioxidantes y marcadores de EO entre la sangre materna y fetal, lo cual sugiere que el EO materno puede afectar el desarrollo del feto ⁴³. Por otro lado, intervenciones con terapias antioxidantes en mamíferos, dirigidas a reducir el EO durante el embarazo, y en presencia de los mismos factores ya mencionados, han mostrado que estas intervenciones disminuyen el riesgo a desarrollar enfermedades propias de la gestación ^{44,45}.

Las células tienen mecanismos de adaptación frente a la exposición aguda y crónica de un amplio rango de estresores. Esto incluye la denominada defensa de fase II, o sea cómo las moléculas que están relacionadas con la biotransformación de xenobioticos y drogas, NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), NAD(P)H quinona oxidoreductasa 2 (NQO2), glutathione S transferase (GST), glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione cysteine synthetase (GCS), moléculas reducidas como glutathione, metallothioneins and ferritins. NQO1 and NQO2 catalyze the detoxification of quinones and their derivatives, prevent the generation of semiquinone radicals and RLO, protecting against EO. Glutathione peroxidase and reductase intervene in the synthesis of Glutathione. Glutathione, metallothioneins and ferritins decrease the levels in the cell of RLO and metal ions. The expression of these enzymes and antioxidant proteins is favored by the union of transcription factors to the region of the DNA known as antioxidant response element (ARE, siglas en inglés) ⁴⁶. Keap1 and Nrf2 belong to one of the main pathways of cellular defense against EO. Kapiszewska M, mentions that a diet rich in vegetables activates the expression of Nrf2 ⁴⁷. Other inducers

endógenos de este factor son la prostaglandinas sintetizadas por la ciclooxigenasa a partir del ácido araquidónico y del óxido nítrico que tiene una variedad de funciones relacionadas con la vasodilatación, inflamación y apoptosis ⁴⁸. Se ha evidenciado en un modelo *in vitro* con células de coriocarcinoma de placenta que fueron expuestas a diferentes niveles de arsénico, una alta expresión de Nrf2 y Maf, atendiendo a la exposición toxica ⁴⁹. Hanada *et al*, encontraron en células de cáncer colorrectal, la hipermetilación de la región promotora de Keap1, lo cual originó la baja expresión de la proteína con llevando a la acumulación de Nrf2 en el núcleo y a la subsecuente expresión de proteínas antioxidantes ⁵⁰. Un estudio en ratones TRAMP, que desarrollan cáncer de próstata, muestran que la expresión de Nrf2 es suprimida epigenéticamente por metilación en su promotor ⁵¹. Es poco lo que se conoce sobre los mecanismos de regulación epigenética de Keap 1 y Nrf 2 en tejidos específicos como la placenta y su relación de biodisponibilidad con la suplementación con micronutrientes.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1 Nutrición en el Embarazo.

El impacto que tienen los macro y micronutrientes en la salud de los individuos, ha tomado gran importancia, particularmente por el efecto que puedan tener en mujeres embarazadas⁵², debido a que los requerimientos nutricionales en este grupo se incrementan por las demandas del feto para su crecimiento y desarrollo y por los cambios fisiológicos de la madre en la gestación⁵³. En muchas regiones del mundo la prevalencia de la deficiencia de micronutrientes en embarazadas es alta^{54,55}, conllevando a numerosos estudios sobre su efecto y el de la complementación con micronutrientes antioxidantes sobre la salud fetal y materna^{56,57,58,59,60,61,62}. Un ejemplo conocido es el del ácido fólico, micronutriente antioxidante importante en el metabolismo celular, y que actualmente es utilizado por los sistemas de salud como complemento nutricional durante la etapa prenatal^{63,64,65,66,67,68}. Shankar, *et al* (2008) demostraron la importancia de incluir en los programas de atención prenatal la complementación con micronutrientes, especialmente en mujeres con desnutrición y anemia.^{69,70}

Los micronutrientes son sustancias necesarias en pequeñas cantidades, para que se realicen efectivamente los diferentes procesos metabólicos, entre ellos se encuentran vitaminas y algunos minerales. La carencia de micronutrientes en las embarazadas según estudios, muestra ser un problema común de salud tanto en los países de bajos ingresos, como en países desarrollados; en Nepal, se realizó un estudio a 1165 embarazadas en el primer trimestre se encontró que poseían deficiencias de vitaminas A (7%), E (25%) y D (14%), B-6 (40%) B-12 (28%) riboflavina (33%). La prevalencia de la deficiencia de folato fue del 12% y de zinc en el 61%⁷¹.

En Chile, 241 gestantes de 20 a 43 años, sin patologías asociadas, fueron captadas para identificar el aporte dietético de micronutrientes en

embarazadas, se les aplicó una encuesta de recordatorio de 24 horas por 2 días no consecutivos, en ocho centros de salud. Se calcularon los aportes de la dieta en vitaminas A, B1, B2, C, niacina, folato, zinc, calcio, hierro, potasio, selenio, fósforo y sodio, los resultados muestran que las encuestadas presentaban para niacina, adecuación menor al 75 % en el 86,7 % de las embarazadas, 95,2 % en folato, 55,6 % en zinc, 54,7 % en calcio, 62,6 % en hierro y 60,9 % en potasio. Esto concuerda con estudios anteriores en México, Perú, Venezuela ^{72,73,74}

Según los estudios, las mujeres antes y durante el embarazo deben mejorar su ingesta de alimentos con los micronutrientes necesarios y en cantidad suficiente, cuando no es posible suplirlo con la dieta se requiere la administración de suplementos de micronutrientes. Durante el embarazo las necesidades nutricionales aumentan en algunos casos hasta en un 50%. Los diferentes estudios han probado que existe relación entre el estado nutricional antes y durante del embarazo, la ganancia de peso *in utero* del feto con la duración del embarazo y el peso del bebe al nacer ⁷⁵

Se ha comprobado que a fin de prevenir defectos de tubo neural es importante la administración de suplementos de ácido fólico pre y durante el primer trimestre de embarazo.

El uso de suplementos de micronutrientes en los multivitamínicos, antes y durante el embarazo se correlaciona con el incremento de peso al nacer, mejor desarrollo mental del hijo y la disminución del riesgo de parto prematuro, hipertensión gestacional, preeclampsia ⁷⁶. Actualmente sólo se tiene claro el beneficio de suministrar por las entidades de salud los suplementos de ácido fólico, hierro y yodo.

4.2 Función de los Micronutrientes antioxidantes.

Los micronutrientes son sustancias que en muy pocas cantidades son, esenciales para el desarrollo normal del cuerpo y algunos de ellos que tienen propiedades o hacen parte de un mecanismo antioxidante se consideran a continuación:

4.2.1 Vitamina C.

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) tiene un alto poder antioxidante, es una vitamina hidrosoluble producida por las plantas y algunos animales y no puede ser sintetizada por los humanos ⁷⁷. Las raciones dietéticas recomendadas (Recommendary Dietary Allowances) o RDA del adulto oscilan entre 75 y 90mg/día. Dosis altas de AA de hasta 2 g/día son seguras y no inducen efectos indeseables ⁷⁸.

El AA existe como ascorbato monoanión (AsCH-) el cual reacciona con radicales libres para y formar un radical ascórbico estable (semihidroascorbato, Asc-) que puede ser reducido de nuevo a ascorbato por la enzima NADH reductasa.

La capacidad de donar electrones hace del AA uno de los principales antioxidantes. Se une a radicales peroxilipídicos o mediante la interacción con el radical tocoferol (vitamina E), en las membranas del lisosoma, localizándose las vitaminas C y E por fuera y por dentro de las membranas, respectivamente resultando en la regeneración del α -tocoferol, protegiendo las membranas celulares contra la peroxidación.

Se encontró que altas dosis de vitamina C por vía intravenosa, seguidas de una administración oral por tiempo prolongado, aumentan el tiempo de vida en pacientes con cáncer avanzado Pauling y Cameron (1970) ⁷⁹. Luego estudios aleatorizados y doble ciego, evidenciaron que la administración oral de

vitamina C únicamente, no es suficiente en estos casos para los mismos resultados^{80,81}. Se aumenta su efectividad en 70 veces por vía intravenosa⁸² y se ha demostrado que en determinadas circunstancias, la vitamina C fue capaz de destruir células tumorales^{83,84}.

Es conocido que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), durante el estrés oxidativo, se relaciona con la enfermedad cardiovascular⁸⁵, por la formación de la placa del ateroma⁸⁶. La suplementación con dosis farmacológicas de vitamina C (500 mg/día) o α -tocoferol (73,5 mg/día) indujo una reducción de colesterol y triglicéridos plasmáticos en animales de experimentación, mientras que la deficiencia de vitamina C incrementa las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos⁸⁷.

4.2.3 Vitamina E.

El α -tocoferol o vitamina E es un antioxidante inhibidor de la peroxidación lipídica, se requieren de 12 a 15 mg equivalentes de α -tocoferol al día para mantener concentraciones plasmáticas normales de vitamina E en un adulto sano. En la acción antioxidativa sobre la peroxidación lipídica, el α -tocoferol se une a radicales peroxilipídicos disminuyendo la propagación de más radicales libres mediante la interacción con el AsCH-⁸⁸.

También actúa en la protección de los ácidos grasos insaturados y otras sustancias fácilmente oxidables. Estabiliza otras vitaminas, como la vitamina A, hormonas y enzimas, ayuda a proteger estabilizando las membranas biológicas, mediante la formación de complejos con el ácido araquidónico. La vitamina E inhibe la agregación plaquetaria afectando la síntesis de prostaglandinas mediante interferencia en el metabolismo del ácido araquidónico. Interviene inhibiendo la actividad de enzimas como creatinina quinasa y xantina oxidasa, y puede contribuir a proteger de la oxidación a algunas enzimas de la membrana celular. La susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis es mayor en caso de déficit de vitamina E.⁸⁹

Se encontró que la adición de dosis excesiva de vitamina E a una emulsión lipídica puede acelerar la peroxidación lipídica⁹⁰. Una alta ingesta de vitamina E solo tiene una mínima toxicidad, al interferir con la vitamina K, la coagulación puede verse afectada⁹¹, el estudio concluyó que los suplementos con dosis altas de vitamina E incrementan la mortalidad.

4.2.4 Selenio.

El selenio actúa como un antioxidante celular, ya que inhibe la oxidación de los lípidos en la pared celular, protege a los tejidos y las membranas celulares impidiendo la formación de radicales libres que causan importantes daños celulares. Se encuentran 4 átomos de este elemento en la enzima Glutación peroxidasa (GPx), cuyo poder antioxidante puede neutralizar el peróxido de hidrogeno presente en el organismo y lo convierte en agua antes de que pueda atacar las membranas celulares⁹². La enzima glutación peroxidasa regula la biosíntesis de los mensajeros químicos, incluidos los leucotrienos y los prostaglandinas implicadas en la respuesta inmunitaria.

La conservación de selenio en los tejidos animales es importante como selenio unido a un aminoácido, tales como el selenio-cisteína o selenio-metilcisteína. En condiciones de EO, el selenio almacenado como selenio-metionina puede ser degradado rápidamente para participar en la síntesis de la glutación peroxidasa, cuya actividad depende este oligo-elemento⁹³.

Se reconocen varias seleno-enzimas: por lo menos 5 isoformas de GPx, 3 yodotironina 5' -Deiodinasas (TDIs), 3 tioredoxin reductasas (TRs) y selenofosfato sintetasa⁹³. En cada una de estas proteínas, el Se es incorporado dentro del residuo cisteína⁹².

4.2.5 Vitamina A y Carotenoides.

Los β -carotenos, que son precursores más importantes de la vitamina A, neutralizan los radicales libres de diferentes maneras, uniéndose al radical libre o mediante transferencia de electrones formando un compuesto estable. Los carotenos inhiben la proliferación celular, modulan la apoptosis celular, suprimen la proliferación de células de cáncer de pulmón, en un medio enriquecido con carotenos ⁹⁴.

En diversos estudios sobre la relación con suplementación de β -carotenos, no se observa ningún efecto benéfico sobre la incidencia del cáncer de pulmón ⁹⁵. Mientras que otros autores, han mostrado que la ingesta de β -carotenos se ha asociado con un incremento de la mortalidad por cáncer de pulmón como fue el caso del ensayo sobre la eficacia del Beta-caroteno y del Retinol (CARET), donde una combinación de β -carotenos y retinil-palmitato incrementó la incidencia de cáncer de pulmón en un 26% respecto a los controles en ensayos clínicos aleatorizados⁹⁶. La suplementación con carotenos en cáncer de piel -no melanoma - y cáncer colon-rectal, no evidencia ningún beneficio ni efectos secundarios sobre la enfermedad neoplásica.

La suplementación con una combinación de antioxidantes de selenio, vitamina E y carotenos disminuye la mortalidad global por cáncer y en especial la de cáncer gástrico. El estudio “Chinese Cancer Prevention Study” demostró el papel protector de los β -carotenos en la enfermedad cardiovascular aunque aún no se ha logrado dar claridad total al resultado ⁹⁷. Por ejemplo, en el Nurses Health Study, hubo una correlación inversa entre la ingesta alta de β -carotenos y el riesgo de enfermedad coronaria, no encontrándose esta correlación entre riesgo cardiovascular e ingesta de carotenos entre los fumadores ⁹⁸.

El nombre de Vitamina A es un término genérico para un gran número de compuestos interrelacionados. Retinol (un alcohol) y retinal (un aldehído) son

referidos comúnmente como vitamina A preformada. El retinal en el cuerpo puede ser convertido en ácido retinoico, la forma de la vitamina A conocida por afectar la transcripción de genes. El retinol, el retinal, el ácido retinoico y los compuestos relacionados se conocen como retinoides. Al β -caroteno y a otros carotenoides que pueden ser convertidos por el cuerpo en retinol se les refiere como carotenoides provitamina A. Cientos de carotenoides distintos son sintetizados por plantas, pero sólo cerca del 10% son carotenoides provitamina A ⁹⁹.

El ácido retinoico (AR) y sus isómeros actúan como hormonas que afectan la expresión de genes, de este modo influyen a una serie de procesos fisiológicos. El ácido todo-trans-retinoico y el ácido 9-cis-retinoico son transportados a los núcleos de las células unidos a proteínas citoplasmáticas de unión al ácido retinoico (PCUAR). Dentro del núcleo, el AR se une con proteínas receptoras de ácido retinoico. Específicamente, el ácido todo-trans-retinoico se une con receptores de ácido retinoico (RAR) y el ácido 9-cis-retinoico se une con receptores retinoides X (RXR). Los RAR y el RXR forman heterodímeros RAR/RXR; estos heterodímeros se unen a las regiones reguladoras de un cromosoma llamadas elementos de respuesta a ácido retinoico (ERAR). La unión de todo-trans-AR y 9-cis-AR con RAR y RXR respectivamente, permite al complejo regular la velocidad de la transcripción de genes, influenciando de esta forma la síntesis de ciertas proteínas. El RXR podría también formar heterodímeros con receptores de hormona tiroidea (RHT) o con receptores de vitamina D (RVD). De esta manera, la vitamina A, la hormona tiroidea, y la vitamina D podrían interactuar para influenciar la transcripción de genes ¹⁰⁰.

Se conoce que tanto el exceso como la deficiencia de vitamina A causan defectos de nacimiento. El retinol y AR son esenciales para el desarrollo embrionario ¹⁰¹. Durante el desarrollo fetal, el AR funciona en el desarrollo de las extremidades y en la formación del corazón, ojos y orejas ¹⁰². Adicionalmente, se ha descubierto que el AR regula la expresión del gen de la

hormona del crecimiento. Los eritrocitos, como todas las células sanguíneas, derivan de células precursoras denominadas células madre. Las células madre dependen de retinoides para su diferenciación normal en eritrocitos. Además, la vitamina A parece facilitar la movilización del hierro desde los sitios de depósito a los de desarrollo de eritrocitos para su incorporación a la hemoglobina, el transportador de oxígeno en los eritrocitos ^{103,104}.

Se piensa que la deficiencia de zinc interfiere con el metabolismo de la vitamina A en varias formas: ¹⁰⁵ la deficiencia de zinc resulta en una síntesis disminuida de proteínas de unión a retinol (PUR), que lo transportan a través de la circulación hacia los tejidos (por ejemplo, la retina) y también protegen al organismo contra la potencial toxicidad del retinol¹⁰³; la deficiencia de zinc resulta en una actividad disminuida de la enzima que libera al retinol de su forma almacenada, retinol palmitato, en el hígado¹⁰⁴; el zinc es necesario para la enzima que convierte al retinol en retinal ^{106,107}. Hasta la fecha, las consecuencias médicas de una deficiencia de zinc sobre el estado nutricional de la vitamina A en humanos no están claras ¹⁰⁸.

Aunque el desarrollo fetal normal necesita una ingesta suficiente de vitamina A, se sabe que el consumo en exceso de vitamina A preformada (retinol) durante el embarazo ocasiona defectos de nacimiento ¹⁰⁹.

La ingesta recomendada de nutrientes de vitamina A (2,300 UI/día para mujeres y 3,000 UI/día para hombres) es la suficiente para mantener la expresión génica, la función inmune y la visión normal. Sin embargo, no se recomienda seguir la recomendación del Instituto Linus Pauling de tomar diariamente un suplemento multivitamínico/mineral que podría aportar hasta 5,000 UI/día de vitamina A como retinol, cantidad que ha sido asociada con efectos adversos sobre la salud en adultos mayores. Por esta razón, se recomienda tomar un suplemento multivitamínico / multimineral que no aporte más de 2,500 UI de vitamina A o un suplemento que aporte 5,000 UI de vitamina A, de la que al menos un 50% provenga del beta-caroteno ¹¹⁰.

4.2.6 Nicotinamida.

La vitamina B3, niacina, ácido nicotínico o vitamina PP, con fórmula química $C_6H_5NO_2$ es una vitamina, soluble en agua. Actúa en el metabolismo celular como grupo prostético de coenzimas o precursora de ellas. Es absorbida por difusión pasiva, no se almacena y los excedentes se eliminan en la orina. Sus derivados, NADH y NAD⁺, y NADPH y NADP⁺, son esenciales en el metabolismo energético de la célula y en la reparación del ADN ¹¹¹. La designación de vitamina B3 también incluye a la correspondiente amida, la nicotinamida o niacinamida, con fórmula química $C_6H_6N_2O$. Dentro de las funciones de la Niacina se incluyen la eliminación de químicos tóxicos del cuerpo y la participación en la producción de hormonas esteroideas sintetizadas por la glándula adrenal, como son las hormonas sexuales y las hormonas relacionadas con el estrés. Ésta es biológicamente precursora de dos coenzimas que intervienen en casi todas las reacciones de óxido-reducción: el nicotín- adenín- dinucleótido (NAD⁺) y el nicotín- adenín – dinucleótido- fosfato (NADP⁺), las cuales ejercen su actividad como coenzimas que intervienen en casi todas las reacciones de óxido-reducción, o bien con función no coenzimática, participando en reacciones anabólicas y catabólicas de carbohidratos, proteínas y grasas ¹¹².

4.2.8 Zinc.

El Zinc (Zn) es un microelemento cuya función esencial en los organismos vivos se conoce desde 1869 ¹¹³. Este mineral interviene en una amplia variedad de procesos celulares como la proliferación, la función inmune y la defensa antioxidante ¹¹⁴. Además, participa en la estabilidad y regulación génica, forma parte de más de 3000 factores de transcripción, de más de 300 enzimas incluyendo la cobre/zinc superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) y de varias proteínas involucradas en la reparación del ADN ^{115,116,117}.

Se conoce que la deficiencia de Zn puede alterar algunos eventos en el desarrollo, por lo que el aporte adecuado de este mineral debería ser garantizado ^{118,119,120,121}. El Zn participa en la estabilidad y en la función génica ¹²². Se ha descrito además, que la disponibilidad de Zn puede influir en las funciones celulares y en el desarrollo embrionario ^{123,124}.

El rol esencial del Zn durante la embriogénesis fue descrito a través de estudios realizados en *Xenopus laevis*. Estos estudios determinaron la presencia de este mineral en ovocitos y embriones, e identificaron su participación en la acción de las metaloproteínas que intervienen en el desarrollo y la formación de órganos. La deficiencia de Zn se traduce en el desarrollo de embriones sin órganos dorsales incluyendo cerebro, ojos, y espina dorsal en los vertebrados en general ¹²⁵. Además, este microelemento regula la maquinaria de expresión de genes, afecta la estructura de la cromatina, el funcionamiento del ADN, la actividad de numerosos factores de transcripción y la acción de la ARN polimerasa ^{126,127}. Estudios recientes sugieren que el Zn también podría actuar como un segundo mensajero capaz de traducir señales extracelulares en eventos de señalización intracelular ¹²⁸.

La función antioxidante de este mineral puede estar relacionada con varios factores. En primer lugar, el Zn es un componente esencial de la enzima Cu/Zn- SOD, una de las primeras líneas de defensa celular contra las especies reactivas del oxígeno ¹²⁹. Por otro lado, previene la oxidación de los grupos sulfidrilos de las proteínas y ejerce un rol antagónico sobre los metales de transición prooxidantes, como el hierro o el cobre, al competir por sus sitios de unión a las membranas ^{130,131,132,133}. Un tercer mecanismo por el que el Zn actúa como protector es su participación en el metabolismo de la metalotioneína. Esta proteína de bajo peso molecular actúa como un potente eliminador de radicales hidroxilo. El Zn puede inducir la expresión de metalotioneína, elevando su concentración citoplasmática, a través de la activación de su factor de transcripción (metal transcription factor 1, MTF-1) ¹²⁹.

Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que una reducción marcada de Zn aumenta la apoptosis, mientras que su suplementación puede proteger a las células de diversas moléculas proapoptóticas previniendo así la muerte celular programada ^{134,135,136,137}. El efecto inhibitorio directo del Zn sobre la apoptosis se desarrolla mediante dos mecanismos; durante los estadios tempranos de la apoptosis el Zn inhibe la caspasa 3, mientras que en etapas más avanzadas suprime las endonucleasas dependientes de Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺ responsables de causar la fragmentación del ADN ^{138,139,140,141}.

El Zn forma estructuras denominadas “dedos de Zinc” que fueron definidos por Laity y colaboradores (2001) ¹⁴² como cualquier dominio proteico pequeño, funcional, plegado de forma independiente que requiere la coordinación de uno o más iones de Zn para estabilizar su estructura. Las proteínas con dedos de Zn forman parte de una gran cantidad de receptores de membrana, nucleoproteínas y más de 1000 factores de transcripción ^{143,144}. Las funciones de estas estructuras son extraordinariamente diversas e incluyen el reconocimiento del ADN, el empaquetamiento del ARN, la activación de la transcripción, la regulación de la apoptosis, el ensamble y plegamiento de las proteínas y la unión de éstas a lípidos ^{145,146}.

Estudios previos, indican que una disminución importante de Zn intracelular tiene como consecuencia una reducción en el contenido de GSH ¹⁴⁷. Además de su importante papel en la protección contra RLO y agentes tóxicos, el GSH interviene en procesos específicos de la reproducción y del desarrollo embrionario temprano.

4.3 Mecanismos epigenéticos en la programación fetal.

La epigenética involucra un conjunto de mecanismos y fenómenos que pueden causar cambios en el fenotipo de una célula o de un organismo sin alterar su secuencia de ADN. La reprogramación epigenética involucra la metilación del

ADN, las modificaciones de las histonas ¹⁴⁸, con la subsecuente remodelación de la cromatina y la modulación de los procesos postranscripcionales por miRNA ¹⁴⁹. La metilación del ADN es una modificación química en el que un grupo metilo es transferido a las citosinas de las regiones ricas en sitios CpG, y es considerada como un evento que determina la expresión de genes ¹⁴⁹. Es un proceso normal en el desarrollo de los mamíferos pero si hay hipo ó hipermetilación de múltiples genes, se pueden generar alteraciones en las condiciones de salud ¹⁵⁰.

En mamíferos, la metilación del ADN es catalizada por ADN metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1) y las *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) ¹⁵¹. Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular, que conforman un octámero alrededor del cual se envuelve la cadena de ADN, produciendo la condensación de la cromatina. Las histonas, son proteínas encargadas de mantener el ADN compactado. Este empaquetamiento del ADN facilita o dificulta la transcripción de los diferentes genes ¹⁴⁹. La modificación de las histonas incluye fosforilaciones, ubiquitinaciones, metilaciones, desaminaciones y acetilaciones. Las modificaciones son de tipo covalente al igual que la metilación del ADN, y producen cambios conformacionales que finalmente alteran la expresión génica ^{149,152}.

El ARN no codificante, puede ser inducido por señales ambientales, principalmente los micro ARNs (miARN), ARN largo no codificante, ARN pequeño de interferencia ¹⁵³. En conjunto, comprenden un mecanismo que regula la expresión génica postranscripción y la estabilidad del ARN.

Durante el desarrollo de un ser humano, poco después de la fecundación, se empieza a establecer el epigenoma en cada célula por herencia, mediante un proceso de marcaje del genoma ("genomic imprinting") importante en la regulación génica responsable de la diferenciación celular y del crecimiento embrionario. Aún no es claro cómo se produce este marcaje pero se conoce que en los vertebrados se halla restringido a los mamíferos placentarios y todos

los genes objeto de marcaje se hallan implicados en el desarrollo fetal. Muy importante es el hecho que el establecimiento del Epigenoma es dinámico, es decir, también se ve afectado por factores ambientales, tales como: la nutrición, la disponibilidad de oxígeno, etc. De allí, que la interacción directa o indirecta del genoma fetal con el ambiente intrauterino de la madre es un factor de suma importancia no solo para un crecimiento y desarrollo adecuado del feto in útero, sino también, para el establecimiento de su Epigenoma. Al respecto diversos estudios indican que el EO puede estar participando en este proceso. Por ejemplo: cambios en el grado de metilación del ADN han sido atribuidos a RLO^{154,155}. De forma directa, los RLO como el ión hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) pueden reaccionar con la guanosina en los dinucleótidos CpG y formar 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, una base modificada que puede inhibir la metilación de las citosinas adyacentes por las ADN-metiltransferasas (DNMT's: sigla en ingles), enzimas encargadas del mantenimiento de la metilación en el ADN¹⁵⁶.

Por otra parte, el EO puede de manera indirecta, provocar cambios epigenéticos persistentes a través de la inducción de rutas metabólicas celulares que pueden disminuir y/o inhibir la disponibilidad de cofactores necesarios para el establecimiento del epigenoma¹⁵⁷. Para establecer y mantener el epigenoma es necesaria una adecuada concentración de moléculas donantes de grupos metilo como la S-adenosilmetionina (SAM), cofactor de las DNMTs, sintetizada en el ciclo de la metionina. La disponibilidad de la SAM está relacionada con el metabolismo y el estado redox celular¹⁵⁸. 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 RLO¹⁵⁹. Lertratanangkoon *et al*, mostraron que la depleción de glutatión disminuye significativamente los procesos de metilación en el ADN^{160,161}. Adicionalmente, estados de EO pueden alterar la metilación del ADN al inhibir la actividad y la expresión de la Metionina Adenosil Transferasa (MAT)^{162,163} enzima encargada de la síntesis de SAM.

4.4 El estrés oxidativo.

Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, de esta manera son muy inestables y por lo tanto reactivos que buscan la estabilidad combinándose con otros compuestos como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácido nucleicos ocasionando daño en las membranas celulares y en el ADN del núcleo ¹⁶⁴.

Los radicales libres se producen principalmente durante la respiración mitocondrial. Entre el 1%-3% del oxígeno consumido por el cuerpo se transforma en radicales libres: el radical anion superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); que también son llamados especies reactivas de oxígeno (RLO). Los radicales superóxido en presencia de óxido nítrico (NO) reaccionan y producen peroxinitrito ($ONOO^-$), que, al encontrarse con proteínas inducen nitración y peroxidación lipídica, también llamadas especies reactivas de nitrógeno (RLN). Las fuentes endógenas de producción de radicales libres están en: la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa, en los leucocitos polimorfonucleares activados generando radicales hidroxilos en presencia del hierro. En los peroxisomas el sistema enzimático citocromo P-450, genera peróxido de hidrogeno, el cual oxida los ácidos grasos polinsaturados (lipidos) y producen radicales superóxido. Los radicales libres participan en la activación de factores de transcripción, que regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, actúan dentro de los macrófagos y neutrófilos en la destrucción de los agentes infecciosos y en la respuesta inmune ¹⁶⁵.

Para neutralizar los radicales libres, se activa el mecanismo de defensa celular mediado por enzimas antioxidantes como la superóxido-dismutasa, catalasa, y glutatión-peroxidasa entre otras mencionadas anteriormente, cada una con una función específica en el mantenimiento de la homeostasis ¹⁶⁶. Si existe sobreproducción de radicales libres en los sistemas biológicos y los

mecanismos antioxidantes de defensa celular no son suficientes para inactivar estas moléculas, ocurre un desequilibrio redox, entonces, los radicales libres muy inestables colisionan con las biomoléculas les sustraen un electrón, oxidándolas y alterando su función bioquímica e induciendo EO. El EO ocurre por la acumulación en el organismo de radicales libres, y está implicado en gran variedad de procesos patológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y envejecimiento.

En EO los radicales libres reaccionan con los lípidos de membrana celular¹⁶⁷ y las lipoproteínas, dañando sus estructuras, alterando la permeabilidad, produciendo edema y muerte celular. La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) conduce a la formación de la placa ateromatosa; los ácidos grasos oxidados, se convierten en radicales de ácidos grasos con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, con lo que se propagan reacciones en cadena, perpetuando el proceso oxidativo, lo que se conoce como peroxidación lipídica¹⁶⁸.

En presencia de proteínas, los radicales libres oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina), formando entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos modificando su estructura, lo que impide el normal desarrollo de sus funciones (Ej.: transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.)¹⁶⁹.

Los radicales libres pueden atacar la molécula de ADN, modificando sus bases produciendo mutaciones y carcinogénesis.¹⁷⁰ El estrés oxidativo también está relacionado con el envejecimiento y el desarrollo de diversas enfermedades: cáncer, arteriosclerosis, diabetes *mellitus* tipo 2, cataratas y enfermedades neurodegenerativas¹⁷¹

Debido a la importancia de los mecanismos protectores antioxidantes la investigación sobre el papel que en la dieta que pueden tener los antioxidantes ha sido amplia en los últimos años.

4.5 Mecanismo de respuesta antioxidante.

Nrf2 es un factor nuclear de transcripción del tipo “cremallera” de leucina presente en casi todos los tejidos, se conoce como el principal activador de la transcripción de proteínas de respuesta antioxidante dependiente de ARE. La región con carácter básico de la proteína es la encargada de unirse al ADN, y posee otra región tipo Cap ‘N’ Collar, altamente conservada entre la familia Nrf`s. Nrf2 es regulado por la proteína citoplasmática Keap1, que lo secuestra por corto tiempo siguiendo dos probables vías: la primera se refiere a la degradación de Nrf2 a través de la formación del dímero Keap1–Nrf2, donde Keap1 tiene dominios que son reconocidos por el complejo proteico ubiquitin ligasa que en condiciones normales de las células mantiene los niveles basales de Nrf2 por flaqueamiento continuo y degradación mediada por la ubiquitina. La segunda vía se activa cuando la presencia de RLO se encuentra exacerbada y Keap1 que actúa como un sensor de estrés oxidativo, se modifica en el residuo Cys151, permitiendo la fosforilación de Nrf2 en el residuo Ser40 con su subsecuente liberación. Nrf2 se estabiliza en citosol, se trasloca al núcleo celular donde forma heterodímeros con Maf o Jun y se une a ARE permitiendo la expresión coordinada de genes (Figura 1) ¹⁷².

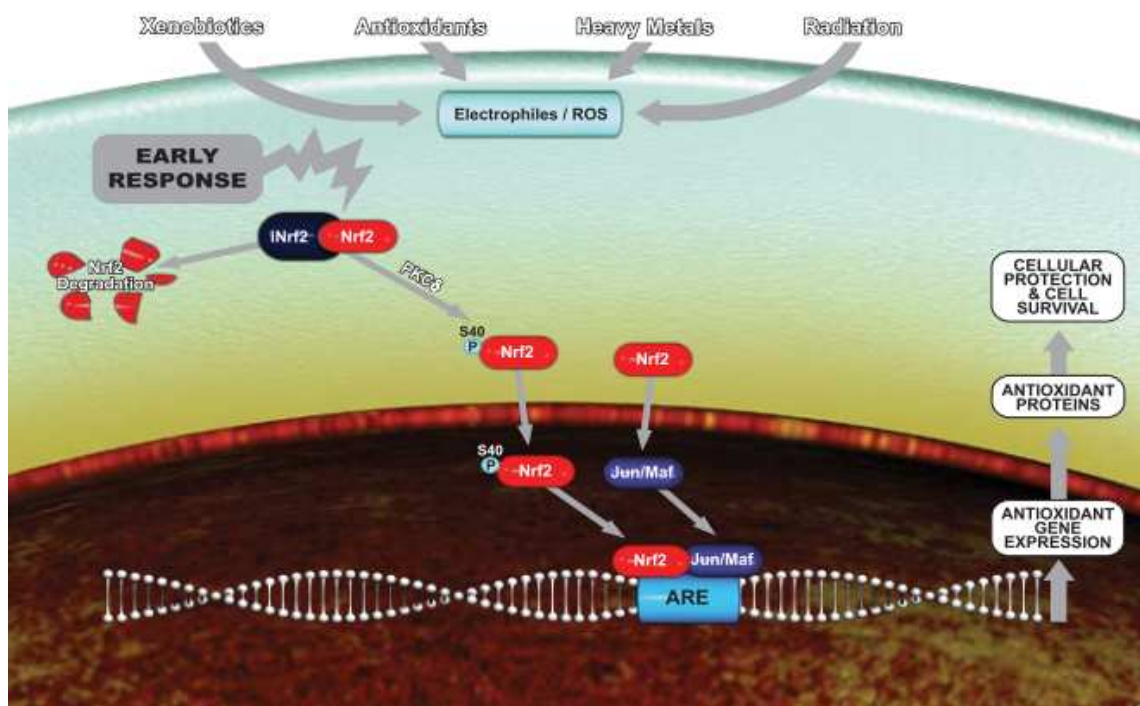


Figura 1. Esquema del mecanismo de respuesta antioxidante mediado por Nrf2/ARE. Keap1 (Inrf2)

Fuente: Jaiswal Anil K. *Nrf2/INrf2 (Keap1) Signaling in Oxidative Stress and Cellular Protection*. Disponible en internet. <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pathways12/nrf2-signaling-oxidative-stress-cellular-protection.php>. 2014-11-13.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la suplementación con micronutrientes en mujeres embarazadas, sobre el nivel de proteínas que modulan el mecanismo enzimático de respuesta antioxidante.

5.2 Objetivos específicos.

5.2.1. Evaluar en la placenta de mujeres primigestantes que recibieron tratamiento con micronutrientes, el nivel de los factores de transcripción Keap1 y Nrf2

5.2.2 Establecer en la placenta de mujeres primigestantes que recibieron tratamiento con micronutrientes, el estado de metilación de las regiones control de los genes Keap1 y Nrf2

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Diseño metodológico.

En este estudio se utilizó el banco de muestras de placenta humana perteneciente al proyecto “Efecto de la complementación con micronutrientes y del ejercicio físico durante la gestación sobre relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles”, financiado por Colciencias/Universidad del Valle/FES (Cód. 11064592). Las cuales estuvieron conservadas a -70 °C durante todo el estudio.

En el estudio del cual provienen las muestras de placenta, dos grupos de mujeres primigestantes fueron captadas entre las semanas 16 y 20 de gestación, y asignadas de manera aleatoria como sigue: 1. Grupo Control sometido al control prenatal usual, y que recibió una capsula diaria con placebo, 2. Grupo de complementación de micronutrientes (vitamina C 200mg, α -tocoferol 30mg, nicotinamida 100mg, vitamina A 2.4mg, zinc 20mg, selenio 70 μ g) que recibió una cápsula diaria hasta el final del embarazo.

Se toma como exposición la intervención con micronutrientes antioxidantes durante el periodo gestacional en las madres y el efecto sobre el estado de metilación de las regiones promotoras de los genes Keap1 y Nrf2 así como los niveles de sus respectivas proteínas asociadas con la respuesta antioxidante del tejido placentario.

6.2 Selección de muestras.

Teniendo en cuenta las variables a determinar cómo el estado de metilación en regiones promotoras de los genes Keap1 y Nrf2 asociados con la respuesta antioxidante de la placenta, el tamaño de la muestra utilizado fue de 7 por grupo de gestantes. Para el caso de la cuantificación de las proteínas producto de expresión de los genes, se evaluaron 7 muestras del grupo 1 control e igual número para el grupo 2 con complementación con micronutrientes.

6.3 Evaluación del nivel de proteínas Keap1 y Nrf2 en placenta.

6.3.1 Extracción de Proteína Total de Placenta.

Preparación de la muestra: Se tomaron de tejido placentario 500 mg (Fracción A + Fracción B descritas en el capítulo 1, en 3 ml de buffer CellLityc (Sigma, Alemania) con inhibidor de proteasas, la muestra se trituró mecánicamente y se sometió a ultrasonido para obtener una solución de tejido homogénea, se incubó en baño frío por 30 min. y se centrifugó a 1000 rpm/ 10 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para medir la concentración de proteínas.

Una vez homogenizada la solución de lisis del tejido se procedió a cuantificar la proteína por medio de la técnica de ácido Bicinconinico con kit de la casa comercial Sigma en placa de 96 pozos de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Preparación reactivo de trabajo: Mezclar 50 partes de reactivo A más una parte de reactivo B hasta obtener el color verde claro.
2. Curva de calibración de 200mg/ml a 1000ug/ml en tubos ependorf de 1.5ml según como se indica en la tabla 1 del capítulo 1.
3. Se adicionaron 25 µL del blanco de cada estándar y de cada muestra en los pozos. Se adicionaron 200 µl de la solución W, Se incubó por 30 min a 37°C.
4. Se midió la absorbancia a 562nm.

De acuerdo al valor de proteína total encontrado en cada muestra, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de proteína para añadir en cada pozo, con el fin de encontrar la concentración que brindara una buena separación de las proteínas en la electroforesis. Para el caso de las muestras de placenta la mejor separación se logró con una concentración de 50 µg/µl.

6.3.2 Western Blot.

6.3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Una vez conocida la concentración de proteína total, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida o SDS-PAGE, este gel fue preparado en el laboratorio y consiste en dos fases de poliacrilamida a diferente concentración, la primera corresponde al gel de separación con 10 % de polímero, la segunda fase de gel es la de apilamiento contiene 4% del polímero y corresponde al lugar donde están los pozos de disposición de las muestras. Cada muestra fue sembrada intercalando los grupos de estudio, en conjunto con un marcador de peso molecular para proteínas (Bench mark, USA). La electroforesis se llevó a cabo haciendo una pre-corrida de 30 min a 60 voltios y luego se aplicaron 125 voltios por 90min, se usó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad (Hercules, California), empleando Tris-glicina (pH 8.8) como buffer.

6.3.2.2 Electro transferencia Blotting.

Una vez realizado el proceso anterior y obtenido el perfil proteico, se recuperó el gel, esta vez se desechó la porción al 4% y el gel remanente se situó sobre el soporte de nitrocelulosa, para proceder a realizar electro transferencia de las proteínas de placenta. La electro transferencia se llevó a cabo aplicando voltaje constante de 100 voltios por 90 minutos, se usó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad, empleando Tris-glicina (pH 8.6) como buffer a 4 °C.

6.3.2.3 Inmuno Blott.

La membrana de nitrocelulosa se incubó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas y observar el patrón de separación. Tomando como referencia el Marcador de peso molecular, se realizaron cortes en la membrana teniendo en cuenta los pesos de las proteínas de interés Keap1 (70 kDa), Nrf2 (68 kDa), B-actina (38 kDa), esta última usada como control interno

para normalizar los resultados. Los fragmentos de membrana, fueron lavados con buffer TBST y se bloquearon con leche de bovino al 2%, para evitar la fijaciones inespecíficas del anticuerpo primario, posteriormente se incubaron durante toda la noche con su respectivo anticuerpo policlonal marca Abcam, anti actina (1:2000) (ref: ab8226, USA), anti Nrf2 (1:500) (ref: ab31163, USA) y anti Keap1 (1:500) (ref: ab66620, USA). Luego cada membrana fue incubada con anticuerpo secundario HRP de la casa comercial Santacruz (ref: sc2004, USA), por 1 hora, el cual favorece la identificación de las proteínas de interés. Finalmente se retira el anticuerpo y se aplican lavados con buffer TBST.

6.3.2.4 Revelado.

En cuarto oscuro se procedió a aplicar Luminol a cada membrana con el fin de generar luminiscencia en las proteínas Keap1, Nrf2 y β -Actina, se observó la presencia de bandas luminosas en cada carril de muestra a los 7 min, 2 min y 1 minutos respectivamente. Para medir la intensidad de las bandas se expusieron películas radiofotográficas o fotosensibles marca Kodak en cada membrana y se revelaron con soluciones de la misma casa comercial. Estas películas fueron llevadas al escáner para digitalización de las imágenes para luego cuantificar por densidad óptica utilizando el software libre Image J.

6.4 Extracción de ADN de Placenta.

A las muestras seleccionadas se les extrajo el ADN a partir de 30 mg de tejido de placenta usando el kit comercial All prep DNA/RNA/protein mini Kit (QIAGEN) según el protocolo suministrado por la casa comercial. Una vez extraído el ADN de cada muestra, se cuantificó su concentración y calidad, usando los valores de absorbancia a 260/280 nm por espectroscopía UV.

6.5 Análisis de metilación de los promotores de Keap1 y Nrf2.

Para este análisis se utilizó el Kit de análisis de metilación de la casa comercial Qiagen (Analyzing EpiTect Methyl II PCR Array). El método se basó en la detección de la muestra de ADN después de digestión con una enzima de restricción sensible a metilación y una enzima de restricción dependiente de metilación. Estas enzimas digieren el ADN metilado y demetilado respectivamente. En la siguiente reacción, el ADN no digerido en cada reacción enzimática individual es cuantificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR, siglas en ingles), usando primers que flanquean la región promotora de interés. La fracción relativa de ADN metilado y demetilado es subsecuentemente determinada por la comparación de la cantidad de ADN en cada reacción donde no se adicionan enzimas.

El protocolo de este sistema, utiliza el ADN previamente extraído, el cual es distribuido en alícuotas en 4 porciones iguales para digestión así: 1. simulada sin enzimas, 2. digestión con enzima de restricción sensible a metilación, 3. digestión con enzima de restricción dependiente de metilación y 4. digestión con enzima dependiente de metilación y sensible a metilación. Las enzimas de restricción son mezcladas directamente con un máster-MIX para Q-PCR y son servidas en el plato de 96 pozos para Q-PCR, que contienen pre-alicuotado las mezclas de primers según diseño del plato.

El Q-PCR se programó usando las condiciones específicas indicadas en el protocolo del PCR Array, finalmente los valores obtenidos de ΔCT fueron llevados a una planilla para análisis de datos proporcionada por la casa comercial, la cual automáticamente calcula las cantidades relativas de fracción de ADN metilado y desmetilado.

El producto de la digestión simulada representa la cantidad detectada de ADN de entrada. En la digestión sensible a metilación (MS), la enzima de restricción digiere el ADN parcialmente metilado y desmetilado. El ADN restante

hipermetilado, en el cual todos los sitios CpG están metilados puede ser detectado por Q-PCR.

En la reacción de digestión dependiente de metilación (MD) la enzima de restricción digiere preferiblemente ADN metilado, el ADN desmetilado restante es detectado por Q-PCR.

En la reacción de digestión doble (MSD), ambas enzimas están presentes y todas las moléculas de ADN es decir regiones desmetiladas y metiladas son digeridas. Esta reacción mide la fracción de ADN que no fue digerida por las enzimas de restricción.

Este sistema provee el estado de metilación en % de ADN desmetilado y % ADN metilado, lo desmetilado representa la fracción del ADN de entrada que contenía sitios CpG no metilados en la región amplificada del gen, lo metilado representa la fracción de ADN genómico de entrada que contenía dos o más sitios CpG metilados en la región del gen objetivo o flanqueada.

6.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS ver 21, aplicando las pruebas de rangos de U de Mann Whitney con el fin de evaluar diferencias significativas entre las medianas de las poblaciones de estudio. Se aplicó la prueba de correlación de Spearman para determinar si existen correlaciones significativas entre las variables y co-variables determinadas en este trabajo de investigación, para cada estadístico se estableció como nivel de significancia $p < 0,05$.

7. RESULTADOS.

En la tabla 1, se muestran los datos antropométricos de las gestantes y de la placenta.

Tabla 1. Características de las gestantes y de la placenta.

Grupo	Control (n=7)	Micronutrientes (n=7)	Valor de P^a
<i>Características antropométricas de las mujeres gestantes</i>			
Edad (años)	20.9 ± 3.98	21.6 ± 3,78	0.736
Peso (Kg)	66.5 ± 10.53	57.28 ± 7.67	0.086
Talla (cm)	156.9 ± 3.39	155.0 ± 5.35	0.453
IMC (Kg/m²)	26.5 ± 3.73	23.9 ± 3.37	0.203
Edad gestacional (Sem)	39.5 ± 0.54	39.9 ± 1.09	0.477
Etnia			
Mestiza	7 (100%)	7(100%)	
Negra	-	-	
<i>Características de la Placenta</i>			
Peso (g)	453.1 ± 123.84	420.3 ± 82.8	0.570
Perimetro (cm)	57.4 ± 4.28	57.2 ± 3.31	0.918
Grosor (mm)	1.3 ± 0.26	1.5 ± 0.48	0.243

Valores presentados como la media ± Desviación estándar (SD).

a. estadístico de contraste T de Student.

7.1 Evaluación de los niveles de las proteínas Nrf2 y Keap1.

La técnica de electroinmuno transferencia o Western blot permite hacer la identificación específica de las proteínas de interés a través del uso de anticuerpos primarios y a su vez facilitan hacer la cuantificación de los péptidos con la unión de un anticuerpo secundario y un compuesto quimiolumincente que se observa como banda en el soporte de nitrocelulosa. La intensidad de luminosidad es captada en una placa radiofotográfica para

posteriormente ser medida como densidad óptica a través de digitalización de las bandas obtenidas. La Fig. 2, muestra los resultados en las placas radiofotográficas, cada banda y su intensidad representa a la proteína de interés en el extracto de placenta. Para este ensayo se dispusieron las muestras de cada grupo de estudio de manera intercalada con el fin de minimizar sesgos por manipulación en el procedimiento, en la figura 1a, se observan las bandas obtenidas para Nrf2 (68kDa) y β -actina (38 kDa), esta ultima usada como normalizador. La figura 1b muestra las bandas obtenidas para Keap1 (70kDa) al igual que β -actina (38 kDa). Cada montaje se realizó por separado y se utilizó como control positivo extracto proteico del mismo tejido.

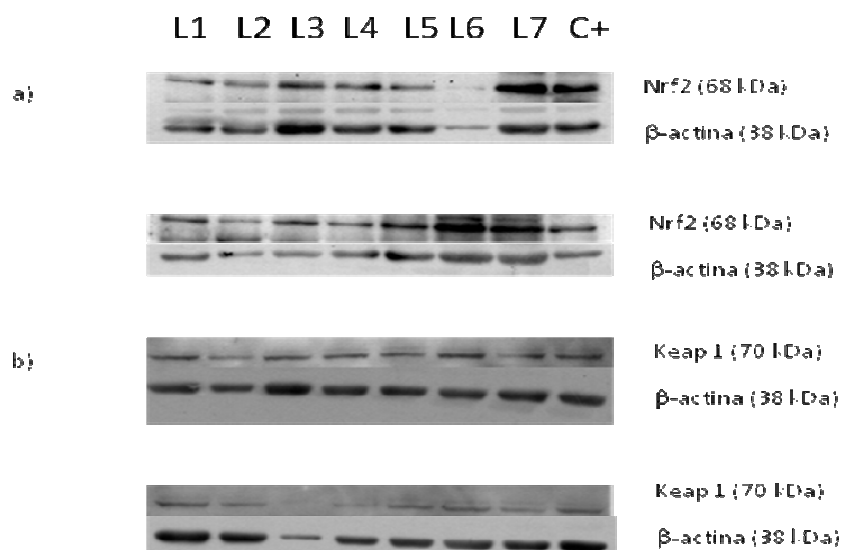


Figura 2. Western Blot para las muestras de estudio, (L1 a L7 muestras de proteína total), (C+, control positivo). (a) Bandas específicas para Nrf2 y β -actina, (b) bandas específicas para Keap1 y β -actina.

Con la digitalización de cada placa revelada, se usó el software libre ImageJ, versión 1,48, del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de America, para la obtención de la densidad óptica (píxeles) de cada banda, el software arroja una señal en forma de pico, la cual es proporcional a la intensidad de cada banda y se midió el área bajo las señales. En la tabla 2 y 3 se discriminan los resultados de las áreas obtenidas para Nrf2, Keap1 y β -actina en cada grupo de estudio, los valores de áreas corresponden a la media de tres

lecturas. La columna de la derecha en las dos tablas indica el valor normalizado para cada muestra.

Tabla 2. Cuantificación de Nrf2.

Grupo	Muestra	Área Nrf2*	Área β -Actina*	Relación Nrf2/ β -Actina
Control	1	5592	16042	0,349
Control	2	8389	24879	0,337
Control	3	5028	15448	0,325
Control	4	16370	18013	0,909
Control	5	4615	9375	0,492
Control	6	5541	6467	0,857
Control	7	6021	13573	0,444
Micronutrientes	8	4751	13653	0,348
Micronutrientes	9	7816	16322	0,479
Micronutrientes	10	825	3616	0,228
Micronutrientes	11	10289	15916	0,646
Micronutrientes	12	4394	9619	0,457
Micronutrientes	13	6310	15771	0,400
Micronutrientes	14	6322	7901	0,800

*Unidades de densidad óptica (píxeles)

Tabla 3. Cuantificación de Keap1.

Grupo	Muestra	Área Keap1*	Área β -Actina*	Relación keap1/ β -Actina
Control	1	4933	15466	0,319
Control	2	4312	22019	0,196
Control	3	2979	16628	0,179
Control	4	2593	18229	0,142
Control	5	6952	22484	0,309
Control	6	422	4208	0,100
Control	7	2883	14247	0,202
Micronutrientes	8	2821	11643	0,242
Micronutrientes	9	4184	16524	0,253
Micronutrientes	10	5211	16142	0,323
Micronutrientes	11	3007	15779	0,191
Micronutrientes	12	1578	10540	0,150
Micronutrientes	13	4071	12676	0,321
Micronutrientes	14	4175	19403	0,215

*Unidades de densidad óptica (píxeles)

La información obtenida en las tablas 2 y 3, fue usada para aplicar de forma exploratoria el test de normalidad o de distribución de frecuencias de Shapiro-Wilk y Homogeneidad de Varianzas, test de Levene. Estas pruebas mostraron que los datos cuantitativos de expresión de Nrf2 y Keap1 para el grupo control no tienen una distribución normal pero si para el grupo de micronutrientes ($p < 0,05$). La homogeneidad de varianzas arrojó que hay homocedasticidad en la expresión de proteínas para los grupos de estudio. Como los supuestos estadísticos para la aplicación de pruebas de contraste paramétricas se cumplen de manera parcial y el número de muestras es pequeño, se aplicó la prueba no paramétrica de rangos U de Mann Whitney, con el fin de establecer si la suplementación con micronutrientes a las gestantes tuvo algún efecto sobre la cuantificación de Nrf2 o Keap1 en la placenta frente al grupo control. Para ello se compararon las medianas de los grupos de estudio como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 3. El estadístico de contraste aplicado en los grupos de estudio (Anexo) para la mediana de las proteínas Nrf2 y Keap1 mostró el nivel de significancia mayor a 0,05.

Tabla 4. Niveles de proteínas y estado de metilación de las regiones promotoras de los genes en los grupos de estudio.

Grupo	Control (n=7)	Micronutrientes (n=7)	Valor de P^a
<i>Cuantificación de las proteínas en Placenta</i>			
KEAP 1	0.20 ± 0.08	0.24 ± 0.06	0.225
NRF2	0.44 ± 0.25	0.46 ± 0.19	0.848
<i>Estado de metilación de las regiones promotoras^b</i>			
Keap1			
Metilado (%)	0	0	
Desmetilado (%)	100	100	
Nrf2			
Metilado (%)	0	0	
Desmetilado (%)	100	100	

a. Prueba U de Mann Whitney

b. Estado de metilación por *PCR array methylation*.

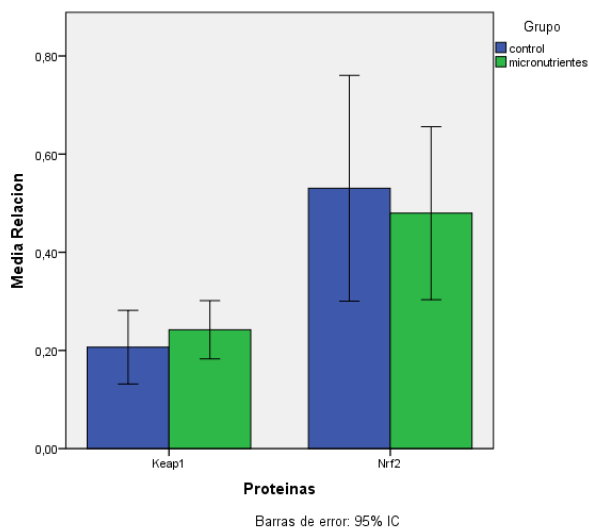


Figura 3. Diagrama de barras para el nivel de proteínas Keap1 y Nrf2 en los grupos de estudio.

7.2 Estado de metilación de los genes Nrf2 y Keap1.

Para determinar el estado de metilación de las regiones promotora de los genes Nrf2 y Keap1, fue usado el sistema EpiTect[®] Methyl II PCR Array. Esta tecnología permite analizar 22 genes simultáneamente y provee primers de ensayo prediseñados por la casa comercial con alta especificidad y eficiencia, para detectar en una muestra de ADN el estado de metilación de las regiones promotoras de nuestros genes de interés. En este estudio, se puede observar que en las muestras analizadas, las regiones promotoras de los genes Nrf2 y Keap1 en los grupos de estudio no presentan sus sitios CpG metilados (tabla 4)

Como complemento del estudio se realizó la correlación de las variables nivel de proteínas con covariables antropométricas de las madres y la placenta. El número de muestras en los grupos de estudio es menor de 30, se aplicó la prueba estadística no paramétrica de correlación bivariada de Spearman, para establecer asociaciones positivas o negativas entre la variable continua (expresión de proteína Nrf2 o Keap1) y las variables antropométricas peso, talla, Índice de masa corporal (IMC) y características de la placenta (peso, diámetro y grosor) en cada grupo de estudio. En las tablas 5 y 6 se observan

los resultados obtenidos para el estadístico Rho de Spearman en los grupos control o placebo y aquel que fue suplementado con micronutrientes. Para la gran mayoría de correlaciones hechas no hubo significancia estadística menor de 0,05, sin embargo en el grupo control, Keap1 correlaciono de manera negativa con la variable talla (Rho= -0,800, p<0,05).

Tabla 5. Correlación del nivel de Keap1 y Nrf2 con co-variables clínicas en el grupo control.

Variable	Nrf2		Keap1	
	r*	P	r*	P
Edad	-0.709	0.074	0.600	0.154
Peso	-0.321	0.482	-0.143	0.760
Talla (cm)	-0.055	0.908	-0.800	0.043
IMC	-0.500	0.253	0,214	0.645
Edad gestacional	-0.098	0.854	-0.098	0.854
Diámetro de placenta	0.519	0.233	0.482	0.274
Grosor de la placenta	0.306	0.504	-0.360	0.427
Peso de placenta	0.393	0.383	0.036	0.939

*Coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla 6. Correlación de expresión de Keap1 y Nrf2 con co-variables clínicas en el grupo de gestantes suplementado con micronutrientes.

Variable	Nrf2		Keap1	
	r*	P	r*	P
Edad	0.108	0.818	-0.198	0.670
Peso	-0.429	0.337	0.321	0.482
Talla (cm)	0.505	0.248	-0.144	0.758
IMC	-0.357	0.432	0,036	0.939
Edad gestacional	-0.543	0.208	0.225	0.628
Diámetro de placenta	-0.474	0.282	0.000	1.000
Grosor de la placenta	-0.250	0.589	0.500	0.253
Peso de placenta	-0.071	0.879	0.250	0.589

*Coeficiente de correlación de Spearman.

8. DISCUSION.

El estado de embarazo se conoce como una etapa crítica en la cual factores propios de la madre como alteraciones metabólicas, placentarias y factores externos pueden provocar en el feto cambios en el proceso de su desarrollo que en la vida postnatal pueden llevar a generar ECNT. Los factores endógenos como disfunción endotelial y mitocondrial, estrés oxidativo, variaciones en los niveles de adipoquinas probablemente están implicados en la programación temprana de las ECNT.

En esta fase del estudio se buscó mediante la cuantificación de Nrf2 y Keap1 en placenta, establecer el nivel de expresión de estas proteínas que regulan la actividad antioxidante frente al consumo de micronutrientes por parte de las gestantes. También determinar el grado de metilación de las regiones promotoras de los genes Nrf2 y Keap1 en los grupos de estudio. Esto puede contribuir a ampliar el campo del conocimiento encaminado a la prevención de enfermedades que afectan a las mujeres en la etapa del embarazo y su progenie, así como la de aquellas patologías crónicas que posteriormente puedan surgir.

Se conoce que el ambiente uterino es vital para el desarrollo exitoso del feto. Factores ambientales, como exposición a agentes exógenos, hábitos y modos de vida, influyen sobre el desarrollo fetal. Por otro lado la placenta como órgano transitorio feto-materno es el encargado de cumplir la función de transporte de nutrientes y desechos y es regulador de estado hormonal y metabólico tanto de la madre como del feto.

Los cambios metabólicos de la mujer embarazada, incrementan sus exigencias nutricionales, al igual que las del feto en formación. Las deficiencias nutricionales y la hipoxia en la placenta en esta etapa están relacionadas con el elevado estrés oxidativo, por lo que la inclusión de micronutrientes antioxidantes en la dieta de las gestantes se ha considerado como opción

viable en la prevención de enfermedades propias del embarazo, así como de las ECNT asociadas con el estrés oxidativo. Como se ha mencionado, la adecuada defensa celular, se activa ante la presencia de moléculas prooxidantes derivadas del anión superóxido y peroxinitritos y esta modulada por la maquinaria molecular de respuesta antioxidante. Los factores transcripcionales Nrf2 y Keap1 gobiernan el proceso anterior y contribuyen a la activación de la expresión coordinada de un conjunto de enzimas antioxidantes que finalmente contrarrestan la acción de las moléculas responsables del estrés oxidativo celular y mantienen el equilibrio redox.

De acuerdo con los resultados obtenidos, al aplicar la prueba estadística de rangos U de Mann Whitney (Tabla 4), se puede observar que al comparar los grupos de estudio, micronutrientes y control, para la mediana de Nrf2 y Keap1, el valor de significancia en ambos casos es mayor a 0.05 ($p=0.848$ y $p=0.225$ respectivamente), lo cual sugiere que no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de las proteínas estudiadas en los grupos intervenidos. Es decir, que la suplementación con micronutrientes antioxidantes (Vitamina C, A, E o α -tocoferol, Vitamina B3 o nicotinamida, Zinc y Selenio) en este estudio no evidenció efectos al término del embarazo sobre las proteínas de interés en la placenta, por tanto el mecanismo de respuesta antioxidante se mantiene inalterado con o sin el consumo de micronutrientes por parte de las gestantes sanas. En las bases de datos consultadas como Pubmed, Ebsco, Elsevier entre otras no se evidenciaron estudios sobre los niveles de Keap1 y Nrf2 en las embarazadas.

En este sentido se ha mencionado que la suplementación con micronutrientes antioxidantes tiene efectos sobre algunos marcadores bioquímicos, existen estudios de intervención con la suplementación de multivitamínicos (Vitamina A, E, D3, B1, B2, B6, B12, C, niacina, ácido fólico) y multivitaminicos más micronutrientes minerales (hierro, magnesio y calcio) sobre la dieta de mujeres en embarazo, en los que se midieron indicadores bioquímicos tanto en las madres como en sus recién nacidos, y se observaron efectos benéficos en los

niveles de magnesio, calcio y glutatión (GSH) en suero pero no en la Capacidad antioxidante total (TAC, siglas en ingles)¹⁷³. Lo que da a entender que la suplementación con multi micronutrientes genera efectos parcialmente benéficos sobre los mecanismos de defensa celular debido a que la TAC da indicios de la capacidad de respuesta antioxidante celular mediada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

Otro aspecto para tener en cuenta es que la disponibilidad de vitaminas antioxidantes en la circulación materna y placentaria puede hacer que los RLO, RLN y sus derivados estén siendo neutralizados rápidamente vía no enzimática, sin que sea necesario que se activen previamente la respuesta celular enzimática, en estudios recientes se encontró que en modelos animales usando ratas embarazadas, la suplementación con algunos antioxidantes tales como ácido fólico, vitamina B12 y ácidos grasos Omega 3, no mostró efectos benéficos sobre la actividad de enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx) y Super óxido dismutasa (SOD), frente a aquellos especímenes suplementados con Omega 3. También, se observó que el desbalance micro nutricional en las madres disminuye la actividad de SOD y GPx en las crías recién nacidas¹⁷⁴.

Acorde con los hallazgos de nuestro estudio se puede sugerir que los tratamientos con micronutrientes en el embarazo no están actuando directamente sobre la respuesta antioxidante vía enzimática, de esta manera la función de Nrf2 y Keap1 se mantiene inalterada con la presencia de vitaminas y minerales, estos últimos dentro de la fisiología materna en algunas ocasiones actúan como co-factores enzimáticos. Por otro lado, estudios de meta análisis en los cuales se han intervenido grupos de gestantes con micronutrientes (vitaminas A, B1, B6, ácido fólico, zinc, hierro y cobre), en su mayoría muestran efectos benéficos sobre variables antropométricas como peso adecuado al nacer y protección ante el riesgo de bajo peso al nacer, pero no hay efectos protectores sobre el riesgo de retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) y nacimiento a pre-término, estos resultados encontrados en 11 trabajos

realizados entre el año 2003 a 2008¹⁷⁵. Sin embargo, los estudios no tienen en cuenta los mecanismos bioquímicos que puedan estar relacionados con los hallazgos.

Con relación a la favorabilidad de la intervención dietaria con micronutrientes, estudios *in-vitro* con células del trofoblasto, muestran que el tratamiento con selenio aumenta la actividad de Tiorredoxina reductasa y de la GPx^{176,177}. El selenio es un cofactor de algunas enzimas antioxidantes y aparentemente tiene efecto a nivel postransduccional¹⁷⁸ y por ello la respuesta se ve exacerbada en este tipo de modelos, pero como suplemento dietario, no se encuentra evidencia del efecto sobre la expresión de Nrf2 y Keap1 y su función como activador transcripcional de la defensa celular mediada por enzimas.

Se debe tener en cuenta que en la investigación de la cual se derivó el presente estudio, las maternas participantes pertenecían a estratos socioeconómicos bajos donde se asumieron deficiencias nutricionales en su alimentación.

En las tablas 5 y 6 se observan los resultados obtenidos para el estadístico Rho de Spearman, para el grupo control o placebo en las co-variables correlacionadas con el nivel de proteínas, se encuentra que solo hay correlación estadística significativa para la Talla de la gestante frente a Keap1, sin embargo, esta correlación no se da en el grupo de gestantes suplementada con micronutrientes, de igual manera no hay correlación con las otras co-variables para este último grupo, por lo cual se infiere que no existe ninguna influencia de las co-variables analizadas de cara a la expresión de las proteínas estudiadas.

Se ha encontrado que el estado nutricional en las mujeres embarazadas tiene efecto sobre los patrones de metilación de ADN en los tejidos en desarrollo, esto aplica tanto en la placenta como en el feto. La deficiencia en la ingesta de micronutrientes ha evidenciado cambios drásticos en el genotipo del feto y se

sabe que en la placenta puede afectar procesos como los mecanismos de respuesta antioxidante ¹⁷⁹.

En la Tabla 4 se puede observar que en las muestras analizadas, las regiones promotoras de los genes Keap1 y Nrf2 presentan sus sitios CpG carentes de metilación. Para los dos grupos de estudio el grado de metilación en ambos genes fue de aproximadamente del 0%. Estos hallazgos indican de manera preeliminar que específicamente en las regiones promotoras de los genes Keap1 y Nrf2, el patrón de metilación es igual en el grupo intervenido con micronutrientes como en el grupo control o placebo. Con esta información se puede inferir que con la intervención con micronutrientes antioxidantes no hubo alteración de los patrones de metilación de los genes estudiados en la placenta de las madres. Los estudios en modelos animales sobre suplementación de la dieta de ratas en embarazo indican que algunos micronutrientes como el ácido fólico y la vitamina B12 actúan como cofactores de las metil transferasas que están involucradas en la donación de metilos en el ciclo del carbono, así como en los patrones de metilación global de la placenta ¹⁸⁰. En este tipo de modelos de estudio, se ha demostrado que en cáncer de próstata la inclusión en la dieta de una mezcla de tocoferoles (α, β, γ), los ratones que desarrollan cáncer de próstata sufrieron modificaciones epigenéticas logrando bajos porcentajes de metilación de la región promotora y por tanto mayor de expresión de Nrf2 con respecto al grupo que no recibió la mezcla de tocoferoles, las evidencias experimentales también indican que se logró reprimir la expresión de las DNA metil transferasas (DNMT's), responsables de los procesos de metilación de citosinas ¹⁸¹. En este sentido la intervención de las gestantes en la presente investigación, incluyó en su dieta α -tocoferol, que de acuerdo a los estudios mencionados anteriormente puede haber influido sobre la carencia de metilación en las regiones promotoras tanto de Keap1 como de Nrf2. Sin embargo, en el grupo control o placebo se encontraron iguales resultados por lo que es probable que las gestantes hayan incluido en sus hábitos alimenticios, productos con tocoferoles, responsables de que no haya ningún efecto epigenético por posible inhibición de las DNMT's, independientemente

de la disponibilidad de donadores de grupos metilos como la SAM proveniente del ciclo de la metionina o del ciclo del metabolismo del carbono. En todo caso, los posibles mecanismos que mantienen libres de grupos metilos los sitios CpG aquí mencionados, se deben corroborar por otras pruebas bioquímicas como actividad de las DNMT's, niveles de Homocisteina tanto en las gestantes como en sus recién nacidos. Otro aspecto para tener en cuenta es que en ausencia de metilación de los promotores de expresión génica, la regulación sobre la transcripción de Keap1 y Nrf2 puede estar a cargo de la acetilación de histonas o por mecanismos post transcripcionales mediados por miRNA. Por estas razones y por tratarse de una intervención en la que no se requirió control estricto en el consumo de los suplementos y de la dieta de cada gestante, en el futuro los estudios deberán estar encaminados a esclarecer sobre los posibles mecanismos que están regulando los niveles de Keap1 y Nrf2 en la placenta.

9. CONCLUSIONES.

Al comparar con el grupo control, la intervención con micronutrientes en gestantes aparentemente sanas no evidenció diferencias en la expresión de Nrf2 y Keap1 en la placenta de mujeres primigestantes que recibieron tratamiento con micronutrientes

Se considera por ello que aunque no hubiese diferencias estadísticamente significativas en los niveles de Nrf2 y Keap1 en los grupos de estudio, el comportamiento de la expresión de las proteínas de interés, sugiere que la suplementación con micronutrientes puede contribuir de manera independiente a que se mantenga entre moléculas oxidantes y antioxidantes el equilibrio necesario para el óptimo funcionamiento de los mecanismos celulares.

El estado nutricional de la madre, principalmente con respecto a micronutrientes está relacionado con los procesos epigenéticos y se ha reconocido como importante para el buen desarrollo del embarazo y de su descendencia. En el presente estudio se evidenció de manera preliminar que el estado de metilación de las regiones control de los genes Keap1 y Nrf2 en la placenta de mujeres primigestantes que recibieron tratamiento con micronutrientes, no muestran cambios respecto a las gestantes sanas que sirvieron de control, por lo que se considera que en estos primeros hallazgos independientemente de la suplementación de la dieta de las gestantes con vitaminas antioxidantes y oligoelementos, no se ve afectado el mecanismo de defensa celular dependiente de vías enzimáticas.

10.PERSPECTIVAS.

Los investigadores han planteado la hipótesis que la suplementación con micronutrientes trae beneficios tanto para la gestante como para el feto en desarrollo y previene la posible aparición de desordenes propios del embarazo como son las ECNT a su progenie. En este orden de ideas, la dilucidación de los mecanismos fisiológicos en la placenta subyacentes a la suplementación con micronutrientes son poco conocidos, por ello es importante enfocar los esfuerzos en conocer de manera más amplia la influencia de micronutrientes antioxidantes sobre la actividad del conjunto de enzimas encargadas de los mecanismos de de-toxificación de fase II y los mecanismos de metilación tanto del ADN como de histonas, debido a que los resultados previos sugieren que posiblemente las vitaminas antioxidantes y oligoelementos cobre, selenio, zinc y hierro están actuando directamente sobre los RLO y RLN y procesos a nivel postransduccional relacionados con la defensa celular y mecanismos epigenéticos.

Como las muestras de placenta correspondían a un estudio de intervención en el cual no se requirió control sobre la dieta de las gestantes, la continuación de la línea de investigación hace necesario explorar aún más en este sentido los mecanismos bioquímicos que rodean el proceso de sobrevivencia celular mencionados anteriormente.

11.BIBLIOGRAFÍA

- 1- Muller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet.* 2003;4(4):315-22.
- 2- Hung JH. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *J Chin Med Assoc.* 70. China (Republic : 1949-)2007. p. 430-2.
- 3- Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2012;12:66.
- 4- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976;295(7):349-53.
- 5- Vickers, M. H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L. and Gluckman, P.D. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism,* (2000) 279, E83-87.
- 6- Garofano A, Czernichow P, Breant B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia.* 1998;41(9):1114-20.
- 7- 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(Pt 1):141-52.
- 8- Maquileo, M. Programación fetal de las enfermedades metabólicas rev. *Farmacol. Chile* (2014) 7(1):41
- 9- Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35(7):595-601. Barker, D. J. P. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal.* 311:171–174.
- 10- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989;2(8663):577-80.
- 11- PIZARRO Q T. Intervención nutricional a través del ciclo vital para la prevención de obesidad y otras enfermedades crónicas no transmisibles.

Revista chilena de pediatría. 2007;78:76-83.

- 12- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*. 2004;10(14):1677-94.
- 13- Lillycrop KA, Rodford J, Garratt ES, Slater-Jefferies JL, Godfrey KM, Gluckman PD, et al. Maternal protein restriction with or without folic acid supplementation during pregnancy alters the hepatic transcriptome in adult male rats. *Br J Nutr*. 2010;103(12):1711-9.
- 14- 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;4(9):e7271.
- 15- 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(1):72-80.
- 16- Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics*. 2007; 2(2):119-25.
- 17- Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics*. 2007;2(2):119-25
- 18- Ke X, Lei Q, James SJ, Kelleher SL, Melnyk S, Jernigan S, et al. Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats. *Physiol Genomics*. 2006;25(1):16-28.
- 19- Constancia M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature*. 2004;432(7013):53-7.
- 20- Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes*. 2005;54(7):1899-906.
- 21- Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*. 2002;132(8 Suppl):2393s-400s.
- 22- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 1999; 23: 314-8.

- 23- Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro E.M, Pereira-Leite L, & Quintanilha A, et al., LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis* 2004;177:391–399.
- 24- Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, Kendall MJ, Brydon P, Dunne F. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci*. 2004;106(1):93-8.
- 25- Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet*. 2003; 267(4):189-95.
- 26- Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(5):609-13.
- 27- Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S. F(2)-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. *Free Radic Res*. 2009;43(6):546-52.
- 28- Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, Croft KD, Walters BN, Michael CA. Plasma and urinary 8-iso-prostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy. *Clin Sci (Lond)*. 1996;91(6):711-8.
- 29- 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*. 2006;128(1-2):209-15.
- 30- Coughlan MT, Vervaaert PP, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta*. 2004;25(1):78-84.
- 31- 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(2-3):327-32.
- 32- 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(4):187-92.
- 33- 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(4):395.e1-9.
- 34- Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, et al. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol*. 2005;19(4):487-92.
 - 35- Min J, Park H, Park B, Kim YJ, Park J, Lee H, et al. Paraoxonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: Relationship with maternal oxidative stress and neonatal birthweights. *Reprod Toxicol*. 2006;22(3):418-24.
 - 36- 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(5):418-23.
 - 37- Myatt L, Kossenjans W, Sahay R, Eis A, Brockman D. Oxidative stress causes vascular dysfunction in the placenta. *J Matern Fetal Med*. 2000;9(1):79-82.
 - 38- Trejo RC. Maternal mortality. Evolution and studies in Mexico in the last 25 years. *Ginecol Obstet Mex* 1997;65:317 e 325.
 - 39- Bartha JL, Comino-Delgado R, Bedoya FJ, Barahona M, Lubian D, Garcia-Benasach F. Maternal serum nitric oxide levels associated with biochemical and clinical parameters in hypertension in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;82(2):201-7.
 - 40- Hong J, Park EA, Kim YJ, Lee HY, Park BH, Ha EH, 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(10):998-1005.
 - 41- Lee BE, Hong YC, Lee KH, Kim YJ, Kim WK, Chang NS, Park EA, Park HS, HannHJ. 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(10): 1365-71.
 - 42- 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(6):363-7.
 - 43- 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(5):377-84.
- 44- Racasan S, Braam B, van der Giezen DM, Goldschmeding R, Boer P, Koomans HA, et al. Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 44: 83–88.
 - 45- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Handb Exp Pharmacol*. 2010(196):233-66.
 - 46- Kapiszewska M. A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet. The Mediterranean versus other European countries. *Forum Nutr*. 2006;59:130-53.
 - 47- Lee JS, Surh YJ. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett*. 2005;224(2):171-84.
 - 48- Massrieh W, Derjuga A, Blank V. Induction of endogenous Nrf2/small maf heterodimers by arsenic-mediated stress in placental choriocarcinoma cells. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(1-2):53-9.
 - 49- Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:66.
 - 50- Yu S, Khor TO, Cheung KL, Li W, Wu TY, Huang Y, et al. Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PLoS One*. 2010;5(1):e8579.
 - 51- Kielmann AA, Taylor CE, Parker RL. The Narangwal Nutrition Study: a summary review. *Am J Clin Nutr*. 1978;31(11):2040-57.
 - 52- Christian P. Micronutrients, birth weight, and survival. *Annu Rev Nutr*. 2010;30:83-104.
 - 53- Smith CA. Effects of maternal undernutrition upon the newborn infant in Holland (1944–45). *J Pediatr* 1947; 30: 229-43.
 - 54- Gopalan C. Multiple micronutrient supplementation in pregnancy. *Nutr Rev*. 2002;60(5 Pt 2):S2-6.
 - 55- Haider BA, Bhutta ZA. Multiple-micronutrient supplementation for women

- during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(4):Cd004905.
- 56- Fawzi WW, Msamanga GI, Urassa W, Hertzmark E, Petraro P, Willett WC, et al. Vitamins and perinatal outcomes among HIV-negative women in Tanzania. *N Engl J Med*. 2007;356(14):1423-31.
 - 57- Zagr  NM, Desplats G, Adou P, Mamadoultaiou A, Aguayo VM: Prenatal multiple micronutrient supplementation has greater impact on birthweight than supplementation with iron and folic acid: a cluster-randomized, double-blind, controlled programmatic study in rural Niger. *Food Nutr Bull* 2007, 28(3):317-27.
 - 58- Shankar AH, Jahari AB, Sebayang SK, Aditiawarman ,Apriatni M, Harefa B, Muadz H, et al. Effect of maternal multiple micronutrient supplementation on fetal loss and infant death in Indonesia: a double-blind cluster-randomised trial. *Lancet* 2008, 371(9608):215-227.
 - 59- Shah PS, Ohlsson A. Effects of prenatal multimicronutrient supplementation on pregnancy outcomes: a meta-analysis. *Cmaj*. 2009;180(12):E99-108.
 - 60- Pena-Rosas JP, Viteri FE. Effects of routine oral iron supplementation with or without folic acid for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(3):Cd004736.
 - 61- Rakel D. *Integrative Medicine*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007.
 - 62- Mason, MB. Vitamins, trace minerals, and other micronutrients. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: chap 237.
 - 63- Hamrick I, Counts SH. Vitamin and mineral supplements. *Prim Care*. 2008;35(4):729-47.
 - 64- Zeng L, Yan H, Cheng Y, Dibley MJ. Modifying effects of wealth on the response to nutrient supplementation in pregnancy on birth weight, duration of gestation and perinatal mortality in rural western China: double-blind cluster randomized controlled trial. *Int J Epidemiol*. 2011;40(2):350-62.
 - 65- Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. WITHDRAWN: Periconceptional

- supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(4):Cd001056.
- 66- Say L, Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ. Maternal nutrient supplementation for suspected impaired fetal growth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003(1):Cd000148.
 - 67- Rumbold A, Middleton P, Pan N, Crowther CA. Vitamin supplementation for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(1):Cd004073.
 - 68- Tomilin NV. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *Bioessays.* 2008; 30 (4): 338–48.
 - 69- Jiang T, Christian P, Khatry SK, Wu L, West KP, Jr. Micronutrient deficiencies in early pregnancy are common, concurrent, and vary by season among rural Nepali pregnant women. *J Nutr.* 2005;135(5):1106-12.
 - 70- Peña E, Sánchez A, Portillo Z, Solano L. Evaluación dietética de adolescentes embarazadas durante el primer, segundo y tercer trimestre. *ALAN* 2003 Jun; 53(2): 133-140
 - 71- Sacco L, Caufield L, Zavaleta N, Retamozo L. Dietary pattern and usual nutrient intakes of Peruvian women during pregnancy. *J Clin Nutr* 2003;57(11): 1492-7
 - 72- Hunt IF, Murphy NJ, Cleaver AE, Faraji B, Swendseid ME, Coulson AH, et al. Zinc supplementation during pregnancy: zinc concentration of serum and hair from low-income women of Mexican descent. *Am J Clin Nutr.* 1983;37(4):572-82.
 - 73- McCance R.A., Widdowson E.M. Nutrition and growth. *Proc. roy. Soc. B.* 1962; 156: 326
 - 74- Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6):1265-71..
 - 75- Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Jama.* 1999;281(15):1415-23.
 - 76- Jacob RA, Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care.* 2002;5(2):66-74.

- 77- Cameron E, Campbell A. The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact.* 1974;9(4):285-315.
- 78- Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, Schutt AJ, O'Connell MJ, Rubin J, et al. Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *N Engl J Med.* 1979;301(13):687-90.
- 79- Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET, Rubin J, O'Connell MJ, Ames MM. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med.* 1985;312(3):137-41.
- 80- Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, et al. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med.* 2004;140(7):533-7.
- 81- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(32):11105-9.
- 82- Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *Cmaj.* 2006;174(7):937-42.
- 83- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000;18(6):655-73.
- 84- Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 1997;95(4):1062-71.
- 85- Ginter E. Marginal vitamin C deficiency, lipid metabolism, and atherogenesis. *Adv Lipid Res.* 1978;16:167-220.
- 86- Yoshihara D, Fujiwara N, Suzuki K. Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. *Maturitas* 2010; 67:103-7.
- 87- Siekmeier R, Steffen C, Marz W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2007; 12:265-82.

- 88- Steger PJ, Mühlebach SF. Lipid peroxidation of i.v. lipid emulsions in TPN bags:the influence of tocopherols. *Nutrition* 1998; 14:179-85.
- 89- Miller E.R., Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E.Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-causemortality. *Ann Intern Med.* 2005; 142:37-46.
- 90- Combs GF, Jr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr.* 2001;85(5):517-47.
- 91- Suárez de Ronderos MdP, Michelsen Rueda J. El papel del selenio y la vitamina E en la prevención y tratamiento del cáncer de próstata. *Revista Costarricense de Salud Pública.* 2004;13:01-14.
- 92- Schwartz JL, Singh RP, Teicher B, Wright JE, Trites DH, Shklar G. Induction of a 70 kD protein associated with the selective cytotoxicity of beta-carotene in human epidermal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;169(3):941-6.
- 93- Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996;334(18):1145-9.
- 94- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996;334(18):1150-5.
- 95- Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(18):1483-92.
- 96- Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Manson JE, Willett WC. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:1390-9.
- 97- Groff JL. *Advanced Nutrition and Human Metabolism.* 2nd ed. St Paul: West Publishing; 1995.
- 98- Semba RD. The role of vitamin A and related retinoids in immune function.

- Nutr Rev. 1998;56(1 Pt 2):S38-48.
- 99- Semba RD. Impact of vitamin A on immunity and infection in developing countries. In: Bendich A, Decklebaum RJ, eds. Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001:329-346.
- 100- Solomons NW. Vitamin A and carotenoids. In: Bowman BA, Russell RM, eds. Present Knowledge in Nutrition. 8th ed. Washington, D.C.: ILSI Press; 2001:127-145.
- 101- Ross AC. Vitamin A and retinoids. In: Shils M, Olson JA, Shike M, Ross AC. ed. Modern Nutrition in Health and Disease. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:305-327.
- 102- Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. Nutr Rev. 1997;55(4):102-110.
- 103- Jane Higdon, Ph.D. Centro de Información de Micronutrientes. Vitamina A. Instituto Linus Pauling de la Universidad Estatal de Oregon. 2003. <http://lpi.oregonstate.edu/es/centroinfo/vitaminas/vitaminaA/>
- 104- Russell RM. The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity. Am J Clin Nutr. 2000; 71(4):878-884.
- 105- Brody T. Nutritional Biochemistry. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999.
- 106- Christian P, West KP, Jr. Interactions between zinc and vitamin A: an update. Am J Clin Nutr. 1998; 68(2 Suppl):435S-441S.
- 107- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Vitamin A. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, D.C.: National Academy Press; 2001:82-161.
- 108- Higdon J, Vitamina A. Micronutrient Information Center. Instituto Linus Pauling. Universidad Estatal de Oregon. 2003. Disponible en <http://lpi.oregonstate.edu/es/centroinfo/vitaminas/vitaminaA/>
- 109- Li F, Chong ZZ, Maiese K. Navigating novel mechanisms of cellular plasticity with the NAD⁺ precursor and nutrient nicotinamide. Front Biosci. 2004;9:2500-20.

- 110- Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules*. 2009;14(9):3446-85.
- 111- McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr*. 2000;130(5S Suppl):1437s-46s.
- 112- Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(3):281-91.
- 113- Prasad AS. Zinc deficiency in humans: a neglected problem. *J Am Coll Nutr*. 1998;17(6):542-3.
- 114- Dreosti IE. Zinc and the gene. *Mutat Res*. 2001;475(1-2):161-7.
- 115- Prasad AS, Kucuk O. Zinc in cancer prevention. *Cancer Metastasis Rev*. 2002;21(3-4):291-5.
- 116- Sun L, Chai Y, Hannigan R, Bhogaraju VK, Machaca K. Zinc regulates the ability of Cdc25C to activate MPF/cdk1. *J Cell Physiol*. 2007; 213 (1): 98 - 104.
- 117- Kambe T, Weaver BP, Andrews GK. The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis*. 2008, 46 (4): 214 - 228.
- 118- Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, Ahn RW, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran TV. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chem Biol*. 2011; 6 (7): 716 - 723.
- 119- Tian X, Diaz FJ. Zinc Depletion Causes Multiple Defects in Ovarian Function during the Periovulatory Period in Mice. *Endocrinology*. 2012; 153 (2): 873 - 886.
- 120- Dreosti IE. Zinc and the gene. *Mutat Res*. 2001; 475: 161–167.
- 121- Falchuk KH. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Mol Cell Biochem*. 1998;188(1-2):41-8.
- 122- Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):711-22.
- 123- Falchuk KH, Montorzi M. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *Biometals*. 2001;14(3-4):385-95.
- 124- Prasad AS. Zinc deficiency. *Bmj*. 326. England 2003. p. 409-10.
- 125- Cathomen T, Joung JK. Zinc-finger nucleases: the next generation

- emerges. *Mol Ther.* 2008;16(7):1200-7.
- 126- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol.* 2007; 177 (4): 637 - 645.
- 127- Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem.* 2004; 15 (10): 572 - 578.
- 128- Kelly RE, Mally MI, Evans DR. The dihydroorotase domain of the multifunctional protein CAD. Subunit structure, zinc content, and kinetics. *J Biol Chem.* 1986;261(13):6073-83.
- 129- Washabaugh MW, Collins KD. Dihydroorotase from *Escherichia coli*. Sulfhydryl group–metal ion interactions. *J Biol Chem.* 1986; 261: 5920 – 5229.
- 130- Conte D, Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *J Biol Chem.* 1996; 271: 5125 – 5130.
- 131- De Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology.* 2000; 53: 761 - 771.
- 132- Martin SJ, Mazdai G, Strain JJ, Cotter TG, Hannigan BM. Programmed cell death (apoptosis) in lymphoid and myeloid cell lines during zinc deficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 83: 338 – 343.
- 133- Bicknell GR, Snowden RT, Cohen GM. Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in human leukaemic cell line, U937. *J. Cell. Sci.* 1994; 107: 2483 – 2489.
- 134- Sunderman FW. The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci.* 1995; 25: 134 – 142.
- 135- Chimienti F, Aouffen M, Favier A and Seve M. Zinc homeostasis regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Curr Drug Targets.* 2003; 4: 323 – 338.
- 136- Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG,

- Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272 (30): 18530 - 18533.
- 137- Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F and Zalewski PD. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr.* 2000; 130: 1459 – 1466.
- 138- Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH and Zalewski PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: a review. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77: 272 – 278.
- 139- Chimienti F, Aouffen M, Favier A and Seve M. Zinc homeostasis regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Curr Drug Targets.* 2003; 4: 323 – 338.
- 140- Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology.* 2001; 11: 39 - 46.
- 141- Cousins RJ. Zinc. En: Ziegler EE, Filer LJ Conocimientos actuales sobre nutrición. Séptima Edición. Washington: International Life Sciences Institute, USA, 1999; 312 - 327.
- 142- Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals.* 2001; 14: 331 – 341.
- 143- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA. Identification of Potential Markers of Oocyte Competence Expressed in Bovine Cumulus Cells Matured with Follicle-Stimulating Hormone and/or Phorbol Myristate Acetate In Vitro. *Biol Reprod.* 2008; 79 (2): 209-222.
- 144- Underwood EJ, Suttle NF. Zinc. En: The Mineral Nutrition of Livestock. CABI Publishing. London, UK, 1999; 477 - 512.
- 145- Krezel A, Wojcik J, Maciejczyk M, Bal W. May GSH and L-His contribute to intracellular binding of zinc? Thermodynamic and solution structural study of a ternary complex. *Chem Commun.* 2003; 6: 704 – 705.
- 146- Wolffe, A.P. and Matzke, M.A. Epigenetics: Regulation through repression. *Science.* 1999; 286: 481-86.
- 147- Lin Y., ZhuoY., FangZ.F. Che L.Q. and Wu D. Effect of maternal dietary

- energy types on placenta nutrient transporter gene expressions and intrauterine fetal growth in rats. *Nutrition*. 2012; 28: 1037-1043.
- 148- Jaenisch, R. and Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. 2003; 33: 245-254.
 - 149- Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*. 2000; 9: 2395-2402.
 - 150- Margueron, R. and Reinberg, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature reviews. Genetics*. 2010; 11: 285-96.
 - 151- Ferguson, L. R. RNA silencing: Mechanism, biology and responses to environmental stress. *Mutation research*. 2011; 714: 93-94.
 - 152- Cerda, S. and Weitzman, S. A. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat. Res*. 1997; 386: 141–152.
 - 153- Valinluck, V., Tsai, H. H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A. and Sowers, L. C. 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.
 - 154- Turk P.W., Laayoun A., Smith S.S. and Weitzman S.A. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase, *Carcinogenesis*. 1995; 16: 1253–1255.
 - 155- Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet*. 2005; 1: 139-47.
 - 156- Mosharov E, Cranford MR, and 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.
 - 157- Day RM, Suzuki YJ, Fanburg BL. Regulation of glutathione by oxidative stress in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2003; 5(6):699-704.
 - 158- Lertratanangkoon K, Orkiszewski RS and Scimeca JM. Methyl-donor deficiency due to chemically induced glutathione depletion, *Cancer Res*. 1996; 56:995–1005.

- 159- Lertratanangkoon K, Wu CJ, Savaraj N, Thomas ML. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. *CancerLett.* 1997;120(2):149-56.
- 160- Avila MA, Carretero MV, Rodriguez EN, and Mato JM. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998; 114: 364–371,
- 161- Corrales FJ, Perez-Mato I, Sanchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, Garcia-Trevijano ER, Latasa U, Martinez-Chantar ML, Martinez-Cruz A, Avila MA, and Mato JM. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr* 2002; 132: 2377S–2381S.
- 162- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273:59-63.
- 163- Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17:3262-88.
- 164- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress *Free RadicBiol Med.* 1994;17:235-48.
- 165- Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radicalmediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylicHydrogen content. *Biochemistry* 1994. p. 4449-53.
- 166- García L, De la Cruz P. Nutrientes Específicos. Hacia una nutrición clínica individualizada.Grupo Aula Médica, Madrid. Librería aulamedica. España. 2013; 6: p.125-139.
- 167- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257:1220-5.
- 168- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362:709-15.
- 169- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Manzur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
- 170- Kensler Thomas W., Wakabayashi Nobunao, and Biswal Shyam. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47: 89–116.

- 171- Taghizadeh Mohsen, Samimi Mansooreh, Tabassi Zohreh, Heidarzadeh Zahra, Asemi, Zatollah. Effect of Multivitamin-Mineral versus Multivitamin Supplementation on Maternal, Newborns' Biochemical Indicators and Birth Size: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Oman Medical Journal*. 2014; 29 (2):123-129.
- 172- Roy S., Sable P., Khaire A., Randhir K., Kale A., Joshi S. Effect of maternal micronutrients (folic acid and vitamin B12) and omega 3 fatty acids on indices of brain oxidative stress in the offspring *Brain and Development*, 2014; 36(3):219-227.
- 173- Shah PS, Ohlsson A. Effects of prenatal multimicronutrient supplementation on pregnancy outcomes: a meta-analysis. *Cmaj*. 2009;180(12):E99-108
- 174- Watson M, van Leer L, Vanderlelie JJ, Perkins AV. Selenium supplementation protects trophoblast cells from oxidative stress. *Placenta*. 2012;33(12):1012-9.
- 175- Khera A, Vanderlelie JJ, Perkins AV. Selenium supplementation protects trophoblast cells from mitochondrial oxidative stress. *Placenta*. 2013;34(7):594-8.
- 176- Burk RF, Hill KE, Nakayama A, Mostert V, Levander XA, Motley AK, et al. Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(8):1617-23.
- 177- Berti C, Biesalski HK, Gartner R, Lapillonne A, Pietrzik K, Poston L, et al. Micronutrients in pregnancy: current knowledge and unresolved questions. *Clin Nutr*. 2011;30(6):689-701.
- 178- Kulkarni A, Dangat K, Kale A, Sable P, Chavan-Gautam P, Joshi S. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One*. 2011;6(3):e17706.
- 179- Huang Y, Khor TO, Shu L, Saw CL, Wu TY, Suh N, et al. A gamma-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.