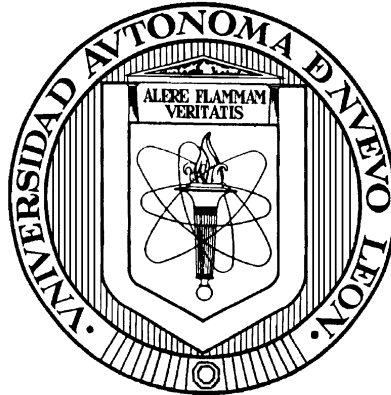


Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina



“Determinación del perfil de miRNAs circulantes en el primer trimestre del embarazo asociados con Diabetes Mellitus Gestacional”

Por:

**M.C.P. Valeria del Carmen Macías González**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Monterrey. N.L**

**Junio 2021**

**Determinación del perfil de miRNAs circulantes en el primer trimestre del embarazo asociados con Diabetes Mellitus Gestacional**

Aprobación de la Tesis:



---

**Dra. en C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda**  
Director de Tesis



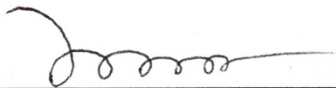
---

**Dr. en C. María del Carmen Barboza Cerda**  
Co-Director de Tesis



---

**Dr. en C. Alberto Camacho Morales**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

A mis padres *Efraín y Guillermina*, quienes han sido mi mayor apoyo a lo largo de todos estos años. Son mi más grande tesoro y la razón principal por la que he logrado crecer profesionalmente y cumplir todos mis sueños. Son un ejemplo de vida y jamás podré terminar de agradecerles lo mucho que me han impulsado a ser mejor día a día. ¡Lo logramos!

A mi esposo *Rolando* y *mi bebé Dante*, quienes son y siempre serán mi mayor motivación e inspiración para lograr mis objetivos. Rolando, desde el día uno has estado al pendiente de mí y no tengo palabras para agradecer todo tu cariño, comprensión y amor incondicional. Siempre me han impulsado a seguir trabajando y aprendiendo, sin dejar de soñar. Gracias por ser mi equipo.

A mis hermanos *Mabel* y *Nestor*, mis compañeros de aventuras desde hace 27 años. Siempre han sido un ejemplo a seguir gracias a la determinación y amor que ambos tienen en sus respectivas áreas. Gracias por acompañarme en el trayecto y apoyarme en mis sueños aunque eso significara estar lejos de ustedes. Gracias por ser mis mejores amigos.

A mi segunda familia *Rolando, Maribel, Lorena, Jorge, Ilse, Adrián, Marcelo* y *David*, quienes siempre estuvieron al pendiente de mí y me apoyaron en todo momento. Es muy bonito compartir con ustedes esta etapa y seguir creciendo y compartiendo logros juntos.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la *Dra. C. María del Carmen Barboza Cerda* por su apoyo y asesoría constante durante la realización de esta tesis. Gracias por depositar su confianza en mí desde el primer día, por motivarme y enseñarme todos los días lo interesante que es entender a profundidad la bioquímica aplicada en las enfermedades.

Al *Dr. C. Miguel Angel Déctor Carrillo* por su invaluable apoyo y consejos durante estos dos años. Gracias por motivarme a seguir mejorando y por los consejos recibidos en cada ensayo, aportando siempre sugerencias.

Al *Dr. C. Alberto Camacho Morales* por todo el apoyo brindado a lo largo de este trabajo, por los consejos y aportes de manera continua con el fin de mejorar nuestro trabajo.

A la *Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda* por su apoyo durante toda la maestría. Siempre viendo por sus alumnos y resolviendo nuestras dudas, motivándonos a seguir creciendo en el ámbito profesional. Muchas gracias por sus sugerencias al trabajo.

A la *Dra. C. Adriana Sánchez García* y al *Dr. Med. José Gerardo González González*, gracias por ser las primeras personas en enseñarme lo bonito que es el campo de la investigación y abrirme las puertas para comenzar a trabajar en el proyecto de diabetes mellitus gestacional. Son personas que admiro y es un privilegio trabajar en colaboración. Espero en un futuro seguir realizando nuevos proyectos y aprender mucho más.

A la *Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla* por darme la oportunidad de trabajar en el Departamento de Bioquímica, por todo el tiempo brindado, por confiar en nuestro proyecto y por los consejos brindados siempre para mejorar.

Al Dr. C. *Armando Hernández Mendoza* por su apoyo en el análisis bioinformático del proyecto. Muchas gracias por sus sugerencias al trabajo y su disponibilidad para colaborar y resolver siempre las dudas que llegaran a acontecer.

A mis amigos de generación: *Kassandra, Antonio, Rocío, Diana, Antonio y Fernanda*. Estos dos años aprendimos mucho, crecimos en todos los aspectos y no pude pedir mejor compañía en esta nueva etapa. Gracias por hacer el camino muy divertido y les deseo lo mejor en el futuro en sus respectivos planes. Fue un honor compartir maestría con ustedes.

**“Dulce es el fruto de la adversidad, que como el sapo feo y venenoso, lleva en la cabeza una preciosa joya”**

**WILLIAM SHAKESPEARE**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Lista de Figuras</b>	VI
<b>Lista de Tablas</b>	VIII
<b>Abreviaturas y Símbolos</b>	X
<b>Capítulo I.- Introducción</b>	
1.1 Diabetes Mellitus Gestacional	1
1.2 Epidemiología	1
1.3 Fisiopatología	2
1.4 Factores de riesgo	3
1.5 Complicaciones	4
1.5.1 Complicaciones maternas	4
1.5.2 Complicaciones fetales	4
1.6 Diagnóstico de DMG	5
1.6.1 Glucosa plasmática en ayuno y glucosa plasmática posprandial	5
1.6.2 Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (1 paso)	5
1.6.3 Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (2 pasos)	6
1.6.4 Desventajas	6
1.7 Biomarcadores de diagnóstico temprano	6
	I

1.7.1 Biomarcadores previamente estudiados	7
1.8 Modificaciones epigenéticas	7
1.9 miRNAs	7
1.9.1 Definición	7
1.9.2 Función de los miRNAs	9
1.10 Antecedentes de investigación	10
1.10.1 miRNAs y DMG en estudios a nivel mundial	11
1.10.2 miRNAs y DMG en México	12
1.11 miRNAs como biomarcadores de DMG	13
<b>Capítulo II.- Justificación</b>	<b>14</b>
<b>Capítulo III.- Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo IV.- Objetivos</b>	<b>16</b>
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
<b>Capítulo V.- Diseño Experimental</b>	<b>17</b>
5.1 Estrategia general	17
5.2 Tipo de estudio	18
5.3 Población de estudio	18
5.3.1 Criterios de inclusión	19
5.3.2 Criterios de exclusión	19
5.3.3 Criterios de eliminación	20
<b>Capítulo VI.- Materiales</b>	<b>21</b>
6.1 Material biológico	21

6.2 Material de laboratorio	21
6.3 Equipos	22
6.4 Reactivos	22
<b>Capítulo VII.- Métodos</b>	<b>24</b>
7.1 Extracción de miRNAs a partir de los pools de suero	24
7.1.1 Protocolo	24
7.1.2 Cuantificación y determinación de la calidad de miRNAs	25
7.2 Preparación de las bibliotecas de miRNAs	26
7.2.1 Protocolo completo	26
7.2.1.1 Ligación 3'	26
7.2.1.2 Ligación 5'	27
7.2.1.3 Síntesis de cDNA	27
7.2.1.4 Purificación de cDNA	27
7.2.1.5 Amplificación de biblioteca	27
7.2.1.6 Purificación de biblioteca	27
7.3 Análisis de calidad pre-secuenciación de biblioteca de miRNAs	28
7.3.1 Electroforesis de las bibliotecas de miRNAs en gel de agarosa	28
7.3.2 Cuantificación fluorométrica de bibliotecas de miRNAs	29
7.4 Secuenciación masiva en paralelo (RNAseq)	29
7.4.1 Análisis de control de calidad pre-secuenciación por el LNATCG	29
7.4.1.1 Electroforesis de bibliotecas de miRNAs	29

7.4.1.2 Purificación de las bibliotecas a partir de electroforesis en geles de policacrilamida (PAGE)	29
7.4.1.3 Verificación de las bibliotecas para RNAseq	30
7.5 Análisis bioinformático	30
<b>Capítulo VIII.- Resultados</b>	<b>32</b>
8.1 Muestra de estudio	32
8.1.1 Características clínicas de las pacientes de los pools de sueros	33
8.2 Extracción de miRNAs de suero	36
8.3 Bibliotecas de miRNAs	39
8.3.1 Cuantificación de las bibliotecas	39
8.3.2 Visualización de las bibliotecas de miRNAs	40
8.4 Secuenciación masiva en paralelo (RNAseq)	41
8.4.1 Control de calidad cualitativo de las bibliotecas de miRNAs	41
8.4.2 Purificación de bibliotecas de miRNAs	43
8.5 Rendimiento de las dos secuenciaciones de RNA	43
8.6 Análisis bioinformático	44
8.7 Identificación del perfil de miRNAs de DMG	45
8.8 Determinación de los miRNAs expresados diferencialmente	45
8.9 Identificación de miRNAs candidatos a biomarcadores	47
9.0 Búsqueda de genes blanco	52
<b>Capítulo IX.- Discusión</b>	<b>54</b>
<b>Capítulo X.- Conclusión</b>	<b>65</b>

<b>Capítulo XI.- Perspectivas</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1. Biogénesis y función de los miRNAs humanos</b>	<b>8</b>
<b>Figura 2. Perfiles de miRNAs circulantes en diferentes etapas de la diabetes gestacional y eventos fisiológicos durante el embarazo</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3. Estrategia general</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4. Procedimiento general del estuche miRNeasy Serum/Plasma</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5. Esquema del proceso de generación de bibliotecas de miRNAs</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6. Población de mujeres en el estudio</b>	<b>33</b>
<b>Figura 7. Extracción de miRNAs</b>	<b>38</b>
<b>Figura 8. Resultados de cuantificación de las bibliotecas</b>	<b>39</b>
<b>Figura 9. Análisis cualitativo de las bibliotecas de miRNAs</b>	<b>40</b>
<b>Figura 10. Tubería bioinformática</b>	<b>41</b>
<b>Figura 11. Control de calidad de las bibliotecas de miRNAs</b>	<b>42</b>
<b>Figura 12. Niveles de expresión relativos de miRNAs</b>	<b>46</b>
<b>Figura 13. Clasificación de miRNAs en base a expresión diferencial</b>	<b>47</b>

**Figura 14. Significancia estadística de miRNAs en el grupo CCD 49**

**Figura 15. Significancia estadística de miRNAs en el grupo CSD 50**

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1. miRNAs y DMG en estudios a nivel mundial</b>	<b>12</b>
<b>Tabla 2. miRNAs y DMG en México</b>	<b>13</b>
<b>Tabla 3. Criterios de inclusión para pacientes y controles</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 4. Criterios de exclusión para pacientes y controles</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 5. Pool de sueros de grupo Casos sin desenlaces adversos maternos y/o fetales (CSD)</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 6. Pool de sueros de grupo Casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales (CCD)</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 7. Pool de sueros de grupo control (CON)</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 8. Rendimiento de extracciones</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 9. Cuantificación de miRNAs de los pools</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 10. Generalidades de las dos secuenciaciones de RNA</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 11. Los 20 miRNAs más significativos del grupo CCD</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 12. Los 20 miRNAs más significativos del grupo CSD</b>	<b>51</b>



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>PTGO</b>	Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
<b>DMG</b>	Diabetes Mellitus Gestacional
<b>DMT 1</b>	Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>DMT 2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>GLUT-4</b>	Transportador de Glucosa Tipo 4
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina Glucosilada
<b>IRS-1</b>	Receptor de insulina Tipo 1
<b>miRNAs</b>	MicroRNAs
<b>mg/dL</b>	Miligramos por decilitro
<b>mmol/L</b>	Milimoles por litro
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de Polimerasa
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de Polimerasa tiempo real
<b>RT</b>	Transcripción Reversa
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa acoplada a Transcripción Reversa
<b>SDG</b>	Semanas de Gestación
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SOP</b>	Síndrome de Ovario Poliquístico
<b>UMI</b>	Índice Molecular Único
<b>μl</b>	Microlitro

## RESUMEN

### “Determinación del perfil de miRNAs circulantes en el primer trimestre del embarazo asociados con Diabetes Mellitus Gestacional”

**Nombre:** M.C.P. Valeria del Carmen Macías González

**Institución:** Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Localización:** Monterrey, Nuevo León

**Fecha de titulación:** Junio 2021

**Introducción:** La Diabetes Mellitus Gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa diagnosticada durante el segundo o tercer trimestre del embarazo. Afecta del 1 al 20% de los embarazos a nivel mundial. La prueba de tolerancia oral a la glucosa es el método diagnóstico “estándar de oro”. La DMG provoca en la madre y el feto complicaciones a corto y largo plazo. La detección del riesgo a desarrollar DMG en el primer trimestre del embarazo es un objetivo deseable, ya que las intervenciones farmacológicas y no farmacológicas podrían aplicarse tempranamente. Existe predisposición genética a la DMG como las modificaciones epigenéticas, donde los miRNAs juegan un papel potencial en la fisiopatología de la enfermedad. Los miRNAs son un tipo de RNA cortos, monocatenarios, no codificantes, de ~22 nt que regulan la expresión génica a nivel de la traducción. Algunos se han relacionado en procesos metabólicos tales como la homeostasis de la glucosa, la señalización de la insulina y la inflamación. La existencia de miRNAs circulantes en suero, los sugiere como potenciales biomarcadores específicos de complicaciones y de enfermedades. **Objetivo:** Identificar los miRNAs asociados al desarrollo de Diabetes Mellitus Gestacional durante el primer trimestre del embarazo. **Materiales y Métodos:** A partir de 205 muestras de suero de mujeres con  $\leq 12$  SDG, se formaron tres grupos de estudio, uno de controles y dos de casos (con y sin eventos adversos). Los miRNAs se extrajeron a partir de pools de 10 sueros de cada grupo que se usaron para preparar las bibliotecas con el QIAseq®miRNA library kit. La RNAseq se realizó en la plataforma Illumina NextSeq500 y los resultados se analizaron con los paquetes *DEGseq*, *edgeR*, *limma* y *NOISeq*. **Resultados:** Se encontraron un total de 255 miRNAs que se clasificaron por su expresión en el grupo de casos respecto al grupo control en 7 grupos: 48 regulados a la alta, 85 regulados a la baja y 75 inversamente expresados en los subgrupos de casos. De manera exclusiva, 39 regulados a la alta en CSD, uno regulado a la baja en CSD, 5 regulados a la alta en CCD y 2 regulados a la baja en CCD. **Conclusiones:** El perfil de miRNAs circulantes en sangre del primer trimestre de embarazo comprende un total de 255 miRNAs, 200 miRNAs son potenciales biomarcadores de DMG mientras que otros 43 miRNAs tienen el potencial de predecir desenlaces adversos.

---

Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda  
Directora

---

Dra. C. María del Carmen Barboza Cerda  
Co-Directora

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Diabetes Mellitus Gestacional

Según la Asociación Americana de Diabetes, la diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa diagnosticada por primera vez durante el segundo o tercer trimestre del embarazo, con ausencia previa a la gestación (American Diabetes Association, 2020). Esta enfermedad requiere de modificaciones inmediatas en el estilo de vida ya que se asocia de manera importante a complicaciones vasculares a largo plazo, dentro de las cuales se encuentran la vasculopatía, neuropatía y retinopatía (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2016).

#### 1.2 Epidemiología

La DMG puede afectar entre el 1 y el 20% de los embarazos a nivel mundial, dependiendo de la población estudiada, sus factores intrínsecos y extrínsecos (Iliodromiti et al., 2016). De las mujeres que tienen diabetes mellitus durante el embarazo, se estima que aproximadamente el 87.5% presentan DMG *per se*, 7.5% presentan diabetes mellitus tipo 1 (DMT 1) y el restante 5%, diabetes mellitus tipo 2 (DMT 2) (National Institute for Health and Care Excellence, 2015). En México, se estima que existe una prevalencia de DMG del 10 al 20% (Martínez-Ibarra et al., 2019) y por lo tanto, la mujer mexicana embarazada está en una mayor probabilidad de desarrollar esta

enfermedad, ya que pertenece a un grupo étnico de alto riesgo (Hinojosa Hernández et al., 2010). En la actualidad, el estilo de vida sedentario y la obesidad van incrementando en el mundo y en nuestro país, lo mismo que la prevalencia de DMG en mujeres de edad reproductiva.

Los factores epidemiológicos que se han asociado al aumento de la prevalencia de DMG son principalmente la presencia de tabaquismo, dieta rica en grasas saturadas, sedentarismo y obesidad (Ferrara, 2007).

### **1.3 Fisiopatología**

De manera fisiológica, el embarazo puede inducir una resistencia a la insulina en mujeres con factores de predisposición, provocado principalmente por la producción de hormonas placentarias como la corticotropina, la hormona de crecimiento, el lactógeno placentario y la progesterona, entre otras; lo cual puede producir una hiperglucemia materna si va acompañada de una respuesta secretora insuficiente a la insulina (Rodrigo & Glastras, 2018).

En el embarazo temprano, la secreción de insulina se incrementa y la sensibilidad a ésta puede permanecer sin cambios, disminuir o incrementar. Sin embargo, en el embarazo tardío, los depósitos de tejido adiposo disminuyen, los niveles de ácidos grasos libres posprandiales aumentan y la eliminación de glucosa mediada por insulina disminuye en un 40-60% en comparación con el periodo pre-embarazo (P. M. Catalano et al., 1993; Patrick M. Catalano et al., 1999)

Se conoce que el Receptor de Insulina Tipo 1 (IRS-1, *Insulin receptor substrate 1*) se encuentra disminuido en las pacientes con DMG, provocando una disminución en la translocación del Transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) y una disminución de la

captación de glucosa, en comparación con un embarazo que evoluciona de manera favorable. Se ha encontrado, que la concentración de adiponectina, una hormona sensible a la insulina, es significativamente menor en mujeres con DMG y disminuye aún más conforme avanza la gestación, lo cual también puede influir en la patogenia de la resistencia a la insulina. (Barbour et al., 2007).

#### **1.4 Factores de riesgo**

Se han reportado que factores como la edad avanzada, el sobrepeso, la obesidad, la ganancia excesiva de peso durante el embarazo, los antecedentes heredo-familiares de diabetes, un diagnóstico positivo de DMG en un embarazo previo, haber tenido un hijo con alguna anomalía genética o muerto al nacer, entre otros, se asocian al desarrollo de DMG (Organización Mundial de la Salud, 2016). Por su parte, la DMG incrementa el riesgo de complicaciones en el binomio materno-fetal a corto y a largo plazo, directamente proporcionales al grado de hipoglucemia, a las comorbilidades y a las complicaciones presentes.

Esto resalta la importancia del probable diagnóstico temprano de la DMG basado en biomarcadores para proporcionar el manejo adecuado de la mujer y de esta manera evitar efectos adversos asociados en ella misma o en su descendencia. Específicamente, el antecedente de diabetes mellitus es de suma importancia, ya que se presenta un descontrol glucémico que juega un papel determinante en las complicaciones no solo desde el momento de la concepción, sino durante todo el embarazo (Hinojosa Hernández et al., 2010).

## **1.5 Complicaciones**

### **1.5.1 Complicaciones maternas**

Los riesgos maternos a corto plazo incluyen la cesárea, la preeclampsia, la DMT 2 y a largo plazo la posibilidad de presentar enfermedad cardiovascular (Damm et al., 2016; Dias et al., 2018). Además, la retinopatía diabética puede exacerbarse rápidamente durante el embarazo, en caso de estar presente (National Institute for Health and Care Excellence, 2015).

### **1.5.2 Complicaciones fetales**

Los riesgos en el feto incluyen a corto plazo, muerte, malformaciones congénitas (de 4 a 10 veces más), macrosomía, distocia de hombro, prematurez, hipocalcemia e hipoglicemia neonatal y a largo plazo enfermedad coronaria, hipertensión arterial crónica, dislipidemia y obesidad acompañada de resistencia a la insulina (Hapo Group, 2008; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2016; National Institute for Health and Care Excellence, 2015)

Se ha demostrado, que la probabilidad de la aparición de malformaciones y aborto correlacionan directamente con el descontrol glucémico de la madre. Por lo tanto, mantener un excelente control glucémico en el primer trimestre del embarazo, puede reducir de manera significativa este riesgo, disminuyendo los niveles de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) en un promedio de 2.43% (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2016; Negrato et al., 2012; Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2013).

## **1.6 Diagnóstico de DMG**

En principio, el método diagnóstico “estándar de oro” para la DMG es la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG) que se realiza entre las 24-28 semanas de gestación (SDG), propuesta por la Asociación Internacional de Diabetes y su grupo de estudio del embarazo (Lee et al., 2020).

### **1.6.1 Glucosa plasmática en ayuno y glucosa plasmática posprandial**

El diagnóstico de DMG se establece cuando las mujeres presentan niveles de glucosa en ayunas de  $\geq 5.6$  mmol/L y  $\geq 7.8$  mmol/L o mayores en la toma de glucosa plasmática posprandial (2 horas).

Se recomienda realizar la determinación de la glucosa plasmática en ayunas durante la primera visita prenatal o antes de las 13 SDG con el propósito de detectar de manera temprana a las mujeres con DMT 2 no diagnosticadas previo al embarazo (Blumer et al., 2013).

### **1.6.2 Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (1 paso)**

En esta prueba se cuantifican los niveles de glucosa en suero a las cero, una y dos horas posteriores a la ingesta de 75 g de glucosa. El diagnóstico de DMG se establece cuando alguno de los tres valores obtenidos se encuentra aumentado sobre los valores de referencia (0 h: 92 mg/dL o 5.1 mmol/L, 1 h: 180 mg/dL o 10.0 mmol/L, 2 h: 153 mg/dL o 8.5 mmol/L) (American Diabetes Association, 2020).

### **1.6.3 Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (2 pasos)**

En esta prueba se cuantifican los niveles de glucosa en suero a la hora posterior a la ingesta de 50 g de glucosa. Si los niveles plasmáticos de glucosa son  $\geq 140$ mg/dl, se procede a la realización de una curva de tolerancia a la glucosa (PTOG). La PTOG debe realizarse en ayunas, con una carga de 100 g de glucosa y se cuantifican los niveles de glucosa en suero a las 0, 1, 2 y 3 horas posteriores a la carga. El diagnóstico de DMG se establece cuando 2 determinaciones se encuentran por arriba de los valores de referencia (American Diabetes Association, 2020).

### **1.6.4 Desventajas**

Algunas desventajas de esta prueba incluyen la extracción de múltiples muestras sanguíneas, la necesidad de realizar un ayuno de al menos 8 horas, además de ser poco tolerada por las pacientes a las que puede causar náuseas y vómito, lo que dificulta que completen la prueba (Dias et al., 2018).

## **1.7 Biomarcadores de diagnóstico temprano**

Según la Organización Mundial de la Salud, un biomarcador se define como “cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser cuantificado en el cuerpo o sus productos e influenciar o predecir la incidencia de algún proceso biológico o enfermedad” (Strimbu & Tavel, 2010). En años recientes, han proliferado estudios enfocados a la búsqueda de biomarcadores que permitan el diagnóstico temprano de la DMG a partir de métodos poco invasivos, como puede ser una muestra única de sangre materna.

### **1.7.1 Biomarcadores previamente estudiados**

Entre los biomarcadores tempranos, propuestos para la DMG incluyen a las proteínas tales como adiponectina, proteína C reactiva, fibronectina y lactógeno placentario (Rasanen et al., 2013), HbA1c (Khalafallah et al., 2016) y visfatina (Ferreira et al., 2011) entre otros. Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado tener validez suficiente para su aplicación en la práctica clínica. Se ha reportado previamente que la genética puede ser uno de los muchos factores implicados en la fisiopatología de la diabetes mellitus gestacional.

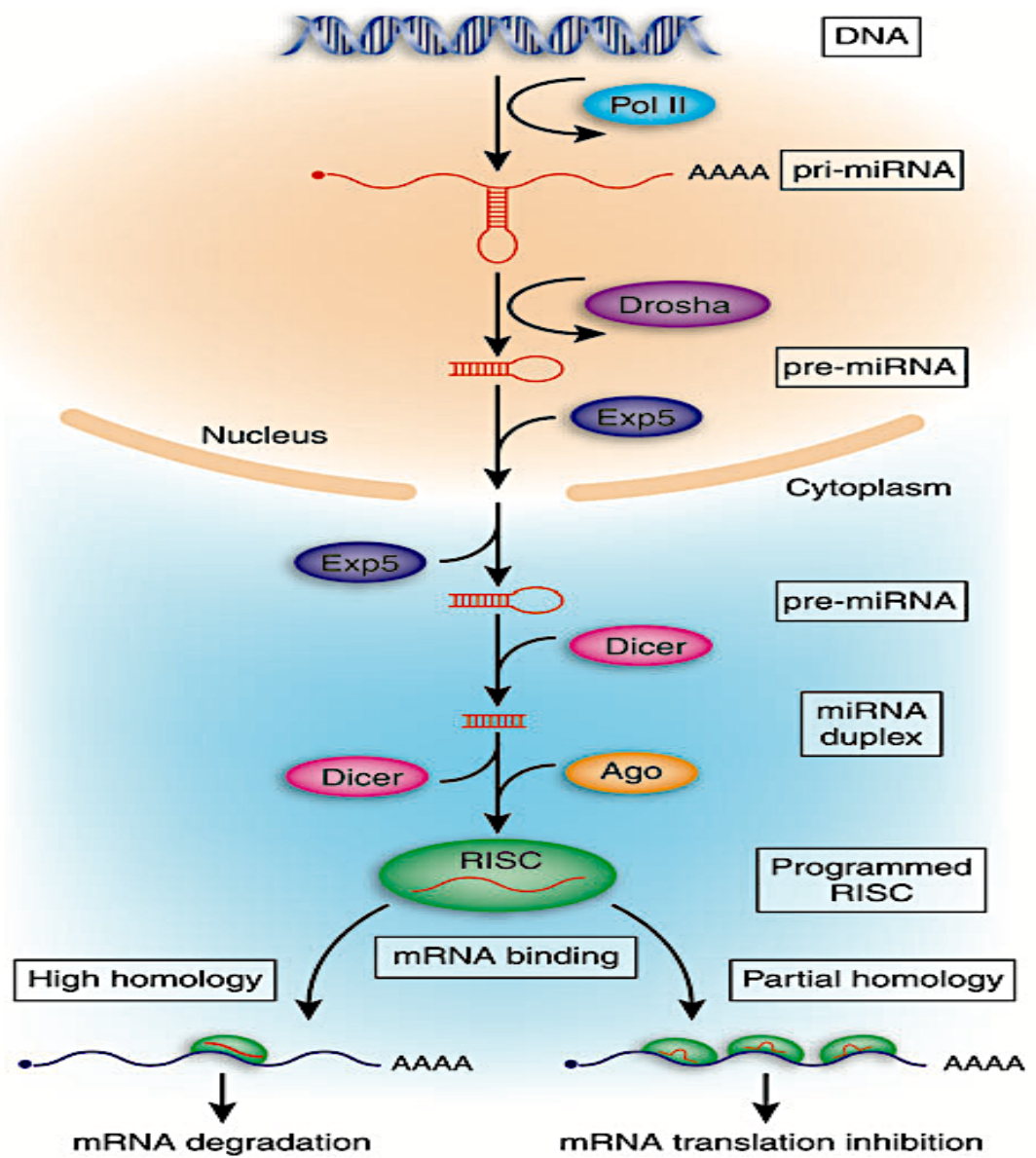
## **1.8 Modificaciones epigenéticas**

Adicionalmente, existe evidencia de predisposición genética a la DMG con la participación de modificaciones epigenéticas (Moen et al., 2017). En este sentido, existe un interés creciente en el papel potencial de los microRNAs (miRNAs) en la fisiopatología de la enfermedad y su valor en el diagnóstico temprano de DMG y para la posible prevención de la misma (Dias et al., 2018).

## **1.9 miRNAs**

### **1.9.1 Definición**

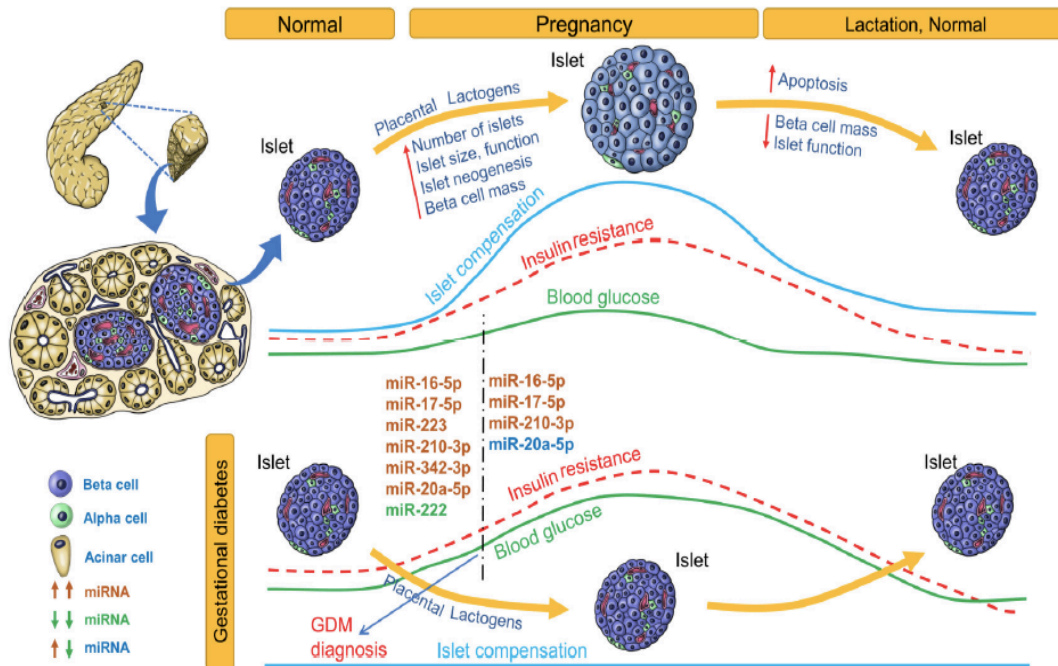
Los miRNAs son un tipo de RNAs cortos de cadena sencilla, no codificantes, de ~22 nucleótidos que participan en la regulación de la expresión génica bloqueando la traducción o promoviendo la degradación de mRNA (Poirier et al., 2017).



**Figura 1. Biogénesis y función de los miRNAs humanos. Tomado de Cullen y cols. (Cullen, 2006).** Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II y posteriormente son exportados del núcleo al citoplasma por medio de la exportina-5. Una vez en el citoplasma interactúa con la proteína argonata-2 y otras proteínas para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC, se elige el miRNA guía (maduro) que interacciona con su RNAm diana y dependiendo del grado de complementariedad, degrada al RNAm o bloquear su traducción.

### **1.9.2 Función de los miRNAs**

Se consideran mediadores importantes de la comunicación intercelular y se encuentran libres en circulación o dentro de micropartículas, exosomas, conjugados a proteínas o cuerpos apoptóticos, lo que les permite estar presentes en sangre con resistencia a la degradación. Los miRNAs coordinan diversas funciones biológicas, tales como invasión celular tumoral, respuesta inmune, angiogénesis, entre otras. Cada miRNA tiene la capacidad de silenciar cientos de genes blanco y se estima que son los responsables de la regulación de más del 60% de los mRNAs (Beltrami et al., 2015; Vasu et al., 2019). Además, se sabe que los miRNAs regulan la expresión de genes involucrados en procesos metabólicos como la homeostasis de la glucosa, la señalización de la insulina, la función de las células beta pancreáticas, el metabolismo de los lípidos y la inflamación (Sliwinska et al., 2017). De manera importante, los miRNAs se han correlacionado con complicaciones del embarazo como la preeclampsia y la DMG, por lo que se consideran como potenciales biomarcadores específicos de complicaciones y de enfermedades (Pillar et al., 2015).



**Figura 2. Perfiles de miRNAs circulantes en diferentes etapas de la diabetes gestacional y eventos fisiológicos durante el embarazo.** Se muestran con líneas, los cambios en la concentración de glucosa en sangre (verde), la resistencia a la insulina (rojo) y la compensación de los islotes (azul) durante el transcurso del embarazo/lactancia normal y la fisiopatología de la DMG. Se indican en diferentes colores algunos miRNAs circulantes identificados y consistentes en al menos 2 estudios clínicos. Los miRNAs sobreexpresados se muestran en rojo, miRNAs subexpresados en verde y los discordantes en al menos 2 estudios en azul. Tomado de Vasu y cols. (Vasu et al., 2019).

### 1.10 Antecedentes de investigación

### 1.10.1 miRNAs y DMG en estudios a nivel mundial

Existen solo 8 reportes para la búsqueda de miRNAs asociados con el desarrollo de DMG (Tabla 1). El primer reporte utilizó un arreglo de baja densidad con sondas Taqman, seguido de ensayos cuantitativos individuales de PCR acoplado a retrotranscripción (RT-qPCR). Se reportó la subexpresión de miR-132, miR-29a y miR-222 en el suero materno de pacientes con 16-19 SDG con DMG, los autores sugirieron que estos miRNAs están implicados en la homeostasis de la glucosa, la función de células beta y la sensibilidad a la insulina (Zhao et al., 2011).

El segundo reporte de *Zhu y cols.* fue un estudio de casos y controles donde crearon perfiles de miRNAs extraídos de sangre periférica de mujeres con 16-19 SDG, con un enfoque de RNAseq y la posterior validación por RT-qPCR. Se propuso a miR-16-5p, miR-17-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p y miR-20a-5p como predictores diagnósticos en base a su sobreexpresión en las pacientes con DMG. Es importante resaltar que tales miRNAs fueron asociados con la vía de señalización de insulina y a la DMT 2 (Y. Zhu et al., 2015).

Otro grupo de investigadores, *Wang y cols.* mediante RT-qPCR confirmaron los resultados de Zhu y cols. de la sobreexpresión de miR-19a y miR-19b en mujeres con DMG en China (F. Wang et al., 2019). En el 2017, *Wander y cols.* realizaron un estudio en los Estados Unidos de América donde analizaron el plasma de mujeres dentro de las 7-23 SDG reportando que miR-155 y miR-21 se encontraban sobreexpresados (Wander et al., 2017). En el 2018, *Pheiffer y cols.* realizaron un estudio dirigido mediante RT-qPCR en suero materno y encontraron una subexpresión de miR-20a y miR-222 entre muestras agrupadas de pacientes de 13-31 SDG en Sudáfrica (Pheiffer et al., 2018). Finalmente, en el 2019 *Yoffe y cols.* mediante un ensayo de expresión de miRNA en multiplex con Nanostring nCounter<sup>®</sup>, y con un análisis de componentes principales y la posterior validación por RT-qPCR identificaron la sobreexpresión de miR-223 y miR-23a en muestras de plasma de mujeres residentes de Italia y España cursando su primer trimestre de gestación (Yoffe et al., 2019).

**Tabla 1. miRNAs y DMG en estudios a nivel mundial**

<b>Autores</b>	<b>Población</b>	<b>Fuente</b>	<b>Semanas</b>	<b>Regulados a la alta</b>	<b>Regulados a la baja</b>
Zhao et al., 2011	China	Suero	16-19	-	miR-132, miR-29a y miR-222
Zhu et al., 2015	China	Suero	16-19	miR-16-5p, miR-17-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p y miR-20a-5p	-
Wander et al., 2018	Estados Unidos	Suero	7-23	miR-155 y miR-21	-
Pheiffer et al., 2018	Sudáfrica	Suero	13-31	-	miR-20a y miR-222
Yoffe et al., 2019	Italia y España	Suero	1-12	miR-223 y miR-23a	-
Abdeltawab et al., 2020	Egipto	Suero	16-19	miR-223, ANGPTL8	-
Wang et al., 2020	China	Suero	24-28	miR-195-5p	-
Sorensen et al., 2021	Europa	Suero	<20	miR-16-5p, miR-29a, miR-134	-

### 1.10.2 miRNAs y DMG en México

En México (Tabla 2), *Lamadrid-Romero y cols.* reportaron en el suero de mujeres con DMG durante el primer trimestre de gestación un incremento de miR-183-5p, miR-200-3p, miR-125-5p y miR-290, los cuales están relacionados con el desarrollo del SNC (Lamadrid-Romero et al., 2018). Algunos de estos miRNAs ya se habían correlacionado previamente con complicaciones en el embarazo y mostraron una correlación positiva con la resistencia a la insulina, por lo que fueron propuestos para el diagnóstico de DMG. En el 2019, *Martínez-Ibarra y cols.* identificaron un incremento de miR-9-5p, miR-29a-3p y miR-330-3p en el suero de pacientes con DMG entre las 14-17 SDG que estuvieron expuestas a compuestos disruptores endocrinos (Martínez-Ibarra et al., 2019). Recientemente, Herrera-Van Oostdam y cols. reportaron 5 miRNAs subexpresados pero en la orina de mujeres durante el embarazo (Herrera-Van Oostdam et al., 2020).

**Tabla 2. miRNAs y DMG en México**

<b>Autores</b>	<b>Población</b>	<b>Fuente</b>	<b>Semanas</b>	<b>Regulados a la alta</b>	<b>Regulados a la baja</b>
Lamadrid-Romero et al., 2018 SNC	México	Suero	1-12	miR-183-5p, miR-200-3p, miR125-5p, miR-1290	-
Martínez-Ibarra et al., 2019 EDCs	México	Suero	14-27	miR-9-5p, miR29a-3p, miR330-3p	-
Herrera-Van Oostdam et al., 2020	México	Orina	1,2,3 trimestre de gestación miRNAs regulados a la baja en 3er trimestre	-	miR-516-5p, miR-517-3p, miR-518-5p, miR-222-3p, miR-16-5p

### 1.11 miRNAs como biomarcadores de DMG

A la fecha, diversos estudios han propuesto varios miRNAs candidatos como biomarcadores del desarrollo de DMG. Sin embargo, estos resultados son discordantes debido probablemente a la gran variabilidad entre las poblaciones, el tipo de muestra estudiada, el método de análisis utilizado (tanto experimental, como estadístico) y principalmente la edad gestacional. Dado que la mayoría de ellos se han realizado en el segundo y tercer trimestre de gestación, sus biomarcadores propuestos dejan poco margen para una intervención terapéutica.

## **CAPÍTULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

#### **2. Justificación**

La diabetes mellitus gestacional es un problema de salud pública que dependiendo de la población estudiada, se calcula que puede afectar entre el 1 y el 20% de los embarazos a nivel mundial. Actualmente, el estilo de vida sedentario y la obesidad han incrementado la incidencia de DMG en mujeres de edad reproductiva. En México, la prevalencia de DMG es alta (10-20%).

Debido a que la DMG se diagnostica hasta finales del segundo trimestre y principios del tercero, es necesaria la búsqueda de biomarcadores, entre ellos los miRNAs, que permitan identificar desde el primer trimestre del embarazo a las mujeres en riesgo de desarrollar DMG. Esto permitiría aplicar en ellas de forma temprana intervenciones farmacológicas y no farmacológicas, tales como la dieta y el ejercicio, a fin de evitar posibles complicaciones materno-fetales.

## **CAPÍTULO III**

### **HIPÓTESIS**

#### **3. Hipótesis**

Los miRNAs circulantes en el suero materno durante el primer trimestre de embarazo que tengan una proporción alterada están asociados al desarrollo de diabetes mellitus gestacional.

## **CAPÍTULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Identificar los miRNAs asociados al desarrollo de diabetes mellitus gestacional durante el primer trimestre del embarazo.

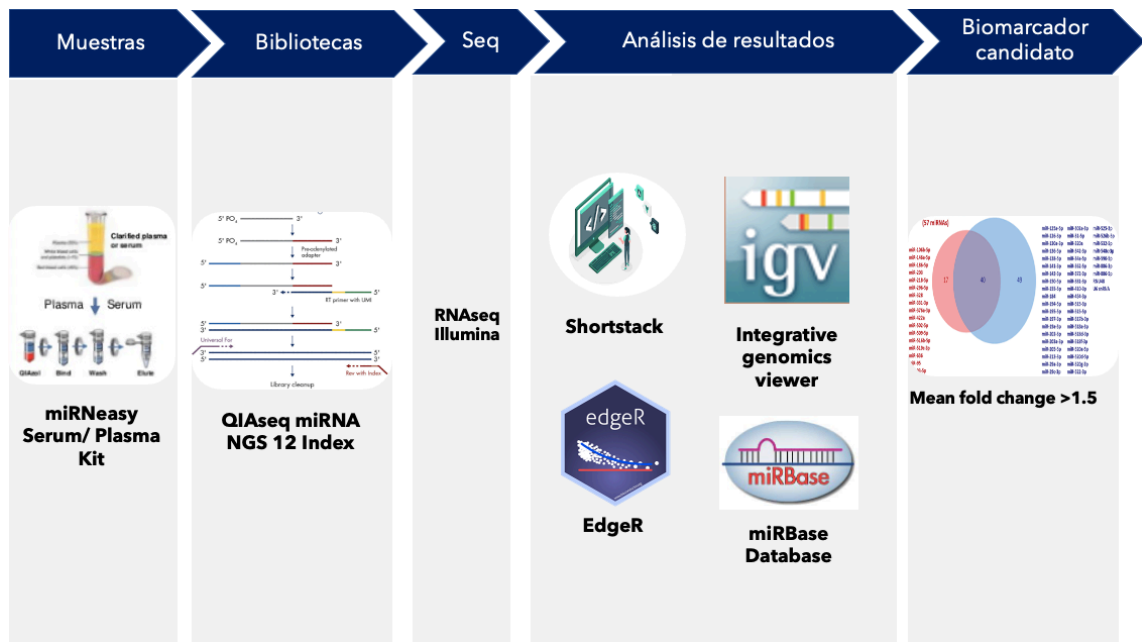
#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el perfil diferencial de miRNAs circulantes en el suero de mujeres embarazadas que desarrollaron DMG.
2. Identificar los miRNAs expresados diferencialmente con el mayor potencial de convertirse en biomarcadores tempranos de DMG.
3. Identificar posibles miRNAs expresados diferencialmente entre los dos subgrupos de casos.

## CAPÍTULO V

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 5.1 Estrategia general



**Figura 3. Estrategia general.** Se muestran de manera secuencial y cronológica, de izquierda a derecha, las etapas del presente trabajo. Se inició con la selección de los grupos de estudio, la extracción de miRNAs, seguida por la preparación de las bibliotecas, la RNAseq, el análisis bioinformático de los resultados y se finalizó con la valoración del potencial de los miRNAs como biomarcadores candidatos.

## **5.2 Tipo de estudio**

La presente investigación fue un estudio de casos y controles, transversal y observacional. El proyecto fue financiado con fondos del proyecto de Laboratorio Nacional Biobanco (No. 299077, 2019) y con recursos propios tanto del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular como del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

El desarrollo experimental de la presente tesis tuvo como sede el Laboratorio Nacional Biobanco (LANBIOBAN) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina en colaboración con el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” todos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **5.3 Población de estudio**

Las muestras utilizadas en este proyecto forman parte de un estudio previo que fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL con la clave EN17-00029. Una vez aprobado (Anexo 1, carta de aceptación), el reclutamiento de los casos y controles se dividió en dos etapas. La Etapa I se realizó en el primer trimestre de gestación donde se efectuó una valoración inicial que incluyó la historia clínica de la paciente, la exploración física completa y la toma de una muestra sanguínea mediante venopunción, previa firma del consentimiento informado. La separación del suero de las muestras se llevó a cabo mediante centrifugación y las muestras se almacenaron a -80°C. En la Etapa II, durante el segundo trimestre de gestación, se efectuó una segunda evaluación que consistió en una exploración física completa y la realización de una PTOG con carga de 75 g en ayuno de 8 horas. La cuantificación de la glucosa en suero se realizó

en ayunas (0 horas), a la hora y a las dos horas posteriores a la ingesta de glucosa. Se estableció un diagnóstico de DMG cuando alguno de los tres valores obtenidos se encontró aumentado (Ayuno: 92 mg/dL o 5.1 mmol/L, 1 h: 180 mg/dL o 10.0 mmol/L, 2 h: 153 mg/dL o 8.5 mmol/L).

### 5.3.1 Criterios de inclusión

Los principales criterios de inclusión para los pacientes y los controles de este estudio se enuncian en la Tabla 3.

**Tabla 3. Criterios de inclusión para pacientes y controles**

<b>Pacientes con DMG</b>	<b>Controles</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres cursando primer trimestre de gestación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres cursando primer trimestre de gestación.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres de 18 a 35 años.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres de 18 a 35 años.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo de producto único.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo de producto único.</li> </ul>

### 5.3.2 Criterios de exclusión

Los principales criterios de exclusión para los pacientes y los controles en este estudio se enuncian en la Tabla 4.

**Tabla 4. Criterios de exclusión para pacientes y controles**

<b>Pacientes con DMG</b>	<b>Controles</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres que cursen con Diabetes Mellitus Tipo I o II.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres que cursen con Diabetes Mellitus Tipo I o II.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres con Prediabetes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres con Prediabetes o SOP.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres con SOP.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres con antecedente de DMG o Preeclampsia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres con antecedente de DMG o Preeclampsia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo múltiple.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo múltiple.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de hipoglucemiantes orales, insulina, beta bloqueadores o esteroides.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de hipoglucemiantes orales, insulina, beta bloqueadores o esteroides.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres diagnosticadas con DMG.</li> </ul>

### 5.3.3 Criterios de eliminación

Se eliminaron aquellas muestras de suero con mala calidad (Ejem. hemólisis) o cantidad insuficiente del mismo para realizar la extracción de RNA.

## CAPÍTULO VI

### MATERIALES

#### 6.1 Material biológico

- Muestras de suero sanguíneo de mujeres embarazadas de entre 18 y 35 años, con y sin diagnóstico de DMG, con  $\leq 12$  SDG recolectadas por el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.

#### 6.2 Material de laboratorio

- Columnas RNeasy MinElute<sup>®</sup>.
- Hielo.
- Microtubos de 2 mL.
- Microtubos de 1.5 mL.
- Pipetas automáticas de 10-1000  $\mu$ l.
- Pipetas automáticas de 20-200  $\mu$ l.
- Pipetas automáticas de 2-20  $\mu$ l.
- Pipetas automáticas 0.2-2  $\mu$ l.
- Pipetas automáticas de 0.1-2  $\mu$ l.
- Puntas estériles desechables 100-1000  $\mu$ l.
- Puntas estéricas desechables 20-200  $\mu$ l.
- Puntas estériles desechables 2-20  $\mu$ l.
- Puntas estériles desechables 1-10  $\mu$ l.
- Tubos de PCR de 8 tiras de 0.2 mL.

### 6.3 Equipos

- Bioanalizador 2100, Agilent<sup>®</sup>.
- Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2, Labconco<sup>®</sup>.
- Centrifuga Sorvall Legend X1R, Thermo Scientific<sup>®</sup>.
- Congelador REVCO ULT2330D, Thermo Scientific<sup>®</sup>.
- Espectrofotómetro *Nanodrop One/One<sup>C</sup>*, Thermo Scientific<sup>®</sup>.
- Magneto DynaMag para placa de 96 pozos, Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>.
- Microcentrífuga Force SBC140-115, Fisher Biotec<sup>®</sup>.
- Termociclador de PCR-Tiempo Real StepOnePlus, Applied Biosystems<sup>®</sup>.
- Refrigerador de control dual de temperatura, Thermo Scientific<sup>®</sup>.
- Secuenciador NextSeq 500<sup>®</sup>.
- Termociclador Veriti 96 Well, Applied Biosystems<sup>®</sup>.
- Vortex Mixer VX-100, Labnet<sup>®</sup>.

### 6.4 Reactivos

- Activador de ligación 2x miRNA.
- Agua libre de RNAsas.
- Adaptador QIAseq miRNA NGS 3'
- Adaptador QIAseq miRNA NGS 5'.
- Buffer RWT.
- Buffer RPE.
- Buffer QIAseq miRNA NGS 3'.
- Buffer QIAseq miRNA NGS 5'.
- Buffer QIAseq miRNA NGS RT.
- Buffer QIAseq miRNA NGS Library.
- Buffer de ligación de perlas magnéticas QIAseq miRNA NGS<sup>®</sup>.

- Cloroformo.
- Ensayo Primer QIAseq miRNA NGS 3C<sup>®</sup>.
- Ensayo Primer QIAseq miRNA NGS 5C<sup>®</sup>.
- Ensayo Primer QIAseq miRNA NGS RTC<sup>®</sup>.
- Etanol 70%.
- Etanol 80%.
- Etanol 100%.
- Enzima QIAseq miRNA NGS RT<sup>®</sup>.
- Iniciador QIAseq miRNA NGS RT<sup>®</sup>.
- Ligasa QIAseq miRNA NGS 3'<sup>®</sup>.
- Ligasa QIAseq miRNA NGS 5'<sup>®</sup>.
- Perlas magnéticas QIAseq<sup>®</sup>.
- Polimerasa HotStarTaq DNA<sup>®</sup>.
- Primer QIAseq miRNA NGS RT<sup>®</sup>.
- Primer de biblioteca QIAseq miRNA NGS ILM Forward.
- Qiazol<sup>®</sup> (solución monofásica de Fenol/Tiocianato de Guanidinio).
- QIAseq miRNA NGS RI<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP1<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP2<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP3<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP4<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP5<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP6<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP7<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP8<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP9<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP10<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP11<sup>®</sup>.
- QIAseq miRNA NGS ILM IDP12<sup>®</sup>.

## CAPÍTULO VII

### MÉTODOS

#### 7.1 Extracción de miRNAs a partir de los pools de suero

Para la extracción de miRNAs a partir de suero sanguíneo se utilizó el estuche miRNeasy Serum/ Plasma Kit siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

##### 7.1.1 Protocolo

Como se muestra en la Figura 4, a una cantidad inicial de suero de 200  $\mu$ l, se le agregó el reactivo QiaZol (solución monofásica de Fenol/Tiocianato de Guanidinio) en una relación 5:1 (1000  $\mu$ l). Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, lo cual provocó que el lisado fuera separado en dos fases después de la centrifugación, una orgánica y otra acuosa. La fase acuosa incluye el RNA, la interfase contiene el DNA y la fase orgánica incluye las proteínas. La fase acuosa se recuperó (~600  $\mu$ l) en un tubo nuevo y se agregaron 900  $\mu$ l de Etanol 100% para proveer de condiciones apropiadas de unión de las moléculas de RNA a la membrana. Finalmente, la mezcla proveniente de una extracción y luego la proveniente de una segunda extracción se añadieron a la columna RNeasy MinElute, donde el RNA total se unió a la membrana y las moléculas contaminantes fueron eliminadas por medio de una serie de lavados. El RNA proveniente finalmente de un volumen total de 400  $\mu$ l del pool de suero, se eluyó en un volumen de 14  $\mu$ l de agua libre de RNAsas (QIAGEN, 2012).

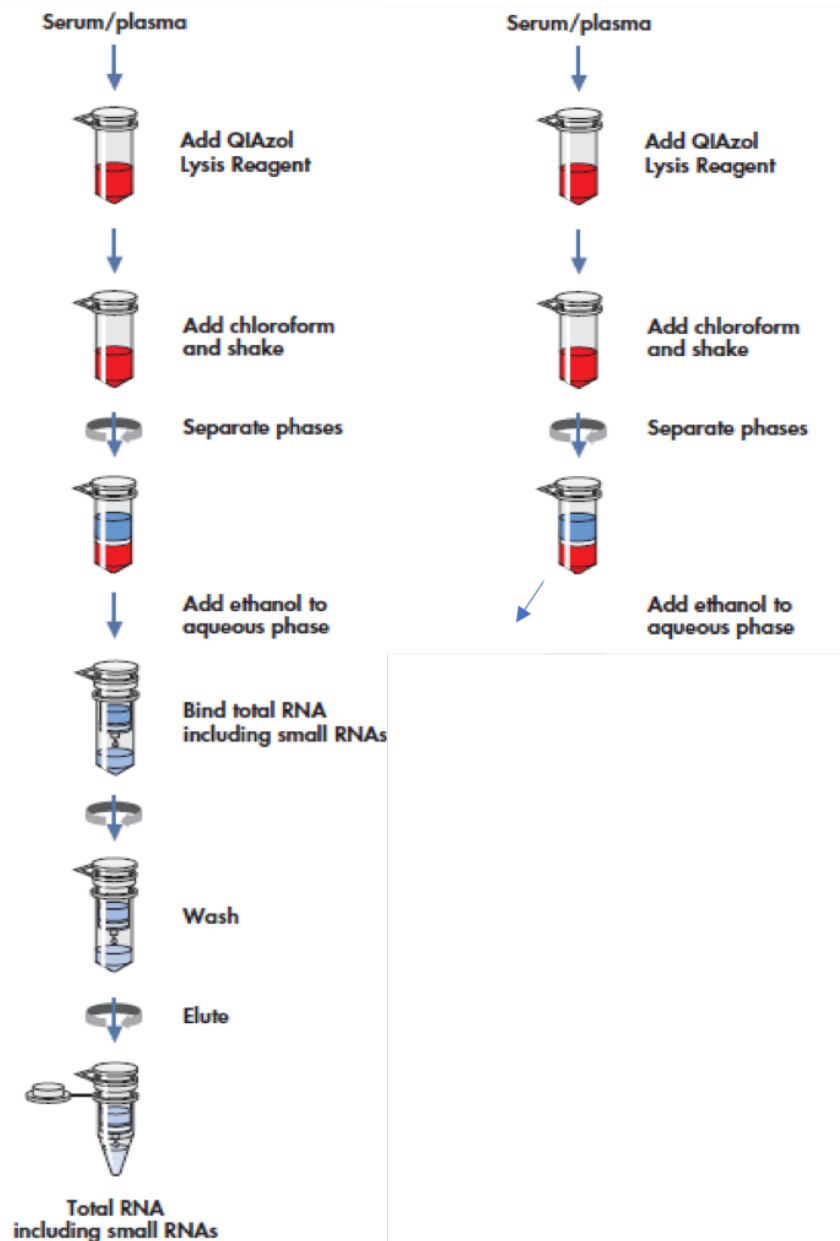


Figura 4 . Procedimiento general del estuche miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN, 2012).

### 7.1.2 Cuantificación y determinación de la calidad de miRNAs

Después de la extracción de los miRNA se realizó un control de calidad para determinar su concentración y pureza.

1. Cuantificación: Se tomó 1  $\mu$ l de miRNA de cada grupo para medir la absorbancia del RNA a 260 nm por espectrofotometría en un *NanoDrop One/One<sup>c</sup> Microvolume UV Spectrophotometer*®.
2. Determinación de pureza: Se evaluó su pureza determinando los cocientes de absorbancia de 260/280 nm (rango deseable de 1.8-2.0), para identificar contaminación con proteínas y/o fenol; y de 260/230 nm (>2.0) para identificar contaminación con sales.

## **7.2 Preparación de las bibliotecas de miRNAs**

Para la generación de las tres bibliotecas se utilizó el estuche comercial QIAseq miRNA NGS 12 Index (QIAGEN, Hilden Germany) siguiendo las recomendaciones del proveedor. De manera general (Figura 5) la metodología se basó en la realización de una mezcla de reacciones en la cual adaptadores especialmente diseñados se ligaron secuencialmente a los extremos 3' y 5' de los miRNAs maduros. Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis universal de cDNA mediante retrotranscripción (RT) con un iniciador con la asignación de un índice molecular único (UMI), después del cual se realizó una purificación de los cDNAs. Finalmente, se realizó la amplificación de la biblioteca mediante el uso de un cebador 5' universal y un cebador 3' que tiene incluido una secuencia marca (tag), la biblioteca se purificó mediante el uso de perlas magnéticas. (QIAGEN, 2020).

### **7.2.1 Protocolo completo**

#### **7.2.1.1 Ligación 3'**

Un adaptador de DNA pre-adenilado se ligó al extremo 3' de todos los miRNAs. El reactivo ligasa 3' QIAseq miRNA NGS estuvo altamente optimizado para una ligación eficiente así como para lograr la prevención de productos secundarios no deseados.

#### **7.2.1.2 Ligación 5'**

Un adaptador de RNA fue ligado al extremo 5' de los miRNAs maduros.

#### **7.2.1.3 Síntesis de cDNA**

El cebador de la retrotranscripción con un UMI integrado, se hibridó al adaptador 3' y facilitó la conversión de los miRNAs en cDNA, asignándoles un UMI en específico. Durante la retrotranscripción también se agregó una secuencia universal que será reconocida por los cebadores de indexación de la muestra durante la amplificación de la biblioteca.

#### **7.2.1.4 Purificación de cDNA**

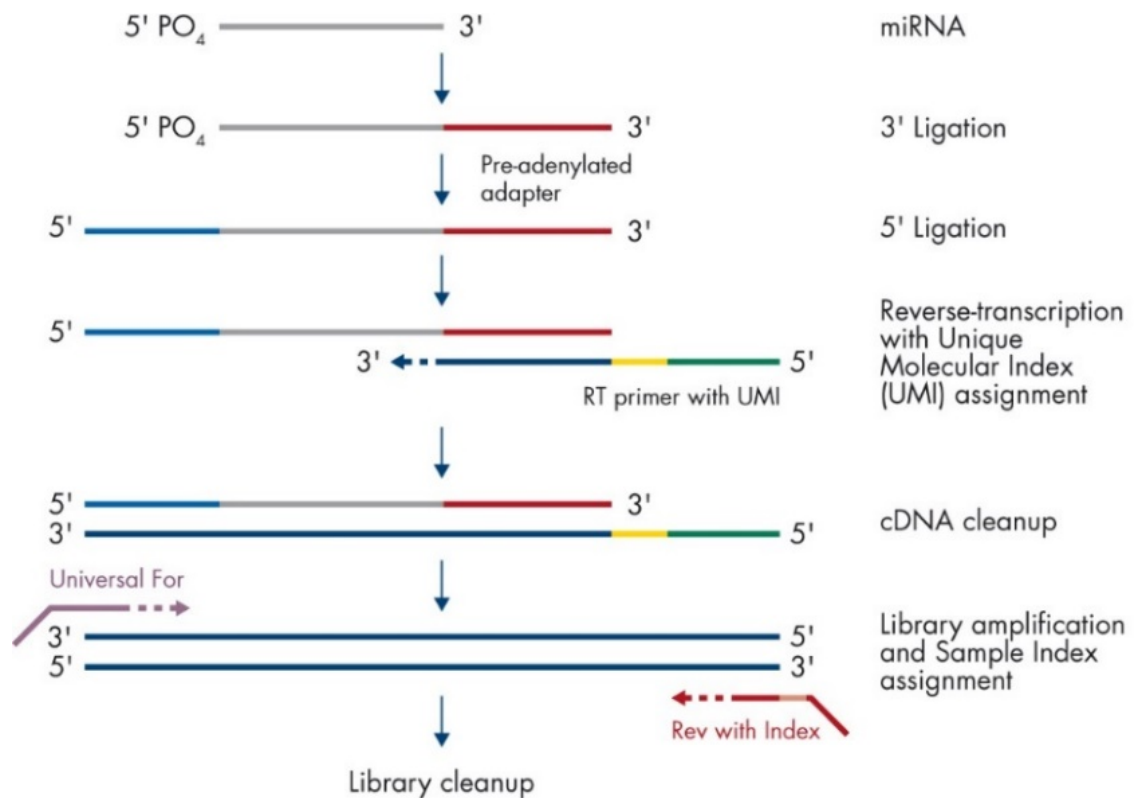
Después de la RT, la purificación de cDNA se realizó mediante un método basado en perlas magnéticas. Se agregaron 143 µl de perlas magnéticas al cDNA, posteriormente se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y los tubos se posicionaron en el magneto hasta que las perlas migraran totalmente. Finalmente se realizaron lavados con etanol al 80% y la elución del DNA en agua libre de RNAsas.

#### **7.2.1.5 Amplificación de biblioteca**

Un cebador directo universal se hibridó con uno de los 96 cebadores reversos en la misma placa para asignar a cada muestra una secuencia marca (índice, tag) que permitirá diferenciar cada una de las bibliotecas mezcladas durante la secuenciación. La amplificación imparcial de los miRNAs en una sola reacción aseguró que hubiera suficientes secuencias diana presentes para la RNAseq.

#### **7.2.1.6 Purificación de biblioteca**

Finalmente, se llevó a cabo la purificación de los amplicones mediante el uso de perlas magnéticas. La limpieza final de las bibliotecas se realizó a partir de 75 µl de muestra donde finalmente se obtuvieron 15 µl finales de biblioteca que se almacenaron a -20°C.



**Figura 5. Esquema del proceso de generación de bibliotecas de miRNAs.** Se muestra la secuencia de pasos para la preparación de las bibliotecas de miRNAs para la RNAseq utilizando el estuche de QIAseq®miRNA library kit (QIAGEN, 2020).

### 7.3 Análisis de calidad pre-secuenciación de biblioteca de miRNAs

#### 7.3.1 Electroforesis de las bibliotecas de miRNAs en gel de agarosa

Tres microlitros de cada biblioteca fueron mezcladas con el amortiguador de carga adicionado con GelRed, se cargaron en carriles separados en un gel de agarosa al 3% en amortiguador TAE 1X. Se llevó a cabo la electroforesis a 75V por 15 min (para que entraran las muestras) y posteriormente a 85V por 2h. El gel fue visualizado en luz UV mediante el equipo Geldoc (Bio-Rad).

### **7.3.2 Cuantificación fluorométrica de bibliotecas de miRNAs**

La cuantificación de las bibliotecas se realizó a partir de 1 µl de biblioteca de miRNA en el fluorómetro QUBIT 3.0 de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

## **7.4 Secuenciación masiva en paralelo (RNAseq)**

La RNAseq se subrogó al Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas (LNATCG) del Instituto de Biotecnología de la UNAM siguiendo las recomendaciones de calidad y de envío de muestras establecidas por el laboratorio. Se ordenó la secuenciación con un rendimiento de 10 millones de lecturas para cada bibliotecas con lecturas simples de 75 pb.

### **7.4.1 Análisis de control de calidad pre-secuenciación por el LNATCG**

Previo a la secuenciación, el LNATCG realizó un análisis de las muestras para verificar integridad, calidad y concentración.

#### **7.4.1.1 Electroforesis de las bibliotecas de miRNAs**

Como un control de calidad para determinar la integridad de la biblioteca, el LNATCG del IBT de la UNAM realizó la determinación del tamaño y pureza por medio de una electroforesis automatizada con un ensayo de alta sensibilidad utilizando el Bioanalizador Agilent 2100.

#### **7.4.1.2 Purificación de las bibliotecas a partir de electroforesis en geles de policacrilamida (PAGE)**

Las tres bibliotecas cuantificadas fluorométricamente se mezclaron de manera equimolar. De cada biblioteca, se tomaron aproximadamente 4.14 ng. La mezcla con las tres bibliotecas se purificó mediante PAGE nativo al 6% y se corrió por un espacio de 45

min a 200 V. Pasado este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio por espacio de 5 min. y visualizando en un transiluminador se cortó la banda correspondiente a un tamaño de entre 150-180 pb con la mezcla de las tres bibliotecas. La banda se dejó eluyendo con 750  $\mu$ L de agua en un tubo eppendorf en agitación toda la noche. Al día siguiente, la solución se pasó por un filtro Costar de 0.45  $\mu$ m y posteriormente por una columna Amicon Ultra de 0.5 mL de 10K. La columna se eluyó dos veces con dos volúmenes de Elution Buffer para lograr un volumen al final aproximado de 30  $\mu$ L. Este volumen se redujo a la mitad por medio de vacío en un equipo Savant. La solución final se cuantificó con el Qubit® dsDNA HS Assay Kit utilizando 1  $\mu$ L de la mezcla de bibliotecas. La concentración final de la mezcla de las bibliotecas purificadas fue de 0.127 ng/ $\mu$ L que corresponde a una concentración de 1.28 nM.

#### **7.4.1.3 Verificación de las bibliotecas para RNAseq**

Se realizó mediante un ensayo de qPCR con iniciadores que reconocen los adaptadores de Illumina, empleando 1  $\mu$ L de la mezcla de bibliotecas diluida 100 y 1000 veces.

### **7.5 Análisis Bioinformático**

Todo el proceso secuencial desde las bibliotecas de miRNAs generadas hasta el análisis bioinformático de las secuencias de miRNAs se muestra en la Figura 12. Posterior a la secuenciación en la plataforma Illumina NextSeq550, se procedió al análisis de calidad y el procesamiento de los datos crudos en formato FASTQC para obtener las secuencias de los miRNAs. Primero las secuencias se limpiaron de los adaptadores de la biblioteca con el software *Trimmomatic* (Bolger et al., 2014), se filtraron las lecturas con *Cutadapt versión 3.4* (Martin, 2011) y solo se tomaron en cuenta las secuencias de longitud de 15-65 pb. Posteriormente se realizó el mapeo sobre el genoma humano de referencia de todas las secuencias de miRNAs reportadas en *miRBase* (Kozomara et al., 2019) con el programa *ShortStack* (Axtell, 2013) que utiliza *Bowtie* (Langmead et al.,

2009). Los archivos \*.bam obtenidos se indexaron con *Samtools* (H. Li et al., 2009). Para visualizar los *loci* de miRNAs se utilizó el programa *Integrative Genomic Viewer* (IGV). Con los resultados de lecturas mapeadas con ShortStack, se utilizó el programa *DeSeq2* (Love et al., 2014) para calcular la expresión de miRNAs y cuantificar la expresión diferencial de los miRNAs entre subgrupos. También se usó el paquete *edgeR* (Robinson et al., 2009) para normalizar los números de secuencias de miRNAs de cada biblioteca empleando ambas secuenciaciones, así como la expresión diferencial mediante el cálculo de Fold Change ( $\log_2$ ) y la significancia estadística ( $p$ ) de la expresión diferencial incluso esta ajustada por el false-discovery rate (FDR).

Posteriormente se generaron las tablas correspondientes de los niveles de expresión de los miRNAs encontrados en cada subgrupo de casos respecto a los miRNAs del grupo control y estas se graficaron con base en su mean fold change, que representa su sobreexpresión o subexpresión en los subgrupos grupos. Se estableció un valor de corte para FC de 1.5 y -1.5 para considerar a los miRNAs como potenciales biomarcadores. Para obtener la significancia estadística de la expresión diferencial de los miRNAs, se generaron gráficas de volcano que se realizaron con los datos generados por el paquete *edgeR* y mediante el programa en línea VolcaNoseR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR2/>) estableciendo valores de corte de FC de 1 y de  $p < 0.05$ .

## **7.6 Búsqueda de genes blanco**

Los blancos funcionales de cada miRNA fueron obtenidos de la base de datos online miRDB, donde se muestran los 5 blancos con mayor puntuación, así como el subgrupo de casos en el cual se encontró el miRNA correspondiente (Chen et al., 2020).

## CAPÍTULO VIII

### RESULTADOS

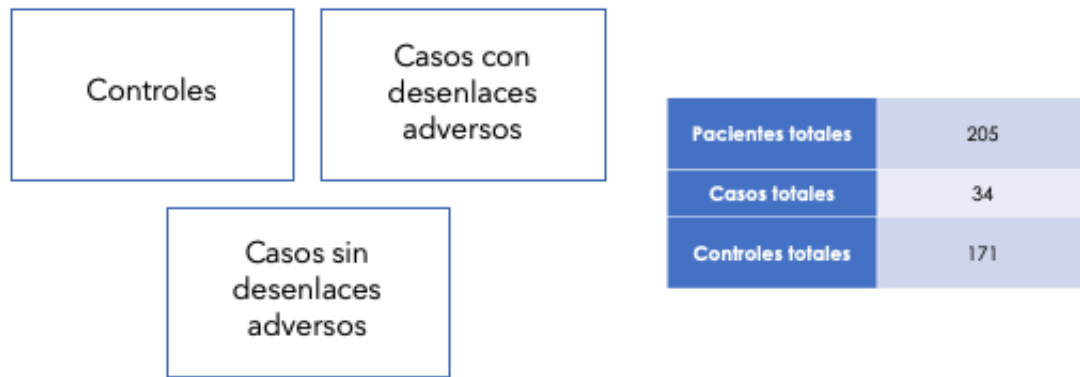
#### 8.1 Muestra de estudio

Como se muestra en la Figura 8, en este estudio, 205 sueros de pacientes cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión; para el grupo control fueron 171 sueros mientras que para el grupo de casos los restantes 34 sueros. Para optimizar los recursos económicos ya que el número total de muestras era muy elevado para realizar secuenciación individual y con base en las características clínicas del grupo de casos, para este estudio, se decidió realizar los siguientes tres pools de sueros:

Grupo CON: Para el grupo de controles, se seleccionaron sueros de mujeres físicamente saludables con diagnóstico negativo de DMG con características clínicas pareables con los siguientes 2 grupos.

Grupo CCD: El grupo de casos con desenlace, incluyó sueros de pacientes diagnosticadas con DMG, establecida con algún valor aumentado de la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa y que hubieran presentado además algún desenlace adverso materno-fetal.

Grupo CSD: El grupo de casos sin desenlace, incluyó sueros de pacientes diagnosticadas con DMG, establecida con algún valor aumentado de la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa, que no hubieran presentado algún desenlace adverso materno-fetal. Este último grupo fue derivado del grupo de casos original (n=34).



**Figura 6. Población de mujeres en el estudio.** El grupo de casos fue subdividido en dos subgrupos; casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales y casos sin desenlaces adversos maternos y/o fetales.

### 8.1.1 Características clínicas de las pacientes de los pools de sueros

A partir de una  $n$  total de 34 casos, se seleccionaron 10 muestras para un pool de sueros que formaría el grupo de casos sin desenlaces adversos o CSD (Tabla 5). Todas las mujeres contaron con un IMC correspondiente a sobrepeso u obesidad y 6 de ellas tuvieron antecedentes heredofamiliares positivos de 1er grado. También presentaron de uno a dos valores aumentados en la PTOG, la mayoría desde la medición basal. La ausencia de desenlaces adversos maternos o fetales, caracterizó este subgrupo de casos.

**Tabla 5. Pool de sueros de grupo Casos sin desenlaces adversos maternos y/o fetales (CSD)**

	Edad	Folio	IMC	AHF 1er grado	CTOG basal <92	CTOG 1 hora <180	CTOG 2 horas <153	Desenlace adverso
1	28	2	35.3	Positivo	91	183	112	Ninguno
2	22	36	26.3	Negativo	92	68	79	Ninguno
3	22	49	29	Positivo	68	187	100	Ninguno
4	27	59	25.2	Negativo	77	169	176	Ninguno
5	28	70	29.4	Negativo	90	155	160	Ninguno
6	24	73	38.2	Positivo	93	177	133	Ninguno
7	24	82	26.3	Positivo	109	142	131	Ninguno
8	28	113	27.7	Positivo	73	195	132	Ninguno
9	22	204	31	Negativo	83	181	117	Ninguno
10	31	273	30.7	Positivo	93	131	94	Ninguno

IMC, índice de masa corporal; AHF, Antecedentes heredofamiliares; PTOG, Prueba de tolerancia oral a la glucosa.

Para el pool del segundo subgrupo de casos, el subgrupo de casos con desenlaces adversos o CCD (Tabla 6), se seleccionaron 10 pacientes para el pool de sueros a partir de los pacientes restantes del grupo de casos (n=24). La mayoría contó con un IMC correspondiente a obesidad y 6 de ellas tuvieron antecedentes heredofamiliares positivos de 1er grado. En cuanto a la curva de tolerancia a la glucosa, las pacientes mostraron de dos a tres valores aumentados. Todas las pacientes presentaron desenlaces adversos que es lo que caracteriza a este subgrupo, dentro de los cuales se encontraron prematuridad, preeclampsia, macrosomía, entre otros.

**Tabla 6. Pool de sueros de grupo Casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales (CCD)**

	Edad	Folio	IMC	AHF 1er grado	CTOG basal < 92	CTOG 1 hora < 180	CTOG 2 horas < 153	Desenlace adverso
1	38	279	42	Positivo	110	185	163	2 cesáreas previas por fetos macrosómicos
2	33	117	28.9	Positivo	92	195	165	Prematuro (36.5)
3	39	89	29	Negativo	84	192	171	Macrosomía (4460)
4	21	31	39.8	Negativo	102	190	140	Preeclampsia Prematuro (35.3) Hiperbilirrubinemia
5	23	104	33	Positivo	78	221	171	Cesárea
6	23	269	35.6	Negativo	87	188	188	Cesárea
7	22	195	31.7	Negativo	125	164	159	Cesárea
8	36	201	36.8	Positivo	112	164	173	Antecedente aborto
9	31	280	33.8	Positivo	92	166	161	Antecedente de 1 aborto Parto distócico
10	33	133	31.3	Positivo	99	169	188	Antecedente 1 aborto

IMC, índice de masa corporal; AHF, Antecedentes heredofamiliares; PTOG, Prueba de tolerancia oral a la glucosa.

Finalmente, a partir de un total de 171 mujeres del grupo control, se seleccionaron 10 mujeres para el pool de sueros (Tabla 7) que tuvieron que ser pareadas clínicamente a los dos subgrupos de casos. De acuerdo con los criterios de inclusión para el grupo control, todas presentaron valores dentro de los rangos normales en los tres puntos de la curva de tolerancia que las excluye de DMG y no contaron con algún desenlace adverso ya sea materno o fetal. Todas contaron con un IMC correspondiente a sobrepeso u obesidad y 6 de ellas tuvieron además antecedentes heredofamiliares positivos de primer grado.

**Tabla 7. Pool de sueros de grupo control (CON)**

	Edad	Folio	IMC	AHF 1er grado	CTOG basal <92	CTOG 1 hora <180	CTOG 2 horas <153	Desenlace adverso
1	27	37	27.6	Positivo	54	130	120	Ninguno
2	27	40	27	Negativo	75	99	118	Ninguno
3	29	83	28.1	Negativo	91	109	90	Ninguno
4	30	136	28.1	Positivo	90	147	92	Ninguno
5	28	147	29.2	Negativo	79	146	91	Ninguno
6	27	167	31.2	Positivo	83	129	122	Ninguno
7	28	168	25.5	Negativo	83	122	104	Ninguno
8	28	225	36.3	Positivo	81	141	128	Ninguno
9	28	231	29.2	Positivo	73	133	125	Ninguno
10	31	284	36.9	Positivo	76	148	144	Ninguno

IMC, índice de masa corporal; AHF, Antecedentes heredofamiliares; PTOG, Prueba de tolerancia oral a la glucosa.

## 8.2 Extracción de miRNAs de suero

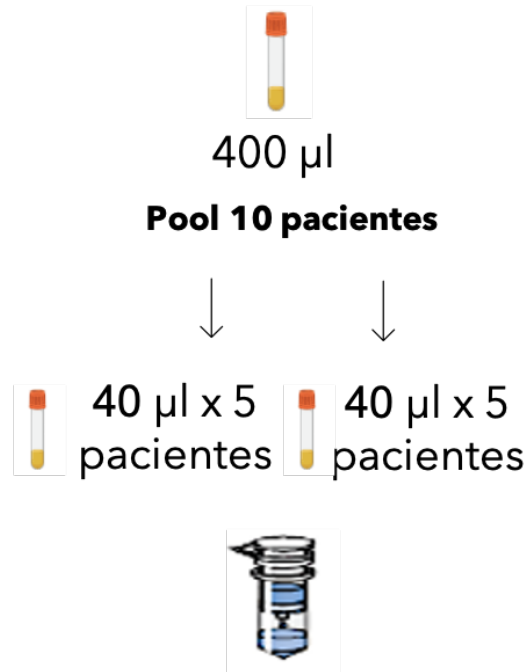
Para aumentar el rendimiento de miRNAs, primero se comparó el rendimiento de la extracción entre 200  $\mu$ L como sugiere el estuche comercial y 400  $\mu$ L de suero que representa la cantidad máxima recomendada. La diferencia radicó en el paso de cargado a la columna de la mezcla de extracción, equivalente a 400  $\mu$ L (pasando dos mezclas originales de 200  $\mu$ L). Finalmente, independientemente de la cantidad de suero de partida, el RNA se eluyó en 14  $\mu$ L de agua libre de RNAsas y se evaluó la pureza de las muestras, mediante espectrofotometría usando el equipo *NanoDrop One*<sup>c</sup>. En la Tabla 7 se observan las lecturas comparativas del rendimiento las cuales mostraron un rendimiento de RNAs superior, prácticamente del doble cuando se emplearon 400  $\mu$ L que cuando se partió de 200  $\mu$ L.

**Tabla 8. Rendimiento de extracciones**

	ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
<b>D</b>	36.3	1.54	0.07
<b>D</b>	39.8	1.54	0.07
<b>I</b>	13.3	1.49	0.34
<b>I</b>	14.4	1.46	0.32

D, doble; I, individual; se realizaron lecturas dobles

Una vez que confirmamos que se mejoraba el rendimiento de miRNAs al doble, se procedió a realizar la extracción de miRNAs a partir de 400  $\mu$ L de los pools de estudio como se indica en la Figura 7. Como se puede observar en la Tabla 9, se muestran los rendimientos de miRNAs obtenidos en el equipo *NanoDrop One<sup>c</sup>* de los tres pools de sueros correspondientes a grupo control (CON), grupo de casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales (CCD) y casos sin desenlaces maternos y/o fetales (CSD).; particularmente el grupo de CCD rindió el doble de la concentración de miRNAs que los otros dos pools.



**Figura 7. Extracción de miRNAs.** Para la extracción de miRNAs de los 3 pools compuestos por 10 pacientes cada uno, se utilizaron 40 µL de suero por cada paciente y las dos mezclas de extracción de 200uL cada una, fueron cargadas consecutivamente sobre una misma columna.

**Tabla 9. Cuantificación de miRNAs de los pools**

<b>CON</b>	<b>ng/µl</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
	13.1	1.37	0.20
	15.0	1.35	0.19
<b>CCD</b>	<b>ng/µl</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
	28.0	1.42	0.18
	32.5	1.45	0.17
<b>CSD</b>	<b>ng/µl</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
	11.4	1.40	0.23
	12.1	1.40	0.23

## 8.3 Bibliotecas de miRNAs

### 8.3.1 Cuantificación de las bibliotecas

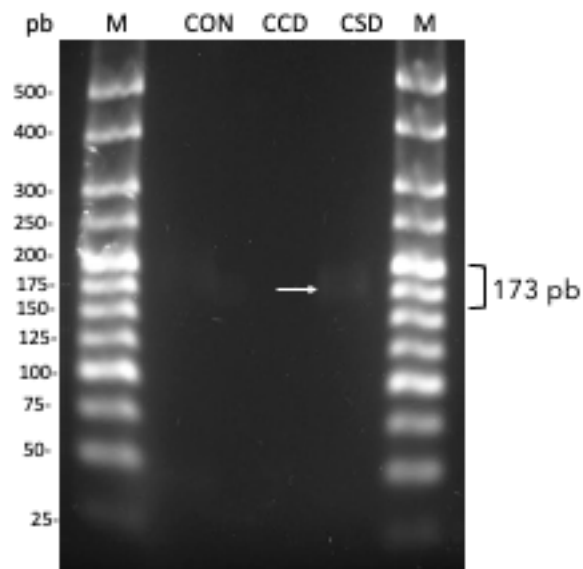
Como se observa en la Figura 8, del grupo control se obtuvieron 1.06 ng/μL que corresponden a una concentración de 94.26 nM de amplicones después de aplicar la ecuación incluida en el inserto. En el grupo de CCD se obtuvieron 0.338 ng/μL que corresponden a 30.05 nM. En el grupo de CSD se obtuvieron 1.18 ng/μL que corresponden a 104.93 nM. Es importante recalcar que de las cantidades de bibliotecas que se obtuvieron sobrepasan la necesaria de 4 nM para realizar la RNAseq.

CON	Standard 1	67.15 ng/μl
	Standard 2	36172,30 ng/μl
	Muestra	1.06 ng/μl
Ecuación: $(\text{ng}/\mu\text{l}) \times 10^6 / 112,450 = \text{nM}$		
94.26 nM biblioteca		
CCD	Standard 1	69.42 ng/μl
	Standard 2	27899,44 ng/μl
	Muestra	0.338 ng/μl
Ecuación: $(\text{ng}/\mu\text{l}) \times 10^6 / 112,450 = \text{nM}$		
30.05 nM biblioteca		
CSD	Standard 1	67.15 ng/μl
	Standard 2	36172,30 ng/μl
	Muestra	1.18 ng/μl
Ecuación: $(\text{ng}/\mu\text{l}) \times 10^6 / 112,450 = \text{nM}$		
104.93 nM biblioteca		

**Figura 8. Resultados de cuantificación de las bibliotecas.** Se muestra la cuantificación en el Fluorómetro Qubit 3.0, de los Standard 1, Standard 2 y la Muestra, correspondientes a los 3 pools: grupo control (CON), grupo de casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales (CCD) y grupo de casos sin desenlaces maternos y/o fetales (CSD). El rendimiento final en nM de cada biblioteca se muestra en color rojo.

### 8.3.2 Visualización de las bibliotecas de miRNAs

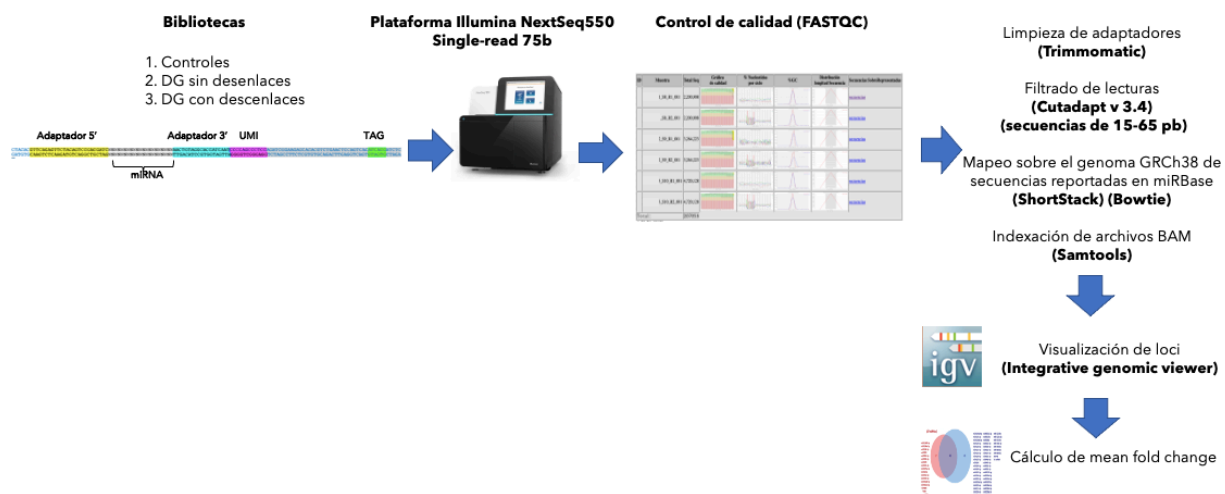
Como se puede observar en la Figura 9, se logró confirmar la presencia de las bibliotecas en un gel de agarosa al 3%, se observaron los amplicones de 173 pb, que es el tamaño esperado de las bibliotecas. Particularmente, se detectó un amplicón más notorio en el grupo de CSD que coincidió con una mayor concentración de la biblioteca determinada por fluorometría (Tabla 9).



**Figura 9. Análisis cualitativo de las bibliotecas de miRNAs.** Se muestra la electroforesis de las bibliotecas en gel de agarosa al 3% TAE 1X teñido con GelRed. En los carriles se muestran las bandas correspondientes en el carril CON el grupo control, en el carril CCD el grupo de casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales y en el carril CSD los casos sin desenlaces adversos maternos y/o fetales. En los carriles externos se aprecian las bandas del marcador de peso molecular de 25 pb (M) con los tamaños indicados al lado izquierdo. La flecha blanca indica una banda a ~173 pb correspondiente al tamaño esperado de una biblioteca.

## 8.4 Secuenciación masiva en paralelo (RNAseq)

Los resultados de las etapas de previas y posteriores a la secuenciación de las bibliotecas de miRNAs (RNAseq) esquematizadas en la Figura 10, se describen detalladamente a continuación.

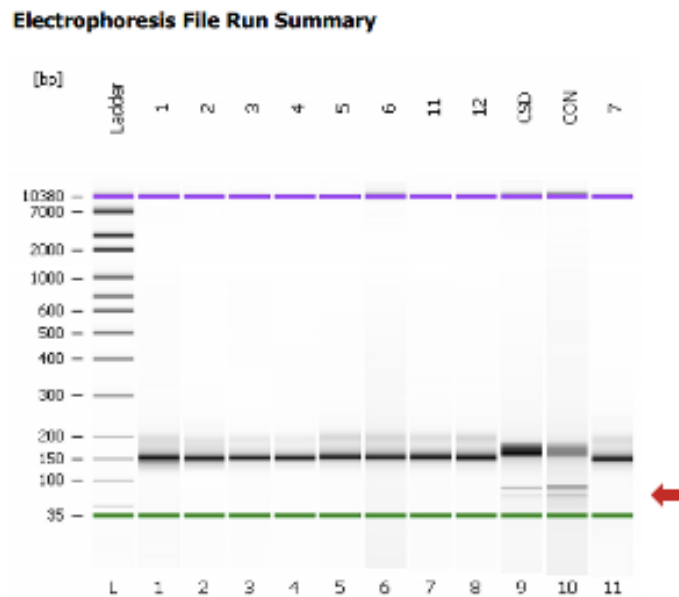


**Figura 10. Tubería bioinformática.** Se muestra el diagrama de flujo del análisis bioinformático de las bibliotecas de miRNAs. En el lado izquierdo se esquematiza una biblioteca donde se destacan en diferentes colores las secuencias componentes, entre ellas, un adaptador 5' y un adaptador 3' flanqueando el miRNA, con el UMI y el TAG correspondiente. En el lado derecho se indican los pasos secuenciales del análisis de las bibliotecas y los programas empleados.

### 8.4.1 Control de calidad cualitativo de las bibliotecas de miRNAs

Durante el control de calidad para determinar la integridad de la biblioteca, el LNATCG realizó la determinación del tamaño y pureza por medio de una electroforesis

automatizada en microfluidos utilizando el Bioanalizador Agilent 2100. Durante este control, dos de las bibliotecas mostraron bandas adicionales, que el estuche comercial empleado menciona que pueden generarse (Figura 11). Las bibliotecas mostraron un tamaño esperado de 173 pb, pero se pudieron observar también bandas adicionales de 180 pb (las cuales probablemente son piRNAs) que no interferirían en la secuenciación y otras bandas preocupantes de 100 pb y menores (dímeros de primers) que si pueden interferir con la secuenciación porque se unen a la flowcell al igual que las bibliotecas y reducen drásticamente el rendimiento.



**Figura 11. Control de calidad de las bibliotecas de miRNAs.** Se muestra un gel virtual del Bioanalizador Agilent 2100. El carril CSD corresponde a la biblioteca de los casos sin desenlaces adversos maternos y/o fetales y el carril CON a la biblioteca del grupo control, mientras que los carriles 1-8 son 8 bibliotecas ajenas al estudio. La flecha en color rojo indica bandas adicionales correspondientes a dímeros de primers.

#### **8.4.2 Purificación de bibliotecas de miRNAs**

La concentración final de la mezcla de las bibliotecas purificadas a partir de PAGE fue de 0.127 ng/ $\mu$ L que corresponde a una concentración de 1.28 nM. Cuando se tomó 1  $\mu$ L de esta mezcla diluída 100 y 1000 veces en una reacción de qPCR con cebadores específicos para la secuenciación en la plataforma illumina , se obtuvo una amplificación exponencial que demostró que las bibliotecas eran aptas para la secuenciación (datos no mostrados).

#### **8.5 Rendimiento de las dos secuenciaciones de RNA**

Como se puede observar en la Tabla 8, a pesar de que se mezclaron las bibliotecas en una cantidad equimolar de 4 nM para obtener 10 millones de lecturas de cada biblioteca, no se logró alcanzar el rendimiento esperado en una primera secuenciación. Por lo tanto, se procedió a repetir la secuenciación aumentando el volumen de la mezcla de bibliotecas. La segunda RNAseq tuvo un mayor rendimiento que la primera, pero solo en el grupo de CSD se alcanzó los 10 millones de lecturas. La biblioteca del grupo de CCD maternos y/o fetales mostró un mejor rendimiento en lecturas totales para ambas secuenciaciones, seguido por el grupo de CCD adversos maternos y/o fetales, y por último el grupo control con el menor rendimiento.

**Tabla 10 . Generalidades de las dos secuenciaciones de RNA**

Bibliotecas	Lecturas totales	Variedad de sRNAs	(miRNAs)* ≥ 1 lectura	(miRNAs)* ≥ 5 lecturas	(miRNAs)* ≥ 100 lecturas
1 Control	2,200,908	9,464		3,776	154
2 Control	4,089,209	11,506		6,113	246
1 CSD	4,720,128	13,097		6,477	328
2 CSD	10,584,007	9,849		8,807	616
1 CCD	3,264,223	15,722		1,927	171
2 CCD	5,895,375	3,837		2,665	413
1 Control			204/1918	173/204	63/204
2 Control			208/1918	195/218	75/218
1 CCD			117/1918	108/117	60/117
2 CCD			121/1918	114/121	73/121
1 CSD			227/1918	211/227	94/227
2 CSD			237/1918	220/237	118/237

\*, de los 1918 miRNAs existentes en miRBase; sRNA, small RNA; CCD, casos con desenlace adverso materno y/o fetal; CSD, casos sin desenlace adverso materno y/o fetal; CON, control

### 8.6 Análisis bioinformático

Posterior a la RNAseq en la plataforma Illumina NextSeq550, el análisis de los datos crudos en formato FASTQC mostró en general que la calidad de las lecturas fue muy alta (QC >24 para los nt 5-75). En el análisis se eliminaron las secuencias de los adaptadores y solo se tomaron en cuenta aquellas con una longitud de 15 a 65 nucleótidos. Previo a que las secuencias se mapearon sobre el genoma humano GRCh38, como se puede observar en la columna Variedad de sRNA de la Tabla 8 (columnas 3, 5 y 6 parte superior), se obtuvieron resultados porporcionales al rendimiento general entre las bibliotecas en cuanto a número de secuencias para la primera RNAseq; la biblioteca de CSD tuvo más secuencias, seguida de la de CCD y CON con el menor rendimiento. De manera inversa, en la segunda RNAseq, el grupo CON tuvo más variedad de sRNAs que los grupos CCD y CSD.

Posteriormente, cuando se realizó el mapeo de secuencias sobre el genoma humano de aquellas que correspondían a miRNAs reportados en la base de datos miRBase (Tabla 8,

columnas 4-6 parte inferior), esta vez se encontraron resultados no tan proporcionales al rendimiento de las bibliotecas. En general, se incrementó ligeramente el número de miRNAs diferentes de la primera a la segunda RNAseq en las 3 bibliotecas y aumentaron también los números de lecturas de miRNAs por grupo. Si bien el grupo CSD tuvo más miRNAs, el control esta vez superó al grupo CCD que tuvo el menor número y la menor diversidad de miRNAs.

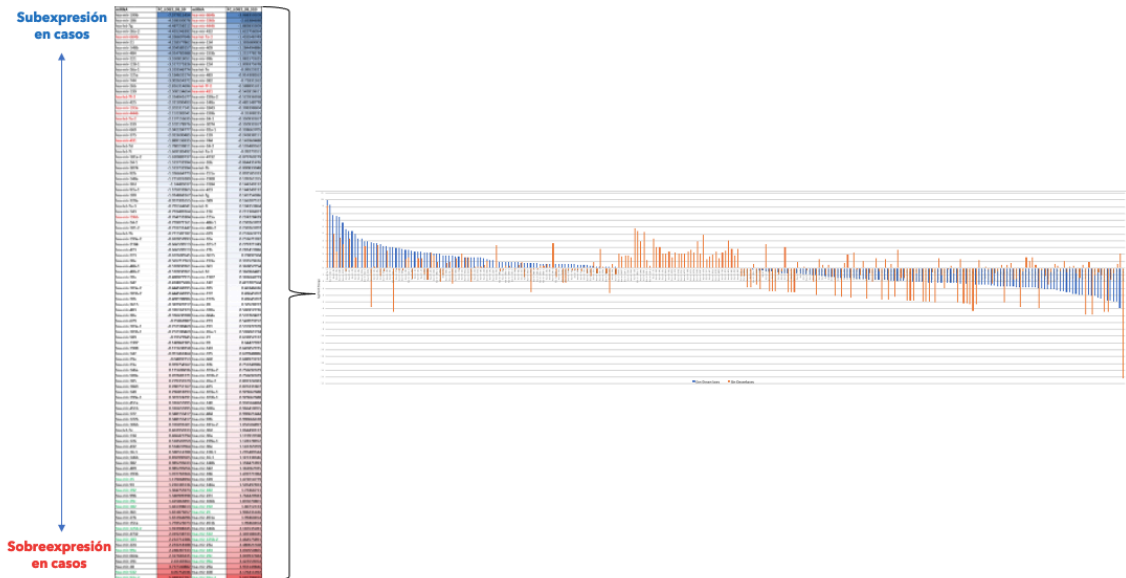
### **8.7 Identificación del perfil de miRNAs de DMG**

Con la finalidad de conocer la diversidad de miRNAs entre las tres bibliotecas de estudio, se consideraron solo los archivos de miRNAs con mayor rendimiento de la segunda RNAseq que resumidos aparecen en la Tabla 10 (columna miRNAs  $\geq 1$  lectura), estos se combinaron y al final se tuvo un total de 273 miRNAs distintos.

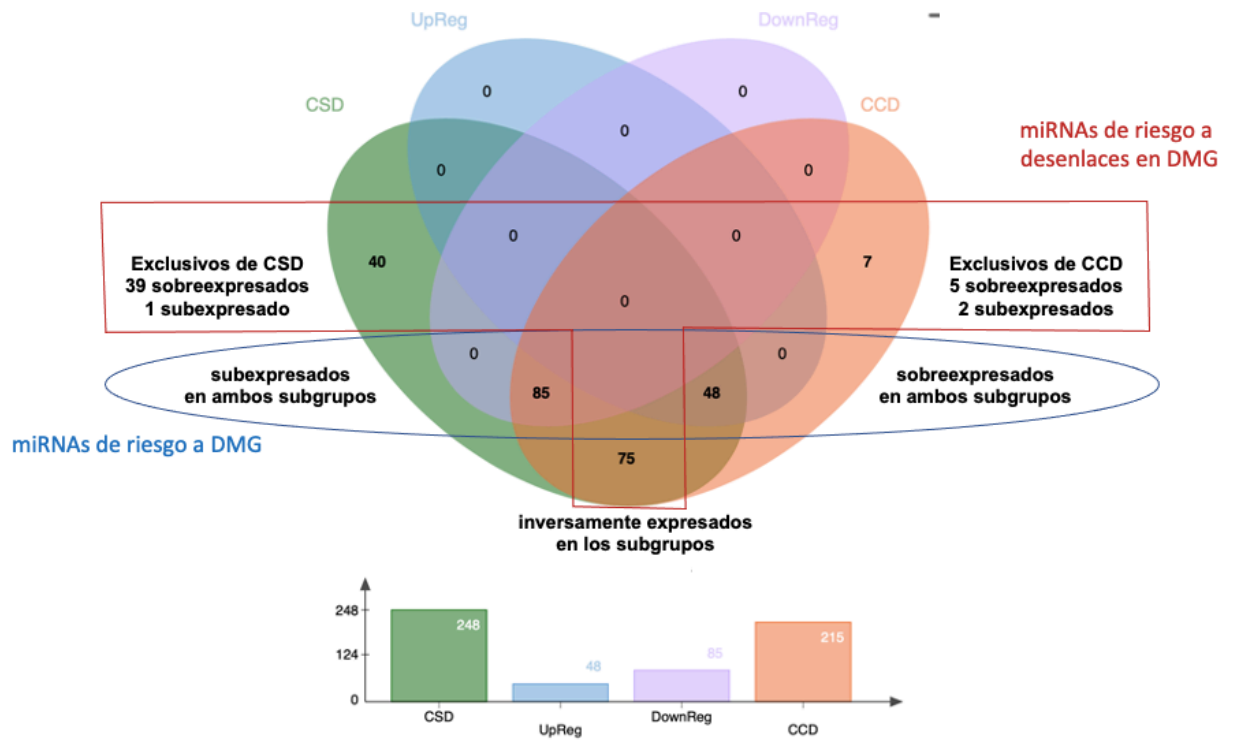
### **8.8 Determinación de los miRNAs expresados diferencialmente**

La expresión diferencial relativa entre grupos control-casos mediante los mean fold change ( $\text{Log}_2$ ), rindió una lista de 216 miRNAs para la comparación CON-CCD y otra de 269 miRNAs para la comparación CON-CSD. Después de combinar los dos archivos de expresión diferencial relativa, se obtuvieron los fold change para los 273 miRNAs reportados en miRBase y que aparecieron entre los tres grupos. Al inspeccionar individualmente cada uno de los 273 miRNAs y de excluir los miRNAs que en la segunda secuenciación (con más rendimiento) no alcanzaron más de 10 lecturas y/o que además no aparecerían en los tres grupos, se obtuvo un perfil final de 255 miRNAs. Como se puede observar en la Figura 12 (Tabla lado izquierdo), los miRNAs con valores de mean fold change en tono azul se encontraron regulados a la baja en el grupo de casos en comparación con el grupo control y los miRNAs con valores de mean fold change en tono rojo se encontraron regulados a la alta en el grupo de casos en comparación con el grupo control.

Determinación de niveles de expresión relativos



**Figura 12. Niveles de expresión relativos de miRNAs.** Se obtuvieron 255 miRNAs reportados en miRBase que aparecieron en los tres grupos. En el lado izquierdo en forma de tabla, los miRNAs con valores de mean fold change en tono azul se encontraron regulados a la baja en el grupo de casos en comparación con el grupo control y los miRNAs con valores de mean fold change en tono rojo se encontraron regulados a la alta en el grupo de casos en comparación con el grupo control. A la derecha, la gráfica muestra el comportamiento simultáneo de cada miRNA en cada subgrupo en relación al grupo control, el orden de los miRNAs en el eje de las ordenadas se basa en el valor de FC (abcisas) del subgrupo CCD, desde mayor o más positivo a menor o más negativo (izquierda a derecha o sobreexpresión a subexpresión, respectivamente). En barras color azul se indican los miRNAs del CCD y en barras naranja los miRNAs del CSD.



**Figura 13. Clasificación de miRNAs en base a expresión diferencial.** Se muestra un diagrama de Venn con la distribución de los 255 miRNAs totales encontrados como perfil. Ochenta y cinco miRNAs se encontraron subexpresados en ambos subgrupos de casos, 48 miRNAs se encontraron sobreexpresados en ambos subgrupos de casos y 75 miRNAs se encontraron inversamente expresados en los subgrupos de casos. Finalmente, 40 miRNAs se encontraron exclusivamente en el grupo de casos sin desenlaces adversos maternos y/o fetales y 7 miRNAs se encontraron exclusivamente en el grupo de casos con desenlaces adversos maternos y/o fetales. Los miRNAs candidatos de riesgo a DMG provendrían de los subgrupos dentro del óvalo azul mientras que los miRNAs candidatos de riesgo adicional a desenlaces adversos o exclusión de desenlaces, provendrían de los grupos dentro del polígono en color rojo.

### 8.9 Identificación de miRNAs candidatos a biomarcadores

Graficando solo los resultados de la expresión de los miRNAs con base en el mean fold change, se tuvo una idea muy clara del comportamiento general e individual

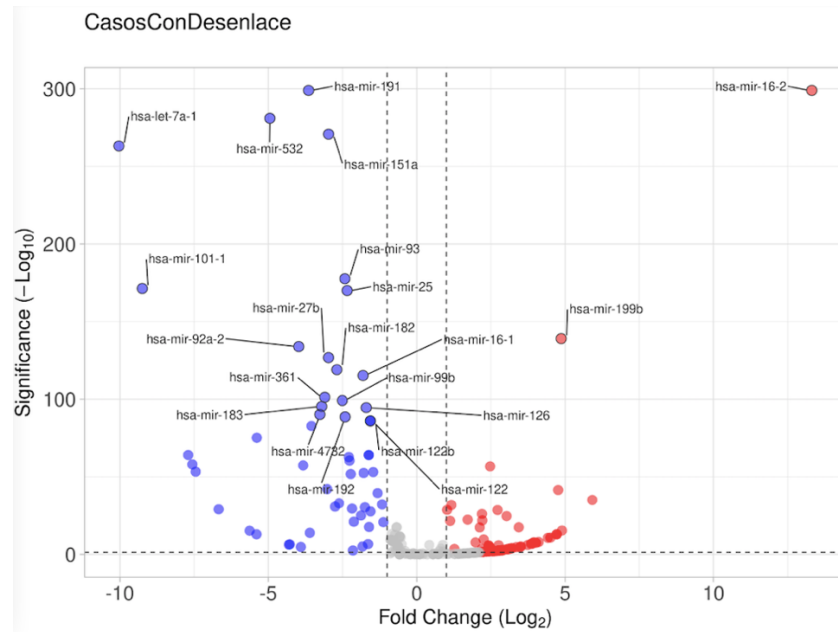
de cada miRNA del perfil de DMG en ambos subgrupos con respecto al grupo control (Figura 12). Se encontraron 133 miRNAs sobreexpresados y/o subexpresados en ambos subgrupos de casos, donde las barra de los miRNAs correspondientes a cada subgrupo (azules y naranjas) estaban simultáneamente orientadas a la misma dirección hacia arriba o hacia abajo del eje, respectivamente. Otros 47 miRNAs solo se sobreexpresaron o subexpresaron en un subgrupo de casos, observándose como barras de un solo color hacia arriba o hacia abajo del eje, respectivamente. Además 75 miRNAs tuvieron una expresión inversa entre los subgrupos de casos, observándose en la posición del miRNA que las barras de diferente color tenían una orientación opuesta. Este comportamiento general de todos los miRNAs se puede observar numéricamente de manera condensada en el diagrama de Venn de la Figura 13.

Por ejemplo, el miRNA 16-2 presentó la mayor diferencia a la baja en el grupo de casos y el miRNA let-7a-1 fue el miRNA con mayor diferencia a la alta en los casos, en comparación con el grupo control.

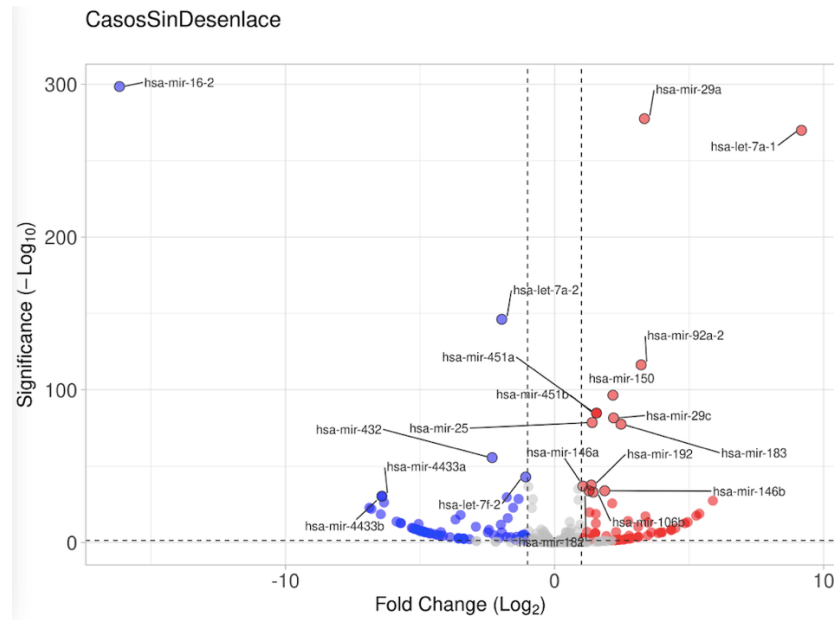
De esta manera, basándose solo en un mean fold change de  $\pm 1.5$  se lograron identificar hasta 200 miRNAs como potenciales biomarcadores de DMG en el primer trimestre del embarazo. También se observaron hasta 43 miRNAs que diferencian los CCD de los CSD.

Cuando se aplicaron los resultados de los análisis estadísticos determinando la significancia ajustada por FDR mediante el paquete *edgeR*, se catalogó más objetivamente por significancia estadística el potencial como biomarcador de cada uno de los miRNAs. Tomando un valor de  $p < 0.05$ , como se muestra en las gráficas de volcano de las Figuras 14 y 15, el número de miRNAs candidatos disminuyó. Se encontraron 107 de 133 miRNAs sobreexpresados y/o subexpresados en ambos subgrupos de casos, 43 de 47 miRNAs solo se sobreexpresaron o subexpresaron en un subgrupo de casos y otros 50 de 75 miRNAs tuvieron una expresión inversa entre los subgrupos de casos. El resumen de valores de importancia para determinar los 20 principales miRNAs

candidatos para cada subgrupo de casos se muestra en las Tablas 11 y 12. Los miRNAs miR-16-2, let-7a-1, miR-25, miR-199b y miR-192 fueron comunes a los dos subgrupos y se comportaron en el mismo sentido (ver columna Change) con respecto al control.



**Figura 14. Significancia estadística de miRNAs en el grupo CCD.** Se muestra la gráfica de volcano resaltando los nombres de los 20 miRNAs estadísticamente más significativos para el grupo CCD. Obsérvese que la significancia no necesariamente coincide con la diferencia de mean fold change.



**Figura 15. Significancia estadística de miRNAs en el grupo CSD.** Se muestra la gráfica de volcano resaltando los nombres de los 20 miRNAs estadísticamente más significativos para el grupo CSD. Obsérvese que la significancia no necesariamente coincide con la diferencia de mean fold change.

**Tabla 11. Los 20 miRNAs más significativos del grupo CCD**

VolcanoR - Exploring volcano plots				
Name	Change	Fold change (log2)	Significance	Manhattan distance
hsa-mir-16-2	Decreased	-13.31501391	299	312.3150139
hsa-mir-191	Increased	3.644755366	299	302.6447554
hsa-mir-532	Increased	4.946485225	281.0400052	285.9864904
hsa-mir-151a	Increased	2.971587543	270.8416375	273.8132251
hsa-let-7a-1	Increased	10.03446132	263.1681302	273.2025915
hsa-mir-101-1	Increased	9.248894443	171.322393	180.5712875
hsa-mir-93	Increased	2.418992516	177.6595559	180.0785484
hsa-mir-25	Increased	2.341521809	170.0056828	172.3472047
hsa-mir-199b	Decreased	-4.868253987	139.0390538	143.9073078
hsa-mir-92a-2	Increased	3.974168684	133.8860566	137.8602253
hsa-mir-27b	Increased	2.974183933	126.7878124	129.7619963
hsa-mir-182	Increased	2.691198882	119.011441	121.7026399
hsa-mir-16-1	Increased	1.808762238	115.2644011	117.0731633
hsa-mir-361	Increased	3.09914785	101.2898826	104.3890305
hsa-mir-99b	Increased	2.505838078	99.17069623	101.6765343
hsa-mir-183	Increased	3.20308103	95.33348202	98.53656305
hsa-mir-126	Increased	1.699354892	94.55909092	96.25844581
hsa-mir-4732	Increased	3.264802358	90.11407366	93.37887602
hsa-mir-192	Increased	2.410272395	88.52287875	90.93315114
hsa-mir-122	Increased	1.561138045	85.94692156	87.5080596

**Tabla 12. Los 20 miRNAs más significativos del grupo CSD**

VolcanoR - Exploring volcano plots				
Name	Change	Fold change (log2)	Significance	Manhattan distance
hsa-mir-16-2	Decreased	-16.16927951	298.5228787	314.6921583
hsa-mir-29a	Increased	3.339776652	277.4915222	280.8312988
hsa-let-7a-1	Increased	9.178227962	269.8616237	279.0398517
hsa-let-7a-2	Decreased	-1.960430472	146.1600404	148.1204709
hsa-mir-92a-2	Increased	3.218425905	116.2981344	119.5165603
hsa-mir-150	Increased	2.171394787	96.44505982	98.61645461
hsa-mir-451a	Increased	1.558076665	84.76220773	86.32028439
hsa-mir-451b	Increased	1.558076665	84.76220773	86.32028439
hsa-mir-29c	Increased	2.193451017	81.58138738	83.7748384
hsa-mir-25	Increased	1.400123584	78.57709484	79.97721842
hsa-mir-183	Increased	2.471430242	77.46900768	79.94043792
hsa-mir-432	Decreased	-2.316823909	55.57394696	57.89077087
hsa-let-7f-2	Decreased	-1.070013902	42.906809	43.9768229
hsa-mir-192	Increased	1.366508899	37.61888823	38.98539713
hsa-mir-146a	Increased	1.055890049	36.88913156	37.94502161
hsa-mir-4433a	Decreased	-6.413763328	30.31296999	36.72673332
hsa-mir-4433b	Decreased	-6.413763328	30.31296999	36.72673332
hsa-mir-146b	Increased	1.865830181	33.941388	35.80721818
hsa-mir-182	Increased	1.280623944	33.86747919	35.14810313
hsa-mir-106b	Increased	1.435788232	32.9838014	34.41958964

**Tabla 13. Blancos funcionales de miRNAs**

miRNA	Grupo	Target
miR-16-2	CCD y CSD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PRKG1 (protein kinase cGMP-dependent 1)</li> <li>2. CADM2 (cell adhesion molecule 2)</li> <li>3. PLCXD3 (phosphatidylinositol specific phospholipase C X domain containing 3)</li> <li>4. INTU (inturned planar cell polarity protein)</li> <li>5. PURA (purine rich element binding protein A)</li> </ol>
let-7a-1	CCD y CSD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. STARD13 (StAR related lipid transfer domain containing 13)</li> <li>2. HMGA2 (high mobility group AT-hook 2)</li> <li>3. IGDC3 (immunoglobulin superfamily DCC subclass member 3)</li> <li>4. IGF2BP1 (insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1)</li> <li>5. FIGLN2 (fidgetin like 2)</li> </ol>
miR-25	CCD y CSD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. C5orf15 (chromosome 5 open reading frame 15)</li> <li>2. AFF1 (AF4/FMR2 family member 1)</li> <li>3. CEP162 (centrosomal protein 162)</li> <li>4. CYP17A1 (cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1)</li> <li>5. SP8 (Sp8 transcription factor)</li> </ol>
miR-199b	CCD y CSD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1)</li> </ol>

		<ol style="list-style-type: none"> <li>2. SLC25A23 (solute carrier family 25 member)</li> <li>3. NAA40 (N (alpha)- acetyltransferase 40, NatD catalytic subunit)</li> <li>4. MYRF (myelin regulatory factor)</li> <li>5. CLCN3 (chloride voltage- gated channel 3)</li> </ol>
miR-192	CCD y CSD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. NIPAL1 (NIPA like domain containing 1)</li> <li>2. BHLHE22 (basic helix-loop-helix family member e22)</li> <li>3. PRKD3 (protein kinase D3)</li> <li>4. RPAP2 (RNA polymerase II associated protein 2)</li> <li>5. LPAR4 (lysophosphatidic acid receptor 4)</li> </ol>
miR-191	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. NEURL4 (neuralized E3 ubiquitin protein ligase 4)</li> <li>2. TAF5 (TATA-box binding protein associated factor 5)</li> <li>3. CREBBP (CREB binding protein)</li> <li>4. CASTOR2 (cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 2)</li> <li>5. TMOD2 (tropomodulin 2)</li> </ol>
miR-532	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. SESTD1 (SEC14 and spectrin domain containing 1)</li> <li>2. ADAM22 (ADAM metallopeptidase domain 22)</li> <li>3. DENND6A (DENN domain containing 6A)</li> <li>4. TAB3 (TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 3)</li> <li>5. NCF2 (neutrophil cytosolic factor 2)</li> </ol>
miR-151a	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. UTY (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked)</li> <li>2. FANCA (FA complementation group A)</li> <li>3. SEZ6L (seizure related 6 homolog like)</li> <li>4. AK2 (adenylate kinase 2)</li> <li>5. RALGAPA1 (Ral GTPase activating protein catalytic alpha subunit 1)</li> </ol>
miR-101-1	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. SGCB (sarcoglycan beta)</li> <li>2. HSPE1 (heat shock protein family E (Hsp 10) member 1)</li> <li>3. NPY5R (neuropeptide Y receptor Y5)</li> <li>4. DMC1 (DNA meiotic recombinase 1)</li> <li>5. SLITRK5 (SLIT and NTRK like family member 5)</li> </ol>
miR-93	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ENPP5 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative))</li> <li>2. FYCO1 (FYVE and coiled- coil domain containing 1)</li> <li>3. DYNC1LI2 (dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 2)</li> <li>4. ZNF1 (zinc finger NFX1-type containing 1)</li> <li>5. NPAT (nuclear protein, coactivator of histone transcription)</li> </ol>
miR-92a-2	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. IQSEC2 (IQ motif and Sec7 domain 2)</li> <li>2. FOXP4 (forkhead box P4)</li> <li>3. SYNGAP1 (synaptic Ras GTPase activating protein 1)</li> <li>4. BCL7A (BCL7A, BAF complex component)</li> <li>5. FAM222A (family with sequence similarity 222 member A)</li> </ol>
miR-27b	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PYROXD1 (pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 1)</li> <li>2. SCD5 (stearoyl-CoA desaturase 5)</li> <li>3. RBM39 (RNA binding motif protein 39)</li> <li>4. MARCO (macrophage receptor with collagenous structure)</li> <li>5. C2orf76 (chromosome 2 open reading frame 76)</li> </ol>
miR-182	CCD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PRKACB (protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta)</li> <li>2. RGS17 (regulator of G protein signaling 17)</li> <li>3. BNC2 (basonuclin 2)</li> </ol>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>4. SNX30 (sorting nexin family member 30)</li> <li>5. LPP (LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma)</li> </ul>
miR-29a	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. B3GLCT (beta 3-glucosyltransferase)</li> <li>2. MINDY2 (MINDY lysine 48 deubiquitinase 2)</li> <li>3. CACNA2D1 (calcium voltage- gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1)</li> <li>4. DENND1B (DENN domain containing 1B)</li> <li>5. ATP6V1C1 (ATPase H+ transporting V1 subunit C1)</li> </ul>
let-7a-2	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. ARFGEG1 (ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 1)</li> <li>2. LRIG1 (leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1)</li> <li>3. TANC2 (tetratricopeptide repeat, ankyring repeat and coiled- coil containing 2)</li> <li>4. BACH2 (BTB domain and CNC homolog 2)</li> <li>5. MBTD1 (mbt domain containing)</li> </ul>
miR-150	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. SV2B (synaptic vesicle glycoprotein 2B)</li> <li>2. MYB (MYB- proto-oncogene, transcription factor)</li> <li>3. MDM4 (MDM4, p53 regulator)</li> <li>4. ADIPOR2 (adiponectin receptor 2)</li> <li>5. PAPP (pappalysin 1)</li> </ul>
miR-451a	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. OSR1 (odd-skipped related transcription factor 1)</li> <li>2. CUX2 (cut like homeobox 2)</li> <li>3. PSMB8 (proteasome subunit beta 8)</li> <li>4. CXCL16 (C-X-C motif chemokine ligand 16)</li> <li>5. TARP (TCR gamma alternate reading frame protein)</li> </ul>
miR-451b	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. NPTX1 (neuronal pentraxin 1)</li> <li>2. AQP9 (aquaporin 9)</li> <li>3. SPTSSA (serine palmitoyltransferase small subunit A)</li> <li>4. TOX3 (TOX high mobility group box family member 3)</li> <li>5. ZFH3 (zinc finger homeobox 3)</li> </ul>
miR-29c	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. HEBP2 (heme binding protein 2)</li> <li>2. TCEA3 (transcription elongation factor A3)</li> <li>3. RPA3 (replication protein A3)</li> <li>4. ATXN7L1 (ataxin 7 like 1)</li> <li>5. TMEM98 (transmembrane protein 98)</li> </ul>
miR-432	CSD	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. E2F3 (E2F transcription factor 3)</li> <li>2. COL4A5 (collagen type IV alpha 5 chain)</li> <li>3. ADAR (adenosine deaminase, rna specific)</li> <li>4. UCK2 (uridine- cytidine kinase 2)</li> <li>5. KRTAP19-6 (keratin associated protein 19-6)</li> </ul>

## **CAPÍTULO IX**

### **DISCUSIÓN**

En años recientes, numerosos estudios se han enfocado a la búsqueda de biomarcadores que permitan predecir de manera más temprana el riesgo al desarrollo de la diabetes mellitus gestacional a partir de métodos poco invasivos, como lo es una muestra de sangre materna. Entre las moléculas estudiadas para posibles biomarcadores, se encuentran los miRNAs. Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes que inhiben la traducción de mRNAs blanco. Es importante agregar que la determinación exacta del tejido de origen y expresión de los miRNAs es difícil de implementar ya que tienen diversas funciones en diferentes tejidos con diferentes patrones de expresión según el contexto o enfermedad y es necesario realizar una investigación más exhaustiva. Estos RNAs han sido analizados en diferentes poblaciones a partir de muestras de suero materno durante toda la gestación; se han encontrado diferentes miRNAs regulados a la alta y otros regulados a la baja, pero han sido distintos y prácticamente no existe un consenso. A la fecha, se proponen varios miRNAs candidatos como biomarcadores del desarrollo de DMG, sin embargo, los resultados en general han sido discordantes, posiblemente debido a la gran variabilidad entre las poblaciones, el tipo de muestra utilizada, al enfoque metodológico empleado, al método de análisis estadístico utilizado y muy probablemente a la edad gestacional, ya que la mayoría de ellos se han realizado en el segundo y tercer trimestre.

En el presente estudio, para establecer el perfil de miRNAs a partir de muestras de suero recolectadas de mujeres cursando el primer trimestre de gestación, se realizó una búsqueda sistemática de los miRNAs circulantes mediante RNAseq. Se generaron tres bibliotecas de miRNAs, que posteriormente se secuenciaron con la plataforma Illumina NextSeq550 para finalmente buscar entre ellas los miRNAs biomarcadores candidatos tomando en cuenta los parámetros como mean fold change  $\pm 1.5$  y una significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Se realizaron dos secuenciaciones que otorgaron resultados proporcionales, sin embargo, la segunda presentó un mejor rendimiento.

Se encontraron hasta 255 miRNAs totales que formaron el perfil de miRNAs del primer trimestre entre los tres grupos de pacientes estudiados. Para la búsqueda de miRNAs con el potencial de convertirse en biomarcadores, los miRNAs pudieron clasificarse en 7 grupos distintos basándose en el patrón de expresión diferencial con respecto al grupo control o entre los dos subgrupos de casos (Gráfica de la Figura 13 y Diagrama de Venn). De manera similar al enfoque de estudios previos, se encontraron 48 miRNAs regulados a la alta en los subgrupos de casos y 85 regulados a la baja en los subgrupos de casos.

El hecho de haber subdividido los casos en dos subgrupos, también permitió al estudio para la búsqueda de miRNAs que pudieran indicar un riesgo a desenlaces adversos, adicional al riesgo de desarrollar la DMG. A diferencia de esos estudios anteriores, se lograron observar miRNAs inversamente expresados entre los subgrupos de casos (75), miRNAs sobreexpresados en ambos subgrupos de casos (48), miRNAs subexpresados en ambos subgrupos de casos (85), miRNAs sobreexpresados exclusivamente en los CSD (39), miRNAs subexpresados exclusivamente en los CSD (1), miRNAs sobreexpresados en CCD (5) y miRNAs subexpresados en CCD (2).

Para establecer el potencial como biomarcador, los 255 miRNA se clasificaron de acuerdo a los valores de mean fold change  $\pm 1.5$  como umbral, con lo cual se redujo ligeramente el número a 202 miRNAs como potenciales biomarcadores de DMG en el primer

trimestre del embarazo y también permanecieron otros 45 miRNAs con el potencial de diferenciar los CCD de los CSD. Ante la enorme cantidad de miRNAs con el potencial de convertirse en un biomarcador de DMG, se procedió a valorarlos más estrictamente de acuerdo a su significancia estadística basada en los valores reales de expresión diferencial. Interesantemente, como se puede observar en gráficas de volcano (Figura 14 y Figura 15), el valor de  $p$  no correlacionó directamente con el valor mean fold change para algunos miRNAs. Algunos miRNAs con FC cercanos a 5 ó -5, no fueron de entre los 20 más significativos estadísticamente. Con este enfoque, aunque se lograron excluir algunos miRNA, la mayoría (200) permanecieron con un potencial de biomarcador. De acuerdo a los resultados combinados de FC y de significancia estadística, algunos de los miRNAs que indentificamos con el mayor potencial para ser usados como biomarcadores difieren de los que habían sido previamente propuestos.

De manera sobresaliente, se encontraron 6 miRNAs líderes: miR-16-2, let-7a-1, miR-25, miR-199b, miR192 y miR-92a-2, que fueron comunes en los dos subgrupos de casos y en los cuales exhibieron el mismo tipo de expresión diferencial.

El miRNA más significativo de este estudio fue el miR-16-2, subexpresado en los casos, seguido por el let-7a-1 sobreexpresado en los casos, por el miR-150 subexpresado en los CCD y sobreexpresado en CSD, el miR-760 sobreexpresado en CCD y subexpresado en CSD, el miR-15b sobreexpresado solo en los CSD y el miR-101-1 sobreexpresado solo en los CCD. La prácticamente ausencia del miR-16-2 en DMG observada en ambos subgrupos, puede ser interpretada como la falta de un regulador génico cuya presencia en una proporción considerable, como en el grupo control, pudiera ejercer efectos benéficos al metabolismo de la glucosa durante el embarazo y viceversa. El miR-16-5p (forma madura del miRNA) fue reportado por estar sobreexpresado en mujeres de 16 a 19 SDG (Y. Zhu et al., 2015). También, la sobreexpresión del miR-16-2 fue asociada al desarrollo de las células beta pancreáticas, en las cuales parece afectar ya sea su diferenciación o su proliferación (Filios & Shalev, 2015). Interesantemente, se reportó

que en pacientes con DMT 2 los niveles elevados de este miRNA en plasma se disminuyeron posteriormente al tratamiento con Metformina, (Ghai et al., 2019). Como biomarcador predictivo, el mir-16-2, encontrado sobreexpresado en plasma, en combinación con otros 4 miRNAs, se ha dicho que puede distinguir entre una DMT 2 temprana de una tardía a partir de muestras de plasma sanguíneo en población Israelí; por lo cual ha sido propuesto como un potencial biomarcador de DMT 2 (Meerson et al., 2019). Además de predisponer al desarrollo futuro de DMT 2, este miRNA parece predisponer al desarrollo enfermedades cerebrales y cardiovasculares (Hromadnikova et al., 2020) y se le ha conferido incluso la capacidad de identificar a las mujeres que desarrollarán DMG tardía de las mujeres que se mantendrán tolerantes a la glucosa a lo largo de toda la gestación (Sorensen et al., 2021).

Claramente existe una contradicción entre la concentración elevada del miR-16-2 en el plasma que ha sido reportada y la ausencia que se encontró aquí, lo que a su vez contradice los aparentes efectos negativos del miR-16-2 asociados al desarrollo de DMG y DMT 2. Esta aparente contradicción puede recaer en un evento arbitrario no discutido a la fecha sobre la forma madura del miRNA conocida como hsa-miR-16-5p; esta forma madura (MIMAT0000069 en miRBase) es compartida entre los genes MIR16-2 y MIR16-1, que forman parte de la familia miR-15 pero que son distintos genes localizados en diferentes *loci* cromosómicos (Ch3 y Chr13, respectivamente) cuyos precursores miR-16-2 y miR-16-1, respectivamente, son diferentes en la mayoría de su longitud. Todos los reportes previos parecen haber cuantificado solo la forma madura común independientemente de su origen el cual pareciera ser indistinguible, así que el número de lecturas, finalmente pudo ser la suma de ambos productos génicos. En el presente estudio, el programa *shortstack* sí asignó lecturas a ambos *loci*, es decir, logró diferenciar secuencias de RNA provenientes del miR-16-2 del miR-16-1. De hecho, el miR-16-1 si se encontró sobreexpresado en ambos subgrupos de casos, lo cual sí concuerda con los reportes previos; este miRNA ocupó la posición 13 de significancia en el subgrupo CCD (Tabla 11 y Figura 14 ) y la 21 en el subgrupo CSD en donde no alcanzó el corte de 1

de FC (Figura 12). Es importante recalcar que la ausencia de miR-16-2 en nuestros resultados es bastante confiable, ya que el grupo de CSD obtuvo el mayor rendimiento en ambas secuenciaciones y en este subgrupo específico el miRNA no se encontró. Entonces, la hipótesis propuesta es que la elevada concentración del hsa-miR-16-5p, probablemente proveniente exclusivamente del miR-16-1 pudiera haber enmascarado la ausencia del miR-16-2 en todos los otros reportes. De confirmarse la ausencia de miR-16-2 en DMG y su abundancia en embarazos normales, deberían considerarse 2 tipos de biomarcadores, miR-16-2 como un biomarcador de buen pronóstico, protector o de riesgo reducido/ausencia de riesgo mientras que el miR-16-1 por toda la evidencia acumulada, sería el biomarcador de riesgo o de mal pronóstico para DMG.

Por su parte, el miRNA let-7a-1, fue el miRNA que presentó la mayor expresión a la alta en los subgrupos de casos en comparación al grupo control. Este es quizás el segundo miRNA común más significativo que ocupó las posiciones 5 y 3 en los subgrupos CCD y CSD, respectivamente. En apoyo de este miRNA como biomarcador de DMG, se ha reportado estar involucrado en vías de señalización de la insulina y su expresión ha correlacionado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de DMT 2 (Z. Zhu et al., 2021). También, el miRNA let-7a-5p, que es la forma madura del miRNA se ha encontrado sobreexpresada en las células endoteliales del cordón umbilical de hijos nacidos de madres con DMG (Tryggestad, 2017). Incluso, el polimorfismo rs13293512 en este miRNA se ha asociado con un incremento de la interleucina 6 (IL-6); la cual se considera un importante contribuyente al desarrollo de DMT 2 (Zhou et al., 2008).

El miR-25, es el tercer miRNA común a ambos subgrupos que se encontró sobreexpresado. Este miRNA ocupó las posiciones 8 y 10 de significancia en los subgrupos CCD y CSD, respectivamente, lo que apoya como un biomarcador riesgo para el desarrollo de DMG. En este sentido, se ha encontrado regulado a la alta en el páncreas y se propone que tiene una probable relación con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (Sárközy et al., 2018). Adicionalmente, este miRNA se ha encontrado regulado a la alta en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, donde se derivó una asociación negativa con

la función residual de células beta pancreáticas y una asociación positiva con el control glucémico, por lo que se propone como un miRNA prometedor, tejido específico, con potencial diagnóstico (Nielsen et al., 2012).

Como el cuarto miRNA común a los subgrupos de casos, el miR-199b se encontró subexpresado de manera más significativa en CCD donde ocupó la posición 9 (Tabla 11) que en CSD bajó a la posición 30 donde no alcanzó un FC de -1 (datos no mostrados). Su concentración disminuída sugiere que este miRNA al igual que el miR-16-2, es un marcador de buen pronóstico. En apoyo a esta inferencia, al miR-199b, se le ha atribuído un efecto protector en los túbulos renales dañados por DMT 2 reprimiendo KDM6A, una desmetilasa reguladora de la expresión de e-cadherina (Tang et al., 2020). Además, su sobreexpresión promueve la proliferación de células beta pancreáticas mediante la inhibición de MLK3 (Sato-Kunisada et al., 2016). Finalmente, miR-192, el quinto miRNA común que quedó ubicado en significancia en las posiciones 19 y 14 en CCD y en CSD, respectivamente, fue encontrado sobreexpresado sugiriendo que es un marcador de riesgo. Aunque previamente no se ha encontrado asociado a DMG, sí se ha encontrado ser abundante en circulación durante etapas tempranas de DMT 1 (Erener et al., 2017). Además, fue encontrado también sobreexpresado en pacientes prediabéticos, por lo que fue propuesto como una nueva herramienta diagnóstica prometedora. (Párrizas et al., 2015). De manera interesante, fue reportado que su concentración en suero en pacientes con prediabetes puede disminuir posterior al tratamiento con vitamina D (Nunez Lopez et al., 2017). El sexto miRNA común, el miR-92a-2, que fue un miRNA en las primeras posiciones de significancia 10 y 5 en los subgrupos CCD y CSD, se ha reportado como regulado a la baja en tejido placentario, pero importantemente y relacionado con su probable riesgo a desenlaces adversos en DMG, se ha propuesto una posible relación con la macromosomía fetal (J. Li et al., 2015).

Quizás el estudio de *Sorensen* (Sorensen et al., 2021), el cual incluyó exclusivamente pacientes con DMG con un IMC correspondiente a obesidad, aunque con mujeres de ascendencia europea, es el estudio más comparable al presente proyecto donde las

mujeres mexicanas que se incluyeron tuvieron un IMC correspondiente a sobrepeso u obesidad. Ellos reportaron a miRNAs más significativos a miR-16-5p, miR-29a y miR-134 como regulados a la alta. En nuestro estudio, como fue esperado para los 2 miRNAs líderes, tanto la sobreexpresión de miR-16-5p (considerada provenir de miR-16-1), como la del miR-29a, el cual ocupó las posiciones 79 y 2 de significancia en los subgrupos CCD y CSD, respectivamente, resultaron coincidir dando validez a los hallazgos. Sin embargo, en un marcado contraste con la sobreexpresión encontrada en CSD, el miR-29a también se encontró regulado a la baja en DMG (Zhao et al., 2011). Basándose en que miR-29a es propuesto como un regulador de la gluconeogénesis hepática y un gran estimulador de la secreción de insulina, la sobreexpresión tienen más sentido en relación al desarrollo de la DMG (Zhao et al., 2011). Por su parte, el miR-134 fue de los miRNAs con una expresión inversa en los subgrupos de casos, solo coincidió en su sobreexpresión con el grupo CCD, pero difirió del CSD. Este miRNA fue de menor significancia (Tablas 10 y 11) ya que ocupó las posiciones inferiores 59 y 54 en los subgrupos de CCD y CSD, respectivamente; por lo tanto, esta variación no sorprende.

Entre los 20 miRNAs más significativos del grupo CCD (Tabla 11), restando los comunes ya discutidos, en posiciones de significancia 2-4, 6, 7, y 10-12, se encontraron: miR-191, miR-532, miR-151a, miR-101-1, miR-93, miR-92a-2, miR-27b y miR-182. La sobreexpresión del miR-191 concordó con la reportada en suero materno del primer trimestre de gestación en mujeres que desarrollaron DMG, es reconocido como un miRNA relacionado al desarrollo del sistema nervioso central (Lamadrid-Romero et al., 2018). Adicionalmente, este miRNA ha sido encontrado regulado también a la alta en el plasma de niños con obesidad y esteatosis hepática no alcohólica en comparación con control por medio de qPCR (Thompson et al., 2017). En cuanto a miR-532, se ha reportado que en adolescentes con obesidad mórbida se ha encontrado regulado a la baja y presenta una asociación marcada con niveles de adiponectina, leptina, insulina, péptido-C y el índice HOMA-IR (Al-Rawaf, 2019). También se ha reportado que en pacientes con obesidad de ascendencia europea miR-532 es un fuerte predictor de

resistencia a la insulina (Jones et al., 2017). El miR-151a no ha sido asociado a DMG, pero sí ha sido reportado como regulado también a la alza en suero de pacientes con desarrollo temprano de DMT 1 (Åkerman et al., 2018) y como un potencial biomarcador de accidente cerebrovascular isquémico (Li et al., 2021). En un estudio publicado en el año 2015, se encontró que la DMG tiene la capacidad de afectar la función de células fetales humanas del cordón umbilical regulando a la alza el miR-101 por medio de EZH2, que es su gen blanco e inhibidor transcripcional (Floris et al., 2015). Del miR-93, solo se ha encontrado regulado a la alza en el suero de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (Erener et al., 2017) y también en el plasma de adultos con diabetes autoinmune latente (Yu et al., 2019). El miR-27b ya se considera un biomarcador de disfunción de células beta (Belongie et al., 2017) y por último, de importancia para el presente proyecto, el miR-182 se ha encontrado circulando en suero en pacientes con prediabetes y DMT 2 (Weale et al., 2020) lo que pudiera ser un buen biomarcador de riesgo para el desarrollo de DMG por lo que es quinto en CSD, aunque décimo en CCD, además de que se mantiene alterada su concentración una vez establecida la enfermedad.

En este estudio se previó que los miRNAs líderes en significancia en el subgrupo CSD, sin incluir a los miRNAs comunes al subgrupo CCD, aportaran únicamente el riesgo al desarrollo de DMG y que podrían coincidir con los encontrados en la mayoría de los estudios o incluso diferir, porque provienen de diferentes trimestres de embarazo y el enfoque es sistemático. Entre este tipo de miRNAs, miR-29a, let-7a-2, miR-150, miR-451a, miR-451b, miR-29c y miR-432 fueron los más significativos ocupando las posiciones 2, 4, 6-9 y 12, respectivamente. Los miR-29a, en efecto, ya ha sido previamente encontrado en suero en DMG del tercer trimestre de gestación y combinado con el miR-29b (posición 43) mostró ser un biomarcador diagnóstico (Deng et al., 2020), sin embargo, los resultados son contrastantes ya que se reportaron estar a la baja y en este estudio a la alta, algo que pudiera estar relacionado al periodo de gestación. Únicamente el miR-150, coincidió en la sobreexpresión el suero pero con pacientes con obesidad en el embarazo (Carreras-Badosa et al., 2015) y el cual, es el

responsable del aumento de la captación de glucosa por provocar un aumento en la expresión de GLUT 1 (Dubey et al., 2020). Otro miRNA con resultados contradictorios fue el miR-29c, este se encontró sobreexpresado cuando ya había sido reportado regulado a la baja en el plasma de pacientes con obesidad en el embarazo (Carreras-Badosa et al., 2015) lo cual puede estar relacionado con el periodo de estudio.

En general, este grupo de miRNAs son inéditos para DMG y sus asociaciones conocidas no son relacionadas a esta. Por ejemplo, del miR-451a se sabe puede promover la expresión de protrombina y contribuir a altos grados de coagulación sanguínea en DMG (Qiu et al., 2020) y del let-7a-2 únicamente ha sido relacionado a un mal pronóstico de pacientes con leucemia mieloide aguda y accidente cerebrovascular isquémico en la literatura (G. Li et al., 2020; Y. Y. Wang et al., 2021). El miR-451b se encontró sobreexpresado, mientras que se había encontrado regulado a la baja en pacientes que desarrollaron DM2 en una población de japoneses americanos (Wander et al., 2020), hecho que no es determinante para desacreditar los hallazgos de este estudio, máxime si son durante el embarazo. El miR-432 solamente se ha involucrado en el desarrollo de cáncer de próstata por lo cual está en investigación su uso terapéutico (Dong et al., 2021).

Como otro grupo de miRNAs con menor significancia que los discutidos arriba, se incluye miRNAs asociados previamente con DMG que en nuestro estudio quedaron fuera de las Tablas 11 y 12. El miR-132 se reportó regulado a la baja (Zhao et al., 2011) cuando fue uno de los miRNAs inversamente expresados entre los subgrupos de casos, encontrándose regulado a la baja en el grupo de CCD y regulado a la alta en el grupo de CSD. Debido a que el miR-132 ocupó las posiciones número 170 y 144 de potencial como biomarcador en el grupo de CCD y CSD, respectivamente, este miRNA parece ser un biomarcador de riesgo para DMG con un potencial menor respecto a otros miRNAs líderes. De acuerdo con lo reportado por *Zhao y cols.* (Zhao et al., 2011), a partir de estudios con microarreglos durante el segundo trimestre de embarazo, el miR-222 fue

encontrado regulado a la baja en todas las pacientes con DMG. Aunque la concentración a la alta de los miR-223 y miR-23a concordó con el estudio de *Yoffe y cols.* (Yoffe et al., 2019) de pacientes con DMG en mujeres de ascendencia europea que a su vez valida a estos miRNAs, sugerimos un potencial menor como biomarcador para DMG basado en las posiciones número 74 y 221 ocupadas por el mirR-223 y las posiciones 93 y 30 del miR-23a en los subgrupos CCD y CSD (datos no mostrados), respectivamente. En apoyo a la importancia del miR-223, en el año 2020, *Abdeltawab y cols.* (Abdeltawab et al., 2020) también lo reportaron estar regulado a la alta en pacientes con DMG, aunque esta vez en muestras de pacientes cursando el segundo y tercer trimestre de gestación. Esto pudiera sugerir que el miR-223 es un biomarcador de riesgo desde el primer trimestre que permanece constante durante todo el embarazo.

Aunque el origen de los miRNAs circulantes en suero es difícil de determinar, parece ser que dado que la placenta expresa una cantidad diversa de miRNAs agrupados en clusters génicos, podría considerarse un órgano blanco de vital importancia para su estudio en el embarazo y para el desarrollo de DMG. En este sentido, *Nair y cols.* reportaron que el miR-125a y el miR-224 regulados a la alta en placenta (vellosidades coriónicas) y en tejido de músculo esquelético en pacientes con DMG (Nair et al., 2018). Sin embargo, en el presente estudio los niveles en suero de esos miRNAs no correspondieron a la expresión placentaria en DMG al menos para el miR-125a que se encontró regulado a la baja en ambos subgrupos de casos y quizás están más de acuerdo con los niveles del miR-224 que se encontraron sobreexpresados en el subgrupo CCD pero no con la subexpresión en CSD. Aún así, aún no se puede descartar un origen placentario de estos miRNAs.

La ventaja de identificar el perfil de miRNAs en el primer trimestre del embarazo radica en la identificación temprana o preventiva de aquellas mujeres con un mayor riesgo de desarrollar DMG, ya que las intervenciones indicadas para su tratamiento podrían aplicarse más tempranamente y no una vez que los valores de glucosa son altos y la DMG está establecida. Los miRNAs que se encontraron en este estudio diseñado para una

búsqueda sistemática de biomarcadores tempranos de DMG, tienen mayor potencial que incluso algunos ya conocidos que no se confirmaron como líderes en este estudio, sin embargo, los miRNAs de este estudio, sobre todos los miRNAs inéditos y aquellos con resultados de expresión contrastantes con lo reportado, tendrán que ser validados en otras series de pacientes de esta y de otras poblaciones para que se confirme su enorme potencial como biomarcador temprano de DMG.

## **CAPÍTULO X**

### **CONCLUSIÓN**

El perfil de miRNA circulantes en sangre del primer trimestre de embarazo comprende un total de 255 miRNAs, 200 miRNAs son potenciales biomarcadores de DMG mientras que otros 43 miRNAs tienen el potencial de predecir desenlaces adversos.

## **CAPÍTULO XI**

### **PERSPECTIVAS**

Validar los miRNAs candidatos en todas las muestras individuales por RT-qPCR con sondas Taqman individuales.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdeltawab, A., Zaki, M. E., Abdeldayem, Y., Mohamed, A. A., & Zaid, S. M. (2020).

Circulating micro RNA-223 and angiopoietin-like protein 8 as biomarkers of gestational diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science*, *0*(0), 1–6.

<https://doi.org/10.1080/09674845.2020.1764211>

Åkerman, L., Casas, R., Ludvigsson, J., Tavira, B., & Skoglund, C. (2018). Serum miRNA levels are related to glucose homeostasis and islet autoantibodies in children with high risk for type 1 diabetes. *PLoS ONE*, *13*(1), 1–15.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191067>

Al-Rawaf, H. A. (2019). Circulating microRNAs and adipokines as markers of metabolic syndrome in adolescents with obesity. *Clinical Nutrition*, *38*(5), 2231–2238.

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.09.024>

American Diabetes Association. (2020). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, *43*(1), S14–S31.

Axtell, M. J. (2013). ShortStack: Comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *Rna*, *19*(6), 740–751. <https://doi.org/10.1261/rna.035279.112>

Barbour, L. A., McCurdy, C. E., Hernandez, T. L., Kirwan, J. P., Catalano, P. M., & Friedman, J. E. (2007). Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*, *30*(SUPPL. 2).

<https://doi.org/10.2337/dc07-s202>

Belongie, K. J., Ferrannini, E., Johnson, K., Andrade-Gordon, P., Hansen, M. K., & Petrie, J. R. (2017). Identification of novel biomarkers to monitor  $\beta$ -cell function and enable early detection of type 2 diabetes risk. *PLoS ONE*, *12*(8), 1–18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182932>

Beltrami, C., Angelini, T. G., & Emanuelli, C. (2015). Noncoding RNAs in diabetes vascular complications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *89*, 42–50.

<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.12.014>

Blumer, I., Hadar, E., Hadden, D. R., Jovanovič, L., Mestman, J. H., Murad, M. H., & Yogeve, Y. (2013). Diabetes and pregnancy: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *98*(11), 4227–4249.

<https://doi.org/10.1210/jc.2013-2465>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Carreras-Badosa, G., Bonmatí, A., Ortega, F. J., Mercader, J. M., Guindo-Martínez, M., Torrents, D., Prats-Puig, A., Martínez-Calcerrada, J. M., Platero-Gutierrez, E., De Zegher, F., Ibáñez, L., Fernández-Real, J. M., López-Bermejo, A., & Bassols, J. (2015). Altered circulating miRNA expression profile in pregestational and gestational obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *100*(11), E1446–E1456. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2872>

Catalano, P. M., Tyzbit, E. D., Wolfe, R. R., Calles, J., Roman, N. M., Amini, S. B., & Sims, E. A. H. (1993). Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *264*(1 27-1). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.1.e60>

Catalano, Patrick M., Huston, L., Amini, S. B., & Kalhan, S. C. (1999). Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *180*(4), 903–916. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(99\)70662-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(99)70662-9)

Cullen, B. R. (2006). Viruses and micrornas. *Nature Genetics*, *38*(6S), S25–S30.

<https://doi.org/10.1038/ng1793>

Damm, P., Houshmand-Oeregaard, A., Kelstrup, L., Lauenborg, J., Mathiesen, E. R., & Clausen, T. D. (2016). Gestational diabetes mellitus and long-term consequences for mother and offspring: a view from Denmark. *Diabetologia*, *59*(7), 1396–1399.

<https://doi.org/10.1007/s00125-016-3985-5>

- Deng, L., Huang, Y., Li, L., Chen, H., & Su, J. (2020). Serum miR-29a/b expression in gestational diabetes mellitus and its influence on prognosis evaluation. *Journal of International Medical Research*, 48(9).  
<https://doi.org/10.1177/0300060520954763>
- Dias, S., Pheiffer, C., Abrahams, Y., Rheeder, P., & Adam, S. (2018). Molecular biomarkers for gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms19102926>
- Dong, C., Fan, B., Ren, Z., Liu, B., & Wang, Y. (2021). CircSMARCA5 Facilitates the Progression of Prostate Cancer through miR-432/PDCD10 Axis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 36(1), 70–83. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3490>
- Erener, S., Marwaha, A., Tan, R., Panagiotopoulos, C., & Kieffer, T. J. (2017). Profiling of circulating microRNAs in children with recent onset of type 1 diabetes. *JCI Insight*, 2(4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89656>
- Ferrara, A. (2007). Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: A public health perspective. *Diabetes Care*, 30(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.2337/dc07-s206>
- Ferreira, A. F. A., Rezende, J. C., Vaikousi, E., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2011). Maternal serum visfatin at 11-13 weeks of gestation in gestational diabetes mellitus. *Clinical Chemistry*, 57(4), 609–613.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.159806>
- Filios, S. R., & Shalev, A. (2015).  $\beta$ -cell microRNAs: Small but powerful. *Diabetes*, 64(11), 3631–3644. <https://doi.org/10.2337/db15-0831>
- Floris, I., Descamps, B., Vardeu, A., Mitić, T., Posadino, A. M., Shantikumar, S., Sala-Newby, G., Capobianco, G., Mangialardi, G., Howard, L., Dessole, S., Urrutia, R., Pintus, G., & Emanuelli, C. (2015). Gestational Diabetes Mellitus Impairs Fetal Endothelial Cell Functions Through a Mechanism Involving MicroRNA-101 and Histone Methyltransferase Enhancer of Zester Homolog-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(3), 664–674.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304730>

- Ghai, V., Kim, T.-K., Etheridge, A., Nielsen, T., Hansen, T., Pedersen, O., Galas, D., & Wang, K. (2019). Extracellular Vesicle Encapsulated MicroRNAs in Patients with Type 2 Diabetes Are Affected by Metformin Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 617. <https://doi.org/10.3390/jcm8050617>
- Hapo Group. (2008). Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 1991–2002.
- Herrera-Van Oostdam, A. S., Toro-Ortíz, J. C., López, J. A., Noyola, D. E., García-López, D. A., Durán-Figueroa, N. V., Martínez-Martínez, E., Portales-Pérez, D. P., Salgado-Bustamante, M., & López-Hernández, Y. (2020). Placental exosomes isolated from urine of patients with gestational diabetes exhibit a differential profile expression of microRNAs across gestation. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(2), 546–560. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4626>
- Hinojosa Hernández, M., Hernández Aldana, F., EF Barrera Tenorio, & MT Gayosso Martínez. (2010). Prevalencia de diabetes mellitus gestacional en el Hospital Juárez de México. *Rev Hosp Jua Mex*, 77(2), 123–128.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Dvorakova, L., & Krofta, L. (2020). Diabetes mellitus and cardiovascular risk assessment in mothers with a history of gestational diabetes mellitus based on postpartal expression profile of micrnas associated with diabetes mellitus and cardiovascular and cerebrovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 1–46. <https://doi.org/10.3390/ijms21072437>
- Iliodromiti, S., Sassarini, J., Kelsey, T. W., Lindsay, R. S., Sattar, N., & Nelson, S. M. (2016). Accuracy of circulating adiponectin for predicting gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 59(4), 692–699. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3855-6>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2016). Evidencias y Recomendaciones: Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes en el embarazo. *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-320-10*, 1, 1–41. [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/007\\_GPC\\_Cir](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/007_GPC_Cir)

culacionArtPerif/IMSS\_007\_08\_EyR.pdf

- Jones, A., Danielson, K. M., Benton, M. C., Ziegler, O., Shah, R., Stubbs, R. S., Das, S., & Macartney-Coxson, D. (2017). miRNA Signatures of Insulin Resistance in Obesity. *Obesity*, 25(10), 1734–1744. <https://doi.org/10.1002/oby.21950>
- Khalafallah, A., Phuah, E., Al-Barazan, A. M., Nikakis, I., Radford, A., Clarkson, W., Trevett, C., Brain, T., Gebski, V., & Corbould, A. (2016). Glycosylated haemoglobin for screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus. *BMJ Open*, 6(4), 1–9. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011059>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Lamadrid-Romero, M., Solís, K. H., Cruz-Reséndiz, M. S., Pérez, J. E., Díaz, N. F., Flores-Herrera, H., García-López, G., Perichart, O., Reyes-Muñoz, E., Arenas-Huertero, F., Eguía-Aguilar, P., & Molina-Hernández, A. (2018). Central nervous system development-related microRNAs levels increase in the serum of gestational diabetic women during the first trimester of pregnancy. *Neuroscience Research*, 130, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.08.003>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Lee, K., Han, Y., Chung, J., Kim, M., Ryu, H., Kim, J., Kwak, D., & Kim, S. (2020). *Treatment of gestational diabetes diagnosed by the IADPSG criteria decreases excessive fetal growth*. 63(1), 19–26.
- Li, G., Gao, Y., Li, K., Lin, A., & Jiang, Z. (2020). Genomic analysis of biomarkers related to the prognosis of acute myeloid leukemia. *Oncology Letters*, 20(2), 1824–1834. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11700>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Li, J., Song, L., Zhou, L., Wu, J., Sheng, C., Chen, H., Liu, Y., Gao, S., & Huang, W. (2015).

A MicroRNA signature in gestational diabetes mellitus associated with risk of macrosomia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *37*(1), 243–252.

<https://doi.org/10.1159/000430349>

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21.

<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, *17*(10), 10–12.

Martínez-Ibarra, A., Martínez-Razo, L. D., Vázquez-Martínez, E. R., Martínez-Cruz, N.,

Flores-Ramírez, R., García-Gómez, E., López-López, M., Ortega-González, C., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2019). Unhealthy levels of phthalates and bisphenol a in mexican pregnant women with gestational diabetes and its association to altered expression of miRNAs involved with metabolic disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13), 1–17.

*International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/ijms20133343>

Meerson, A., Najjar, A., Saad, E., Sbeit, W., Barhoum, M., & Assy, N. (2019). Sex differences in plasma MicroRNA biomarkers of early and complicated diabetes mellitus in Israeli Arab and jewish patients. *Non-Coding RNA*, *5*(2).

<https://doi.org/10.3390/NCRNA5020032>

Moen, G. H., Sommer, C., Prasad, R., Sletner, L., Groop, L., Qvigstad, E., & Birkeland, K. (2017). Mechanisms in Endocrinology: Epigenetic modifications and gestational diabetes: a systematic review of published literature. *European Journal of Medicine*, *February*, 1–45.

Nair, S., Jayabalan, N., Guanzon, D., Palma, C., Scholz-Romero, K., Elfeky, O., Zuñiga, F., Ormazabal, V., Diaz, E., Rice, G. E., Duncombe, G., Jansson, T., McIntyre, H. D., Lappas, M., & Salomon, C. (2018). Human placental exosomes in gestational diabetes mellitus carry a specific set of miRNAs associated with skeletal muscle

insulin sensitivity. *Clinical Science*, 132(22), 2451–2467.

<https://doi.org/10.1042/CS20180487>

National Institute for Health and Care Excellence. (2015). Diabetes in pregnancy : management from preconception to the postnatal period. *NICE, February*, 2–65.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez.srv.meduniwien.ac.at/pubmed/25950069>

Negrato, C. A., Mattar, R., & Gomes, M. B. (2012). Adverse pregnancy outcomes in women with diabetes. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 4(1), 2–7.

<https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-41>

Nielsen, L. B., Wang, C., Sørensen, K., Bang-Berthelsen, C. H., Hansen, L., Andersen, M.

L. M., Hougaard, P., Juul, A., Zhang, C. Y., Pociot, F., & Mortensen, H. B. (2012).

Circulating levels of MicroRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: Evidence that miR-25 associates to residual beta-cell

function and glycaemic control during disease progression. *Experimental Diabetes*

*Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/896362>

Nunez Lopez, Y. O., Pittas, A. G., Pratley, R. E., & Seyhan, A. A. (2017). Circulating levels of miR-7, miR-152 and miR-192 respond to vitamin D supplementation in adults with prediabetes and correlate with improvements in glycemic control. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 49, 117–122.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.007>

Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe mundial sobre la Diabetes.

*Organización Mundial de La Salud*. [https://doi.org/10.1016/s0212-5382\(04\)71624-6](https://doi.org/10.1016/s0212-5382(04)71624-6)

Párrizas, M., Brugnara, L., Esteban, Y., González-Franquesa, A., Canivell, S., Murillo, S.,

Gordillo-Bastidas, E., Cussó, R., Cadefau, J. A., García-Roves, P. M., Servitja, J. M., &

Novials, A. (2015). Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes

and are modulated by an exercise intervention. *Journal of Clinical Endocrinology*

*and Metabolism*, 100(3), E407–E415. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2574>

Pheiffer, C., Dias, S., Rheeder, P., & Adam, S. (2018). Decreased Expression of

Circulating miR-20a-5p in South African Women with Gestational Diabetes

- Mellitus. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 22(3), 345–352.  
<https://doi.org/10.1007/s40291-018-0325-0>
- Pillar, N., Yoffe, L., Hod, M., & Shomron, N. (2015). The possible involvement of microRNAs in preeclampsia and gestational diabetes mellitus. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 29(2), 176–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.04.021>
- Poirier, C., Desgagné, V., Guérin, R., & Bouchard, L. (2017). MicroRNAs in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus: Emerging Role in Maternal Metabolic Regulation. *Current Diabetes Reports*, 17(5). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0856-5>
- QIAGEN. (2012). miRNeasy Serum / Plasma Handbook. *Protocol*, 1071181(February), 1–44.
- QIAGEN. (2020). *QIAseq<sup>®</sup> miRNA Library Kit Handbook*. March.
- Qiu, M., Shangguan, Z., & Zhang, H. (2020). Downregulation of miR-451a in plasma may promote prothrombin expression and contribute to high blood coagulation state in gestational diabetes mellitus. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19(10), 2079–2084. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i10.9>
- Rasanen, J. P., Snyder, C. K., Rao, P. V., Mihalache, R., Heinonen, S., Gravett, M. G., Roberts, C. T., & Nagalla, S. R. (2013). Glycosylated fibronectin as a first-trimester biomarker for prediction of gestational diabetes. *Obstetrics and Gynecology*, 122(3), 586–594. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3182a0c88b>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodrigo, N., & Glastras, S. (2018). The Emerging Role of Biomarkers in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, 7(6), 1–16.  
<https://doi.org/10.3390/jcm7060120>
- Sárközy, M., Kahán, Z., & Csont, T. (2018). A myriad of roles of miR-25 in health and disease. *Oncotarget*, 9(30), 21580–21612.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24662>

Sato-Kunisada, R., Yoshida, N., Nakamura, S., Uchiyama, H., & Matsumoto, H. (2016). Enhanced Expression of miR-199b-5p Promotes Proliferation of Pancreatic  $\beta$ -Cells by Down-Regulation of MLK3. *MicroRNA*, 5(1), 57–65.

<https://doi.org/10.2174/2211536605666160607082214>

Scottish Intercollegiate Guidelines Network. (2013). Management of diabetes: A national clinical guideline. *Journal of the Medical Association of the State of Alabama*, 24(7), 178–180. [https://doi.org/10.5005/jp/books/12593\\_11](https://doi.org/10.5005/jp/books/12593_11)

Sliwinska, A., Kasinska, M. A., & Drzewoski, J. (2017). MicroRNAs & metabolic disorders - Where are we heading? *Archives of Medical Science*, 13(4), 885–896.

<https://doi.org/10.5114/aoms.2017.65229>

Sorensen, A., Jensen, D. M., Dalgaard, L. T., Dali, T., & Investigator, C. (2021).

*Identification of Gestational Diabetes : A Nested Analysis of the DALI Cohort*. 1–16.

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

Tang, B., Li, W., Ji, T., Li, X., Qu, X., & Bai, S. (2020). *MiR-199b-3p prevent the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and fibrosis of renal tubule by regulating E-cadherin through targeting KDM6A in Diabetic nephropathy (DN)*. 2021.

<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-24819/v1>

Thompson, M. D., Cismowski, M. J., Serpico, M., Pusateri, A., & Brigstock, D. R. (2017).

Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clinical Obesity*, 7(4), 216–221. <https://doi.org/10.1111/cob.12192>

Tryggstad, J. (2017). Influence of gestational diabetes mellitus on umbilical vein endothelial cell miRNA. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148.

<https://doi.org/10.1042/CS20160305>.Influence

Vasu, S., Kumano, K., Darden, C. M., Rahman, I., Lawrence, M. C., & Naziruddin, B. (2019). MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States. *Cells*, 8(12), 1533. <https://doi.org/10.3390/cells8121533>

Wander, P. L., Boyko, E. J., Hevner, K., Parikh, V. J., Tadesse, M. G., Sorensen, T. K.,

- Williams, M. A., & Enquobahrie, D. A. (2017). Circulating early- and mid-pregnancy microRNAs and risk of gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *132*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.024>
- Wander, P. L., Enquobahrie, D. A., Bammler, T. K., Srinouanprachanh, S., MacDonald, J., Kahn, S. E., Leonetti, D., Fujimoto, W. Y., & Boyko, E. J. (2020). Short Report: Circulating microRNAs are associated with incident diabetes over 10 years in Japanese Americans. *Scientific Reports*, *10*(1), 3–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63606-3>
- Wang, F., Zhang, X., & Zhou, H. (2019). Role of cell free microRNA-19a and microRNA-19b in gestational diabetes mellitus patients. *3 Biotech*, *9*(11), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1952-9>
- Wang, Y. Y., Zhang, H. Y., Jiang, W. J., Liu, F., Li, L., Deng, S. M., He, Z. Y., & Wang, Y. Z. (2021). Genetic polymorphisms in pri-let-7a-2 are associated with ischemic stroke risk in a Chinese Han population from Liaoning, China: a case-control study. *Neural Regeneration Research*, *16*(7), 1302–1307. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.301019>
- Weale, C. J., Matshazi, D. M., Davids, S. F. G., Raghubeer, S., Erasmus, R. T., Kengne, A. P., Davison, G. M., & Matsha, T. E. (2020). Circulating mir-30a-5p and mir-182-5p in prediabetes and screen-detected diabetes mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, *13*, 5037–5047. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S286081>
- Yoffe, L., Polsky, A., Gilam, A., Raff, C., Mecacci, F., Ognibene, A., Crispi, F., Gratacós, E., Kanety, H., Mazaki-Tovi, S., Shomron, N., & Hod, M. (2019). Early diagnosis of gestational diabetes mellitus using circulating microRNAs. *European Journal of Endocrinology*, *181*(5), 565–577. <https://doi.org/10.1530/EJE-19-0206>
- Yu, K., Huang, Z., Zhou, J., Lang, J., Wang, Y., Yin, X., Zhou, Y., & Zhao, D. (2019). Transcriptome profiling of microRNAs associated with latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47726-z>

- Zhao, C., Dong, J., Jiang, T., Shi, Z., Yu, B., Zhu, Y., Chen, D., Xu, J., Huo, R., Dai, J., Xia, Y., Pan, S., Hu, Z., & Sha, J. (2011). Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS ONE*, *6*(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023925>
- Zhou, L., He, H., Mi, J. X., Li, C., Lee, B., & Mi, Q. S. (2008). MicroRNA genes: Are they susceptibility candidates for human type 1 diabetes? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1150*, 72–75. <https://doi.org/10.1196/annals.1447.026>
- Zhu, Y., Tian, F., Li, H., Zhou, Y., Lu, J., & Ge, Q. (2015). Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *130*(1), 49–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.01.010>
- Zhu, Z., Zhang, Y., Bai, R., Yang, R., Shan, Z., Ma, C., Yang, J., & Sun, D. (2021). Association of Genetic Polymorphisms in MicroRNAs With Type 2 Diabetes Mellitus in a Chinese Population. *Frontiers in Endocrinology*, *11*(February), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.587561>

## ANEXOS

### Anexo 1. Carta de aprobación del Comité de Ética



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. MED. JOSE GERARDO GONZALEZ GONZALEZ**

Investigador principal  
Servicio de Endocrinología  
Presente.-

Estimado Dr. González:

Le informo que nuestro **Comité de Ética en Investigación** del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, ha **evaluado y aprobado** el proyecto de investigación titulado: **"Evaluación de perfiles de miRNAs en la predicción del desarrollo de diabetes mellitus gestacional"**, participando además el Dr. René Rodríguez Gutiérrez, Dr. med. Donato Saldívar Rodríguez, Dra. C. Adriana Sánchez García, MPSS Victoria González Nava, MPSS Giselle Rodríguez Tamez y el Dr. Camilo González Vázquez como Co-Investigador. De igual forma el siguiente documento:

- Protocolo en extenso, versión 2.0 de fecha 28 de Septiembre del 2017.

Le reitero que es su obligación presentar a este Comité de Ética en Investigación un informe técnico parcial a más tardar el día en que se cumpla el año de emisión de este oficio, así como notificar la conclusión del estudio. Este protocolo quedo registrado en esta Subdirección con la clave **EN17-00029**.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior esté debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente,  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey N.L., 12 de Octubre de 2017

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

**DR. med. JOSE GERARDO GARZA LEAL**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación

**Comité de Ética en Investigación**

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: (+52) 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



September 11, 2014

## Anexo 2. Carta de aprobación del Comité de investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. MED. JOSE GERARDO GONZALEZ GONZALEZ**

Investigador principal  
Servicio de Endocrinología  
Presente.-

Estimado Dr. González:

En respuesta a su solicitud con número de Ingreso **PI17-00294** con fecha del **18 de Septiembre del 2017**, recibida en las Oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende el siguiente **DICTAMEN FAVORABLE** con fundamento en los artículos 4º párrafo cuarto y 16 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; así como los artículos 14-16, 99 párrafo tercero, 102, 106 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud; así como de los artículos 111, 112 y 119 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; Además Punto 4.4, 4.7, 6.2, 8 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento Interno de Investigación de Nuestra Institución.

Se informa que el Comité de Investigación ha determinado que el Protocolo de Investigación clínica abajo mencionado cuenta con la calidad técnica, aspectos metodológicos y mérito científico requeridos.

**"Evaluación de perfiles de miRNAs en la predicción del desarrollo de diabetes mellitus gestacional"**, el cual quedó registrado en esta Subdirección con la clave **EN17-00029**.

De igual forma los siguientes documentos:

- Protocolo en extenso, versión 2.0 de fecha 28 de Septiembre del 2017.

Le reitero que es su obligación presentar a este Comité de Investigación un informe técnico parcial a más tardar el día en que se cumpla el año de emisión de este oficio, así como notificar la conclusión del estudio.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior este debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente.-

*"Alere Flamman Veritatis"*

Monterrey, Nuevo León 12 de Octubre del 2017

DR. C. GUILLERMO ELIZONDO RIOJAS  
Presidenta del Comité de Investigación

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA  
EN INVESTIGACIÓN

### Comité de Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: (+52) 818329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com



September 15, 2014