

Detección de MATE1 y DNMT1 en placentas de pacientes con diabetes gestacional tratadas con y sin metformina

Pantoja Barroso Claudia Jimena¹, Villanueva Tapia Leydi Arlette¹, Lara Cano Naomi Yhoalibeth¹, Moreno Barroso María Belén¹, Gutiérrez Alvarado Miguel Isaías², Paulino González Ángel David³, Barbosa Sabanero Gloria³, Lazo de la Vega Monroy María Luisa³

¹ Departamento de Medicina y Nutrición; Universidad de Guanajuato, ² Universidad Humani Mundial, ³ Departamento de Ciencias Médicas; Universidad de Guanajuato,

g.barbosasabanero@ugto.mx, mlazo@ugto.mx

Resumen

La Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) es un problema de salud significativo tanto a nivel mundial como nacional. La ausencia del control metabólico de las pacientes embarazadas con esta condición aumenta el riesgo de complicaciones como preeclampsia, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, así como hipoglucemia neonatal, macrosomía, partos distócicos, obesidad infantil, óbitos, entre otros. Esto se relaciona con el concepto DOHaD “Los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad”, la cual afirma que los factores ambientales adversos durante el desarrollo fetal inducen cambios metabólicos que pueden impactar a corto y largo plazo.

La metformina se emplea para el tratamiento de la DMG y aún no se conoce completamente su impacto a nivel molecular en el tejido placentario y sobre la salud de la descendencia. Los mecanismos intracelulares que permiten a la metformina atravesar la barrera hemato-placentaria son objeto de investigación, mostrando interés en los transportadores del fármaco, como MATE1, el cual, en compañía de OCT3, proporciona una vía excretora del transporte de metformina desde el feto a la madre. Por otro lado, la DNMT1 es una enzima metil-transferasa que se destaca como posible contribuyente crucial en el origen de diversas enfermedades.

En este artículo se muestran los resultados de un estudio piloto realizado en un grupo de pacientes con embarazo fisiológico, embarazo con DMG en control con dieta y ejercicio, además de embarazo con DMG tratadas con metformina, donde se compararon los niveles de expresión proteica de MATE1 y DNMT1 mediante Western blot.

Palabras clave: metformina; placenta; diabetes gestacional; Dnmt1; MATE1.

Introducción

La Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), es una patología caracterizada por intolerancia a la glucosa, que se reconoce por primera vez durante el embarazo. La Federación Internacional de Diabetes estimó que en 2021, 21.1 millones (16.7%) de los nacidos vivos presentaron algún tipo de hiperglucemia en el embarazo, de los cuales 80,3% se debió a DMG¹.

El tamizaje para DMG se realiza entre las semanas 24 a 28 de gestación. En México, el diagnóstico puede realizarse de acuerdo a dos consensos, en un paso con una Curva de Tolerancia de Glucosa Oral (CTGO) con carga de 75 gr según el Consenso IADPSG o en dos pasos con un tamizaje de 50 gr y CTGO con carga de 100 gr con medición durante 3 horas en pacientes con valores plasmáticos de glucosa ≥ 140 mg/dL según el Consenso NIH¹. Algunas complicaciones fetales son macrosomía, hipoglucemia después del nacimiento, muerte neonatal y síndrome de distrés respiratorio, además la madre tiene mayor posibilidad de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en los próximos 5 o 10 años después del parto².

El tratamiento no farmacológico de la DMG es la dieta y ejercicio, esto con el objetivo de bajar los niveles de glucosa plasmática, controlar la ganancia de peso y minimizar las complicaciones materno-fetales. Sin embargo, si la meta de <95 mg/dL en ayuno y <120 mg/dL postprandial no lograra alcanzarse en dos semanas, se comienza con tratamiento farmacológico. La insulina es el tratamiento recomendado para la

DMG por su capacidad de disminuir los niveles de glucosa plasmática y de ser seguro para el producto, pero puede tener efectos adversos como la hipoglucemia si no se administra de forma adecuada. La segunda línea de tratamiento farmacológico son los hipoglucemiantes orales como la metformina².

La metformina es utilizada en el embarazo para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y diabetes mellitus gestacional (DMG)³, estudios *in vitro* e *in vivo* han establecido que la metformina atraviesa la placenta, en el momento del parto en la arteria y vena umbilicales que van desde concentraciones no detectables hasta concentraciones terapéuticas maternas, pero aún no hay evidencia suficiente que compruebe su seguridad a largo plazo^{4,5}.

Antecedentes y justificación.

La metformina se prescribe cada vez más durante el embarazo, con efectos maternos beneficiosos, reduciendo la presencia de macrosomía fetal, ingreso en cuidados intensivos neonatales, hipoglucemia neonatal y riesgo de preeclampsia. Sin embargo, el mecanismo exacto de su transferencia transplacentaria aún está por dilucidar³.

A pesar del paso de metformina a través de la placenta, en estudios *in vivo* e *in vitro* se ha visto que el embrión humano temprano puede no responder a la metformina debido al bajo contenido mitocondrial y la expresión insignificante de transportadores de metformina⁶. Aunque la evidencia es contradictoria, algunos estudios han demostrado que el tejido placentario retuvo sólo pequeñas cantidades de metformina y que es poco probable que esta concentración afecte su función⁷.

Otros estudios arrojan que hay una marcada relación entre las concentraciones de metformina materna, placentaria y fetal⁸. Cultivos de trofoblastos primarios expuestos a concentraciones de metformina clínicamente relevantes han reducido la respiración mitocondrial, la producción de ATP dependiente de las mitocondrias y los marcadores de estrés oxidativo⁵. La producción de energía placentaria tiene un papel importante en el apoyo al crecimiento fetal y el bienestar durante el embarazo, por lo que la disminución de ésta podría afectar al crecimiento fetal intrauterino y la programación metabólica a largo plazo en embarazos expuestos a metformina^{5,9}.

En estudios en modelos de ratas se ha concluido que MATE1 (transportador de metformina) se encuentra principalmente en el lado apical de la placenta (que mira hacia la madre) y que bombea cationes orgánicas desde el trofoblasto a la circulación materna, por lo que se piensa que desempeña un papel importante en la protección y desintoxicación fetal y que su expresión proteica es diferente en placentas a término de mujeres con diabetes gestacional que están en tratamiento con metformina comparadas con las que no consumen ésta^{4,6}.

DNMT1 es la principal enzima responsable de mantener los patrones de metilación después de la replicación del ADN¹⁰. La fisiología y morfología de la placenta está regulada críticamente por esta metilación. Por lo que la metiltransferasa DNMT1 puede estar relacionada con el crecimiento placentario y fetal en embarazos humanos. Un nivel de metilación mayor o menor en genes y tejidos específicos se ha asociado con varias patologías, como la obesidad y la diabetes^{10,11}.

Se vuelve cada vez más imperativo realizar más investigaciones sobre la metformina para garantizar que el medicamento sea seguro para la madre y la descendencia. Las investigaciones actuales sobre el tema se inclinan más hacia los beneficios que se ofrecen a la madre durante el embarazo¹².

El objetivo de esta investigación es evaluar la expresión proteica del transportador de metformina MATE1 y de la metiltransferasa DNMT1 en placentas a término de mujeres con diabetes gestacional con y sin tratamiento con metformina, así como en mujeres con embarazo fisiológico. Se busca comparar y analizar si existe una asociación entre la expresión de estas proteínas en la placenta y las variables clínicas, metabólicas y antropométricas de las madres y los neonatos.

Material y métodos

Población

Se incluyeron en el estudio mujeres embarazadas entre 18 a 35 años con edad gestacional de 37 a 41 semanas, con un embarazo normoevolutivo y mujeres embarazadas con DMG (diagnosticadas por primera vez en la gestación durante el segundo trimestre del embarazo, 24-28 SDG); tanto tratadas con metformina y como únicamente controladas con dieta y ejercicio. Todas con embarazos a término, con productos únicos, nacidos por parto eutócico o cesárea y sin sufrimiento fetal, del Hospital de Especialidades Materno Infantil de León, Gto.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad de Guanajuato (CIPIUG-P49-2022), y el Comité de Ética en investigación del Hospital de Especialidades Materno Infantil de León (CEI 20-2023). Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las Leyes Generales de Salud Mexicanas. Todas las participantes firmaron un consentimiento informado antes del reclutamiento.

No se incluyeron mujeres con diagnóstico de enfermedad hipertensiva del embarazo, diabetes pregestacional o tipo 2, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, enfermedades del tejido conectivo, enfermedades infecciosas crónicas, tabaquismo o alcoholismo durante el embarazo y aquellas que no dieron su consentimiento previo para estar en el estudio.

Los recién nacidos se clasificaron como pequeños para la edad gestacional (PEG), apropiados para la edad gestacional (AGA) o grandes para edad gestacional (GEG) con base en su peso al nacer y edad gestacional utilizando las tablas actualmente validadas para la población mexicana¹³.

Recolección de muestras

Dentro de la primera hora después del parto, se cortó un trozo de tejido placentario de 5 x 5 cm, incluidos los lados fetal y materno, a medio camino entre la inserción del cordón y el borde placentario, además de un lavado con PBS. El tejido placentario se congeló inmediatamente en hielo seco y se transportó para refrigerarse a -70 °C hasta su uso.

Las biopsias de placentas se dividieron en tres grupos, fisiológico (FIS), DMG tratada con dieta y ejercicio (DMGC) y DMG tratada con metformina (DMGM). Para realizar la investigación se tomaron 12 muestras de placentas: 4 FIS, 4 DMGC y 4 DMGM.

Procedimiento

Se tomaron 100 mg de cada placenta en un tubo rotulado con su respectivo código, abarcando la cara materna y la cara fetal, se añadieron 40 μ L de inhibidor de proteasas (mini complete ROCHE Cat.11836153001) y 400 μ L de amortiguador de lisis (100 mM de Tris-HCL, 1% NP-40, 1mM de EDTA, 250 mM de sacarosa, 150 mM NaCl, 100 mM pirofosfato de sodio, 100 mM de NaF y 10 mM de ortovanadato de sodio) en cada muestra. Se homogeneizó 15 segundos con polytron en hielo, con descansos de 15 segundos hasta completar 4 ciclos, o bien, hasta conseguir una muestra homogénea. Se incubó 2h a 4°C y se mezcló con ayuda del vortex cada 15 minutos. Al finalizar las 2h, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en alícuotas.

Western blot

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de Lowry, por duplicado. A todos los pozos se les agregó primero SDS al 0.2%, se realizó una curva estándar de proteína empleando BSA (1mg/ml) en un rango de 2.5 ng/ml (mezclando en vortex antes de cada uso). Se cargaron las proteínas recuperadas en las alícuotas en su celda correspondiente, se agregaron 100 μ L de mezcla (sulfato de cobre al 1%, tartrato de sodio y potasio al 2 % y solución alcalina de carbonato de sodio al 2 % en NaOH 1N). Se dejó incubar en placa de agitación orbital durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregó a cada pozo 20 μ L de reactivo de Folin. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se cubrieron con papel aluminio.

Se realizó la cuantificación de las proteínas mediante el uso de espectrofotómetro (Thermo Scientific) a una absorbancia de 630.

Las proteínas se transfirieron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% (para MATE 1) y al 8% (para DNMT1) se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas durante 2h en leche desnatada al 5% (para MATE1) y en BSA (para DNMT1) para reducir la unión no específica.

Luego, las membranas se incubaron durante 20 h con anticuerpo primario tanto MATE 1 (Cell Signaling Cat. 14550) y DNMT1 (abcam Cat. ab13537) con dilución 1:1000, se lavaron y se incubaron posteriormente con anticuerpo secundario cabra anti-conejo (abcam Cat. 97051) (1:155,000, para MATE 1) y anti-ratón (Sigma Cat. A9044) (1:5000 para DNMT1) durante 2h. Las bandas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de detección Western Luminol ECL Plus (Amersham, GE Healthcare). Las intensidades de las bandas se cuantifican mediante densitometría en un Chemidoc XRS + Molecular Imager®, utilizando el software Lab Image 3.0 (Bio-rad). La normalización de la intensidad de la banda se realizó mediante la detección de tubulina (como control de carga) con un anticuerpo primario monoclonal anti-alfa tubulina (Sigma, Cat. T6074, 1:8000,) usando anticuerpo anti-ratón como anticuerpo secundario (1:5000, Sigma, Cat. 9044).

Resultados

Se obtuvieron los datos antropométricos y clínicos tanto de las madres como de los recién nacidos (tabla 1) con previo consentimiento informado, fueron recolectados tanto del expediente clínico como de nuestras mediciones realizadas (peso de la placenta). Destacando de estos datos que la gran mayoría de los recién nacidos del grupo de diabetes gestacional tratado solo con dieta y ejercicio (DMGC), tanto como el que se trató con metformina (DMGM), fueron clasificados de acuerdo a la NOM-007-SSA2-2016 (norma oficial mexicana para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la persona recién nacida) como grandes para edad gestacional (LGA).

Tabla 1. VARIABLES CLÍNICAS Y METABÓLICAS MATERNAS

VARIABLE	CONTROL	DMGC	DMGM
Edad (años)	23.25 ±4.99	30 ±4.08	31.5 ±3.10
SDG	38.42 ±1.28	38.55 ±0.77	38.375 ±0.99
IMC	24.28 ±5.46	29.68 ±2.55	30.34 ±5.23
Glucosa (mg/dL)	94.5 ±20.07	101.25 ±26.46	89.75 ±7.80
HbA1c (%)	4.675 ±0.95	5.8 ±1.85	5.675 ±1.51
Colesterol total (mg/dL)	239 ±58.79	215.25 ±25.70	257.5 ±52.36
HDL (mg/dL)	58.5 ±8.18	51.25 ±25.0	48.50 ±10.98
LDL (mg/dL)	141.25 ±54.9	105.75 ±30	148.75 ±45.7
VLDL (mg/dL)	39.25 ±10.71	58.25 ±21.1	179.5 ±23.48
Triglicéridos (mg/dL)	194 ±56.60	292.5 ±103	265.25 ±142

En la tabla 1 se describe el promedio y desviación estándar tanto de las variables clínicas, antropométricas y metabólicas maternas, observamos que de acuerdo a los datos obtenidos en el expediente clínico, las semanas de gestación en los 3 grupos no muestra variación significativa entre ellos (encontrándose alrededor de 38 sdg). En cuanto al IMC sólo en el grupo control están dentro de rangos normales, en el grupo tratado solo con dieta y ejercicio está dentro de rangos correspondientes a sobrepeso, y obesidad en el caso del grupo tratado solo con metformina.

En cuanto a los resultados laboratoriales la glucosa se encuentra con más tendencia a la alta en el grupo de diabetes gestacional únicamente tratado con metformina. En cuanto al perfil de lípidos: colesterol total, LDL Y VLDL se encuentran en cifras mayores igualmente en el grupo tratado con metformina.

Tabla 2. VARIABLES CLÍNICAS Y METABÓLICAS DE LOS RN

VARIABLE (RN)	CONTROL	DMGC	DMGM
Capurro (SDG)	37.75 ±1.25	39.75 ±0.5	37.875 ±1.03
Peso placenta (g)	550.75 ±143	678.25 ±62	668 ±170
Peso al nacimiento (g)	3228.75 ±590.72	4037.75 ±339.55	3688.75 ±275.87
Talla (cm)	48.5 ±2.38	52.75 ±2.21	49.5 ±1
Perímetro cefálico (cm)	34 ±0.81	35.5 ±2.38	34.75 ±0.50
Perímetro abdominal (cm)	31.5 ±3.41	34.25 ±1.70	33.5 ±2.38
Glucosa (mg/dL)	87 ±14.09	73 ±8.12	57.25 ±19.12
Colesterol total (mg/dL)	69.5 ±17.59	66 ±14.78	74.75 ±8.84
HDL (mg/dL)	34.25 ±8.42	20.25 ±8.22	27.75 ±5.56
LDL (mg/dL)	29.75 ±11.87	39 ±10.92	39.75 ±12.96
VLDL (mg/dL)	5.5 ±1.29	7.75 ±3.09	7.25 ±1.25
Triglicéridos (mg/dL)	27.5 ±7.23	39.5 ±16.54	36 ±5.88

Tabla 3. ANÁLISIS DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES ENTRE RN LGA Y AGA POR GRUPO

GRUPO			CLASIFICACIÓN		TOTAL
			AGA	LGA	
FIS	Recuento		3	1	4
	% del total		25.0%	8.3%	33.3%
DMGC	Recuento		1	3	4
	% del total		8.3%	25.0%	33.3%
DMGM	Recuento		1	3	4
	% del total		8.3%	25.0%	33.3%
Total	Recuento		5	7	12
	% del total		41.7%	58.3%	100.0%

Tabla 4. PRUEBA DE CHI-CUADRADO

	VALOR	gl	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	2.743 ^a	2	.254
Razón de verosimilitudes	2.805	2	.246
Asociación lineal por lineal	1.886	1	.170
N de casos válidos	12		

Se observa el promedio y desviación estándar de las variables clínicas, antropométricas y metabólicas del recién nacido (tabla 2). Las semanas de gestación aquí fueron calculadas mediante la escala Capurro, encontrándose mediante este método un aumento en la edad gestacional del grupo de diabetes gestacional tratado solo con metformina en comparación al grupo tratado solo con dieta y ejercicio y el control. Tanto el promedio del peso de la placenta como el de los recién nacidos es más elevado en el grupo tratado solo con dieta y ejercicio, llegando a 4037 gramos el peso neonatal.

Se hizo el análisis de la diferencia de proporciones entre RN LGA y AGA de los 3 grupos (Tabla 4) y no se encontraron diferencias ($p=0.254$).

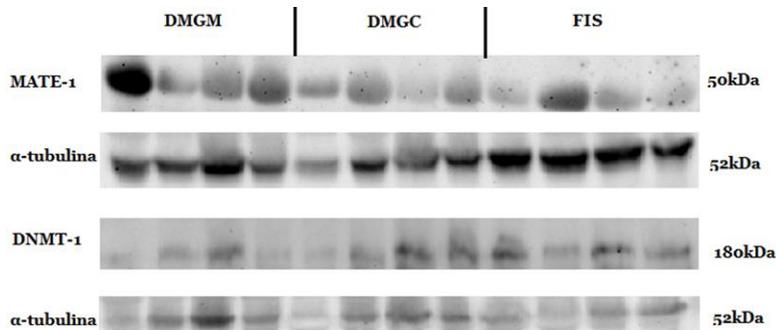


Figura 1. Inmunodetección de la proteína MATE-1 y DNMT1 en placenta y su respectivo control con alfa-Tubulina.

El análisis mediante Western blot reveló la presencia de las proteínas MATE-1 (50 kDa) y DNMT1 (180 kDa) en todas las muestras analizadas (Figura 1). Se observaron las bandas correspondientes a sus pesos moleculares en los extractos de las células tratadas. La intensidad de la banda para MATE-1 mostró una tendencia de expresión mayor en el grupo de DMGM en comparación al control con alfa-Tubulina. Por otro lado, para DNMT1 las bandas fueron más intensas en el grupo DMGC, indicando mayor tendencia de expresión de la proteína objetivo en este grupo.

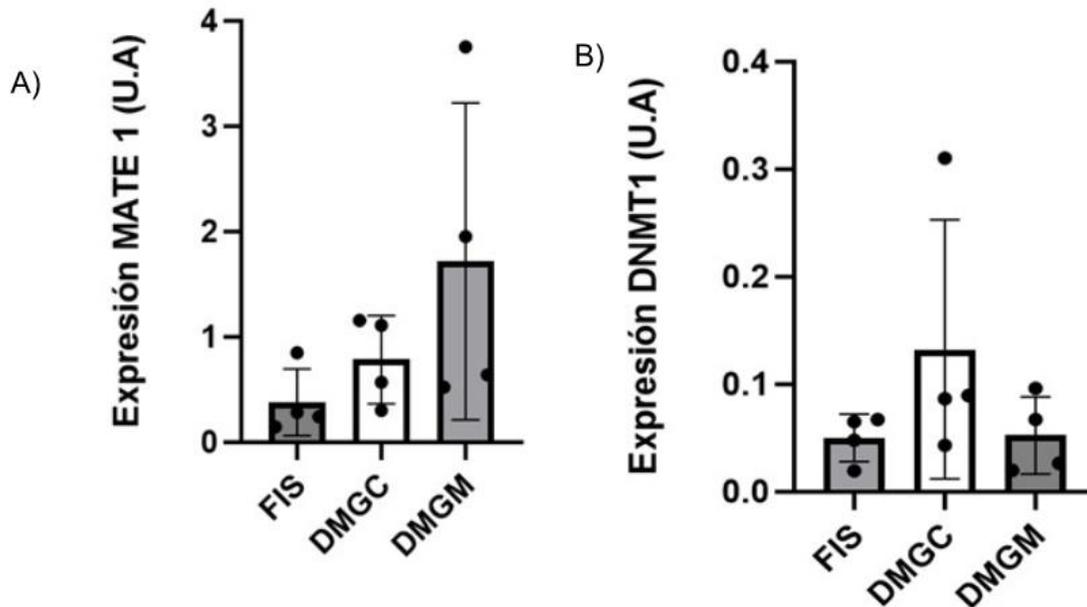


Figura 2. La gráfica A) representa el promedio de la expresión de MATE-1. La gráfica B) representa la expresión de DNMT-1.

Discusión

En este estudio piloto, las muestras placentarias de las pacientes evaluadas revelan la expresión de DNMT1 en todos los grupos. En el grupo DMGC, se observa una mayor tendencia en la expresión de esta metiltransferasa, así como un aumento de peso en las placetas en comparación con los otros grupos.

Estudios recientes destacan la relación entre los niveles de DNMT1 y la suplementación con ácido fólico, característica presente en la cohorte estudiada, por lo que resultaría interesante realizar estudios considerando la influencia de este y de otros suplementos, tanto de forma independiente como en conjunto con otras intervenciones no farmacológicas como la dieta y el ejercicio (especialmente el aeróbico), de los cuales se sabe son dos modificadores directos de los perfiles de metilación^{14,15}.

En modelos en placenta de ratas se observó un aclaramiento transplacentario de metformina dependiente de la concentración, tanto en dirección materno-fetal como feto-materna, MATE1 bombea cationes orgánicas desde el trofoblasto a la circulación materna, por lo que se piensa que desempeñan un papel importante en la protección y desintoxicación fetal y que su expresión proteica es diferente en placetas a término de mujeres con diabetes gestacional que están en tratamiento con metformina comparadas con las que no consumen ésta^{4,6}. En este estudio piloto se puede observar que parece haber una mayor tendencia a la expresión de MATE en el tejido placentario de embarazadas con diabetes gestacional tratadas con Metformina. La presencia de estos transportadores del fármaco podría asociarse a la permeabilidad de la barrera hemato-placentaria y a los niveles detectados en el recién nacido, pero es necesaria una población más grande para confirmar este comportamiento.

En cuanto el peso de la placenta como el del recién nacido se encuentra más elevado en el caso de la muestra correspondiente a diabetes gestacional con manejo únicamente con ejercicio y dieta en comparación al grupo control y el tratado con metformina. Esto apoya lo que muchas investigaciones arrojan sobre el beneficio mayor que tiene el uso de metformina en comparación al riesgo.

Conclusiones

Una posible asociación con la mayor expresión de MATE en el grupo DMGM surge como interrogante si a una mayor dosis de metformina aumenta su expresión, y si por ende incrementa los niveles del fármaco en la circulación fetal, y de ser el caso, cuál sería la relación con la concentración en la circulación materna.

Presuntivamente vincular la mayor expresión de DNMT1 con un aumento en el peso de las placetas del grupo DMGC crea la duda si hay un posible aumento en la metilación y en la transcripción de genes importantes para la fisiología fetal en estas pacientes, o bien, si esta expresión está protegiendo de un mecanismo que genera más grupos metilo y si el perfil de expresión se mantiene durante la etapa neonatal y adultez.

El peso placentario y neonatal fue mayor en el grupo con diabetes gestacional tratado solo con dieta y ejercicio, comparado con el que se le dio metformina, por lo que puede ser mejor un manejo farmacológico de la DMG para mejores resultados neonatales.

La expresión de ambas proteínas en este estudio piloto sugiere incrementar el tamaño de la cohorte analizada y profundizar en la relación con otras vías de señalización y su impacto en los diversos procesos fisiológicos además fisiopatológicos.

Bibliografía/Referencias

1. Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo.; 2016. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/320GER.pdf&ved=2ahUKEwjVzsDj-5iHAXUOH0QIHT7cDPcQFnoECAQQAQ&usq=AOvVaw2TDzM9J0-JsUH--1Nrl742>
2. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID, 10.^a edición. Bruselas (Bélgica): 2021. Disponible en: <https://www.diabetesatlas.org>
3. LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin action. *Endocr Rev* [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 29];42(1):77–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32897388/>
4. Ahmadimoghaddam D, Staud F. Transfer of metformin across the rat placenta is mediated by organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) protein. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2013;39:17–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623813000531>
5. Tarry-Adkins JL, Robinson IG, Reynolds RM, Aye ILMH, Charnock-Jones DS, Jenkins B, et al. Impact of metformin treatment on human placental energy production and oxidative stress. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022;10. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2022.935403>
6. Hebert JF, Myatt L. Metformin impacts human syncytiotrophoblast mitochondrial function from pregnancies complicated by obesity and gestational diabetes mellitus in a sexually dimorphic manner. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 29];12(3):719. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36978967/>
7. Garbarino VR, Santos TA, Nelson AR, Zhang WQ, Smolik CM, Javors MA, et al. Prenatal metformin exposure or organic cation transporter 3 knock-out curbs social interaction preference in male mice. *Pharmacol Res* [Internet]. 2019;140:21–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661818301038>
8. Tarry-Adkins JL, Aiken CE, Ozanne SE. Comparative impact of pharmacological treatments for gestational diabetes on neonatal anthropometry independent of maternal glycaemic control: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* [Internet]. 2020;17(5):e1003126. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1003126>
9. Jiang S, Teague AM, Tryggstad JB, Jensen ME, Chernausk SD. Role of metformin in epigenetic regulation of placental mitochondrial biogenesis in maternal diabetes. *Sci Rep* [Internet]. 2020 [cited 2023 Oct 29];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32433500/>

10. Mukhopadhyay A, Ravikumar G, Meraaj H, Dwarkanath P, Thomas A, Crasta J, Thomas T, Kurpad AV, Sridhar TS. Placental expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1): Gender-specific relation with human placental growth. *Placenta*. 2016 Dec;48:119-125. doi: 10.1016/j.placenta.2016.09.013. Epub 2016 Nov 1. PMID: 27871462.
11. Lazo-De-La-Vega-Monroy, M., Solís-Martínez, M., Romero-Gutiérrez, G., Aguirre-Arzola, V. E., Wrobel, K., Wrobel, K., Zaina, S., & Barbosa-Sabanero, G. (2017). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 promoter methylation is associated with placental protein expression in small for gestational age newborns. *Steroids*, 124, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.05.007>
12. Verma V, Mehendale AM. A review on the use of metformin in pregnancy and its associated fetal outcomes. *Cureus* [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 29];14(10). Available from: <https://www.cureus.com/articles/109567-a-review-on-the-use-of-metformin-in-pregnancy-and-its-associated-fetal-outcomes>
13. NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-2016, para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la persona recién nacida. (2016). Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5432289&fecha=07/04/2016#gsc.tab=0
14. Awazu M, Hida M. Folic acid supplementation alleviates reduced ureteric branching, nephrogenesis, and global DNA methylation induced by maternal nutrient restriction in rat embryonic kidney. *PLoS One*. 2020 Apr 6;15(4):e0230289. doi: 10.1371/journal.pone.0230289. PMID: 32251454; PMCID: PMC7135271.
15. Ding YX, Cui H. Effects of Folic Acid on DNMT1, GAP43, and VEGFR1 in Intrauterine Growth Restriction Filial Rats. *Reprod Sci*. 2018 Mar;25(3):366-371. doi: 10.1177/1933719117715128. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28639476.