



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Análisis metabólico, mediante un enfoque dirigido, de muestras séricas de mujeres mexicanas embarazadas para la propuesta de nuevas herramientas de diagnóstico de diabetes mellitus gestacional y evaluación de su comportamiento en la progresión del embarazo.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

QFB. Karla Liliana García Mejía

Dirigido por:

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

SINODALES

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

M. en C. David Gustavo García Gutiérrez
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Noviembre 2020

Dedicatoria

A todas las personas que día a día son amables, ambientales, que sonrían, que abrazan, que aman y contribuyen a que el mundo sea bueno y mejor... A todas las personas que se fueron y nos hacen falta aquí.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

Agradecimientos

A quien primero quiero agradecer es Dios padre, que nunca me soltó de su mano. Fue presente cada día, cada segundo.

Agradezco a mis padres Juan Carlos y Ma. Eli por darme todo su amor y apoyo incondicional sin ellos simplemente me parece imposible cada logro.

A mi hermanita menor pero llena de virtudes y valores.

A mis papás abuelos Jovita y Joaquín, Guadalupe y Jaime infinitas gracias, su amor es lo más maravillo y grandioso que me dieron mis padres.

A mi pareja Abraham por su apoyo infinito e incondicional.

A todas y cada una de mis compañeras de la Maestría en Química Clínica Diagnóstica, juntas nos subimos en esta travesía que resulto muy agradable.

A mi asesora de tesis la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez todo sobre ella es bueno, su amabilidad, disposición, conocimiento y experiencia.

A todos los miembros de mi comité tutorial Dr. Eduardo Castaño Tostado, Dra. Rosalía, M. en C. David Gustavo García Gutiérrez, y M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote por todo el acompañamiento en el proceso de investigación que incluyo su tiempo, disposición, conocimiento, experiencia.

A mis amigas y amigos de etapas anteriores que siempre me animaron.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química.

A Conacyt por la beca monetaria para poder llevar a cabo este estudio de maestría y el proyecto de tesis.

Índice General

Índice General	I
Índice de Cuadros	IV
Índice de Figuras	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	X
Abstract	XI
1.Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Diabetes mellitus	4
2.2 Diabetes mellitus gestacional	4
2.2.1 Definición de diabetes mellitus gestacional	4
2.2.2 Incidencia de diabetes mellitus gestacional	4
2.2.3 Cambios metabólicos en un embarazo normal	4
2.2.4 Fisiopatología de la diabetes mellitus gestacional	5
2.2.4.1 Disfunción de las células β pancreáticas	6
2.2.4.2 Resistencia a la insulina crónica	7
2.2.4.3 Lactógeno placentario humano	8
2.2.4.4 Inflamación y adipocinas implicadas en embarazos con DMG	8
2.2.4.4.1 Factor de necrosis tumoral (TNF α) e interleucina-6 (IL-6)	9
2.2.4.4.2 Adiponectina	9
2.2.4.4.3 Leptina	10
2.2.5 Factores predisponentes para DMG	10
2.2.6 Complicaciones por diabetes mellitus gestacional	11
2.2.6.1 Complicaciones neonatales e infantiles en la descendencia	11
2.2.6.2 Complicaciones en las mujeres embarazadas	12
2.2.7 Diagnóstico de DM preexistente	13
2.2.8 Diagnóstico de DMG	13

2.2.9 Estudios sobre perfiles de riesgo para DMG	15
2.3 Ciencias Ómicas	16
2.3.1 Metabolómica	16
2.3.1.1 Extracción de metabolitos	17
2.3.1.2 Separación cromatográfica	18
2.3.2 Estudios metabolómicos en DMG	18
3. Justificación	21
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo General	22
4.2. Objetivos específicos	22
5. Metodología	23
5.1 Diseño de estudio	23
5.2 Definición del universo de estudio	23
5.2.1 Tamaño de muestra	23
5.3.2 Criterios de inclusión	24
5.3.3 Criterios de exclusión	24
5.2.4 Criterios de eliminación	24
5.3 Definición de variables	24
5.4 Proceso de reclutamiento	25
5.5 Toma de muestras biológicas	25
5.6 Determinación de medidas antropométricas	26
5.7 Determinación de perfil bioquímicos	27
5.7.1 Determinación de la concentración de glucosa en suero	27
5.7.2 Determinación del perfil de lípidos en suero	27
5.7.3 Determinación de insulina en suero	27
5.8 Diagnóstico de DMG	27
5.9 Análisis metabolómico	28
5.9.1 Extracción de los metabolitos	28
5.9.2 Método UPLC-MS para el análisis metabolómico	29
5.9.3 Adquisición de datos e identificación de metabolitos	30

5.10 Análisis estadístico	30
6. Resultados	32
6.1 Reclutamiento	32
6.2 Historia clínica de las mujeres embarazadas con DMG y sin DMG	32
6.3 Parámetros bioquímicos de mujeres con DMG y sin DMG en los tres trimestres de gestación	33
6.4 Análisis metabólico dirigido en muestras séricas de mujeres con DMG y sin DMG en el primer trimestre de gestación	37
6.4.1 Identificación de metabolitos	37
6.4.2 Análisis multivariado	38
6.4.2.1 PLS-DA del primer trimestre de gestación	38
6.4.2.2 PLS-DA del segundo trimestre de gestación	41
6.4.2.3 PLS-DA del tercer trimestre de gestación	43
6.4.3 Metabolitos candidatos a biomarcador	43
6.4.3.1 Metabolito lisoPI (20:1)	46
6.4.3.2 Metabolito lisoPI (20:4)	47
6.4.3.3 Metabolito PA (16:1/20:3)	48
6.4.3.4 Metabolito PI (16:1/18:1)	49
7. Conclusiones	50
Limitaciones	50
Perspectivas	51
8. Referencias Bibliográficas	52
Anexos	60
Anexo A	60
Anexo B	61
Anexo C	66

Índice de Cuadros

Cuadro	Título	Página
1	Posibles resultados adversos en la descendencia expuesta a diabetes mellitus gestacional	12
2	Criterios para el diagnóstico de diabetes	13
3	Detección y diagnóstico de DMG con estrategia de dos pasos	14
4	Estudios metabólicos de DMG	20
5	Variables y unidades de medida	24
6	Pautas de aumento de peso gestacional Instituto de Medicina (OIM)	26
7	Diagnóstico para DMG estrategia de un paso	28
8	Programa de elución de gradiente	30
9	Características clínicas generales de los grupos de estudio	33
10	Parámetros bioquímicos en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación de los grupos de estudio	35
11	Metabolitos candidatos a biomarcador encontrados en el primer trimestre	40
12	Metabolitos discriminatorios entre los grupos de estudio para el segundo trimestre	42
13	Comportamiento de LisoPI (20:1) en los tres trimestres de gestación	47
14	Comportamiento de LisoPI (20:4) en los tres trimestres de gestación	48

15	Comportamiento de PA (16:1/20:3) en los tres trimestres de gestación	49
16	Comportamiento de PI (16:1/18:1) en los tres trimestres de gestación	50

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1	Resistencia a la insulina en embarazo normal y en embarazo con diabetes mellitus gestacional	6
2	Diagrama de señalización de insulina	8
3	Factores patogénicos subyacentes a la DMG	11
4	Extracción de metabolitos; separación de fases	29
5	Niveles de glucosa post carga a 1 hora y 2 horas (75 g glucosa) en mujeres con DMG y sin DMG	34
6	Espectro de masas del metabolito AG 22:6 baja y alta energía de colisión	38
7	Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) del análisis metabolómico dirigido en el primer trimestre de gestación de los grupos de estudio	40
8	Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) del análisis metabolómico dirigido en el segundo trimestre de gestación de los grupos de estudio	41
9	Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) del análisis metabolómico dirigido en el tercer trimestre de gestación de los grupos de estudio	43
10	Curva ROC del metabolito LisoPI (20:1) del primer trimestre de gestación	44
11	Curva ROC del metabolito LisoPI (20:4) del primer trimestre de gestación	45

12	Curva ROC del metabolito PI (16:1/20:3) del primer trimestre de gestación	45
13	Curva ROC del metabolito PI (16:1/ 18:1) del primer trimestre de gestación	46
14	Estructura química del metabolito LisoPI (20:1)	46
15	Estructura química del metabolito LisoPI (20:4)	47
16	Estructura química del metabolito PA (16:1/20:3)	48
17	Estructura química del metabolito PI (16:1/18:1)	50

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva
GWG	Aumento de peso gestacional
CTGO	Curva de tolerancia oral a la glucosa
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
FID	Federación Internacional de Diabetes
GC-MS	Cromografía de gases-acoplado a espectrometría de masas
GWG	Aumento de peso gestacional
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IADPSG	Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
LC-MS	Cromatografía líquida- acoplado a espectrometría de masas
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Ácidos fosfatídicos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROC	Características Operativas del Receptor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Resumen

La diabetes mellitus gestacional es una complicación del embarazo, donde las mujeres desarrollan hiperglucemia crónica durante la gestación. Si no es tratada a tiempo, puede generar complicaciones en la madre y su descendencia. El diagnóstico se realiza en el segundo trimestre de gestación con una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG). Dicha herramienta no es utilizada de manera rutinaria en el primer trimestre de gestación, ya que durante el embarazo las mujeres desarrollan hiperinsulinemia, lo que normaliza los niveles de glucosa, dificultando el diagnóstico temprano de la resistencia a la insulina. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis metabólico, mediante un enfoque dirigido, para identificar metabolitos séricos como candidatos a biomarcador para el diagnóstico oportuno de diabetes mellitus gestacional y su comportamiento en la progresión del embarazo. El diseño de estudio fue observacional, comparativo y longitudinal. Se reclutaron mujeres embarazadas desde el primer trimestre de gestación (11-14 semanas de gestación) hasta el tercer trimestre. El diagnóstico de DMG se realizó de acuerdo con las pautas de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo con una CTGO en ayunas con 75 g de glucosa a las 24-28 semanas y se diagnosticó DMG si se cumplían alguno de los siguientes puntos de corte, es decir, ≥ 92 mg/dL o 1 hora ≥ 180 mg/dL o 2 horas ≥ 153 mg/dL. Se realizaron análisis bioquímicos y un análisis metabólico dirigido a compuestos de lípidos de clase glicerofosfolípidos y ácidos grasos mediante la técnica analítica de UPLC-QTOF MS^E, un análisis estadístico multivariado y posteriormente la validación de candidatos a biomarcador en el primer trimestre de gestación con modelo logístico para construir Curvas Características del Receptor (ROC) para la estimación de sensibilidad y especificidad analítica. Se evaluaron a 31 mujeres mexicanas embarazadas, de las cuales 19 fueron diagnosticadas con DMG y 12 sin DMG, el análisis metabólico junto con el análisis estadístico multivariado encontró que el metabolismo sérico lipídico era significativamente diferente y permitió la identificación de 17 metabolitos responsables de la discriminación entre los grupos de estudio. El análisis de las curvas ROC posicionó a cuatro metabolitos (lisoPI (20:1), lisoPI (20:4), PA (16:1/20:3) y PI (16:1/18:1)) con mayor potencial para ser aplicados en el diagnóstico oportuno. El análisis metabólico dirigido permitió la discriminación entre mujeres mexicanas que desarrollaron DMG y aquellas que no desarrollaron esta enfermedad en el primer y segundo trimestre de gestación. Los metabolitos lisoPI (20:1), lisoPI (20:4), PA (16:1/20:3) y PI (16:1/18:1) podrían ser propuestos como candidatos a biomarcador para el diagnóstico oportuno.

Palabras clave: diabetes mellitus gestacional; diagnóstico; biomarcador; metabólico

Abstract

Gestational diabetes mellitus is a complication of pregnancy, where women develop chronic hyperglycemia during pregnancy. If not treated on time, it can generate complications to the mother and her offspring. The diagnosis is made in the second trimester of gestation with an oral glucose tolerance test (OGTT). This tool is not used routinely in the first trimester of pregnancy, since during pregnancy women develop hyperinsulinemia, which normalizes glucose levels, obstructing the early diagnosis of insulin resistance. The general objective of this research was to perform a targeted metabolomic analysis to identify serum metabolites as candidates for biomarkers for the opportune diagnosis of gestational diabetes mellitus and its behavior in the progression of pregnancy. The study design was observational, comparative and longitudinal. Pregnant women were recruited from the first trimester of gestation (11-14 weeks gestation) to the third trimester. The diagnosis of DMG was made according to the guidelines of the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups with an OGTT in a fasting state using 75 g of glucose at 24-28 weeks and GDM diagnosed if any one of the following cut-offs is met ≥ 92 mg/dL, or 1-hour ≥ 180 mg/dL or 2-hour ≥ 153 mg/dL. A biochemical analysis was performed and targeted metabolomic analysis to compounds of lipid class glycerophospholipids and fatty acyls by the analytical technique of UPLC-QTOF MS^E, a multivariate statistical analysis and subsequently the validation of biomarker candidates in the first trimester of gestation with a logistic model to construct Receiver Operating Characteristic Curves (ROC) for the estimation of analytical sensitivity and specificity. 31 pregnant Mexican women were evaluated, of which 19 were diagnosed with GDM and 12 without GDM. The metabolomic analysis with the multivariate statistical analysis found that the lipid serum metabolism was significantly different and allowed the identification of 17 metabolites responsible for the discrimination between the study groups. The analysis of the ROC curves positioned four metabolites (lysoPI (20:1), lysoPI (20:4), PA (16: 1/20:3) and PI (16:1/18:1)) with greater potential to be applied in the opportune diagnosis. The targeted metabolomic analysis allowed discrimination between Mexican women who developed GDM and those who did not develop this disease in the first and second trimesters of pregnancy. The metabolites lysoPI (20:1), lysoPI (20:4), PA (16:1/20:3) and PI (16:1/18:1) could be proposed as biomarker candidates for opportune diagnosis.

Keywords: gestational diabetes mellitus; diagnosis; biomarker; metabolomic

1. Introducción

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es un importante problema de salud pública y una de las complicaciones más comunes del embarazo. Se define como “un trastorno metabólico con un tipo de intolerancia a la glucosa que se desarrolla en el segundo y tercer trimestre del embarazo, dando como resultado una hiperglucemia de gravedad variable. Dicha intolerancia a la glucosa puede provocar que las gestantes con DMG y sus bebés padezcan algunas complicaciones a corto y largo plazo (Chiefari *et al.*, 2017).

La prevalencia de DMG ha aumentado significativamente en los últimos años ante el panorama de incremento acelerado de la obesidad y la diabetes tipo 2 (Filardi *et al.*, 2019). El diagnóstico para DMG se realiza de la semana 24 a la 28 de gestación porque la resistencia a la insulina aumenta durante el segundo trimestre y los niveles de glucosa aumentan en las mujeres que no tienen la capacidad de producir suficiente insulina para adoptar esta resistencia. La curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO) es la prueba diagnóstica para detectar la DMG en las mujeres embarazadas. Dicha prueba presenta dos enfoques (Rani & Begum, 2016).

- El enfoque de dos pasos: comienza con la administración de 50 gramos de glucosa oral (test de O’Sullivan), posteriormente se mide la glucosa a la hora y si su valor se encuentra por encima de 140 mg/dL, se realiza una CTGO de 3 horas con una carga de glucosa de 100 g.
- El enfoque de un paso: son recomendaciones de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG por sus siglas en inglés), donde indican que se realice CTGO de 2 horas con una carga de glucosa de 75 g.

Sin embargo, la CTGO presenta diversas desventajas como múltiples extracciones sanguíneas y la administración de la carga de glucosa puede provocar náuseas y vómitos; dichos eventos provocan que la prueba no se lleve a cabo con éxito. No obstante, la principal desventaja de la CTGO es su realización entre las semanas 24 y 28 de gestación, descartando la ventana de oportunidad de hacer diagnóstico en el primer trimestre; en el cual se podría recibir un tratamiento temprano y apropiado para reducir las múltiples complicaciones a corto y largo plazo en la madre y en el neonato (Dias *et al.*, 2018; Chiefari *et al.*, 2017). Por lo tanto, la identificación de biomarcadores sensibles y específicos, que

puedan ofrecer posibilidades de diagnóstico temprano, se ha convertido en interés principal en la investigación de DMG (Dias *et al.*, 2018).

Los avances limitados en cuanto al diagnóstico para DMG en las últimas décadas, ha llevado a nuevos enfoques sobre las ciencias ómicas que son integradas por la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica como un campo potencial para ser explorado. La metabolómica es el estudio de múltiples tipos de pequeñas moléculas orgánicas en una muestra como: aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros productos que representan el funcionamiento metabólico de una célula, tejido u organismo. Los niveles de metabolitos y las perturbaciones fuera del rango normal podrían indicar procesos patológicos. La metabolómica tiene algunas ventajas sobre las otras ómicas ya que los metabolitos son el resultado final de las interacciones de genes, ácido ribonucleico (ARN) y proteínas y lo más cercano a la caracterización del fenotipo (Filla & Edwards, 2016; Hasin *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2019).

En la última década diversos estudios han abordado la problemática en cuanto al diagnóstico de la DMG. Bentley y col en 2015 encontraron niveles séricos de los metabolitos ácido antranílico, alanina, glutamato, alantoína y serina significativamente más altos en mujeres con DMG en el primer trimestre de gestación; sin embargo no se realizó la validación analítica para ser propuestos como candidatos a biomarcador (Bentley-Lewis *et al.*, 2015). Gao y col en 2016 estudiaron la asociación entre los perfiles séricos de ácidos biliares y el desarrollo de DMG en el segundo trimestre de gestación, encontrando que las mujeres embarazadas con DMG presentaban niveles elevados de ocho especies de ácidos biliares, incluidos 2 ácidos biliares dihidroxi conjugados, 1 ácido biliar trihidroxi conjugado y 5 ácidos biliares sulfatados (Gao *et al.*, 2016).

Por lo tanto, el presente proyecto propone un análisis metabolómico con enfoque dirigido de muestras séricas de mujeres con DMG para la búsqueda de candidatos a biomarcador en el primer trimestre de gestación, lo que permitiría realizar un diagnóstico oportuno de la enfermedad.

2. Antecedentes

2.1. Diabetes mellitus

La diabetes se identifica por integrar un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia (niveles elevados de glucosa) como un resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina o de ambas (Chiefari *et al.*, 2017). Por la progresión de la enfermedad, los niveles de hiperglucemia causarán diferentes afectaciones. En la hiperglucemia severa se presentan síntomas como poliuria, polidipsia, pérdida de peso, visión borrosa, susceptibilidad a infecciones y cetoacidosis. Una hiperglucemia crónica se asocia a un daño de largo plazo que provoca disfunción de diversos tejidos y órganos como: ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Roden, 2016). De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés) la diabetes mellitus en la actualidad se clasifica en 4 tipos:

La diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune crónica que se desarrolla debido a que el cuerpo no puede producir insulina como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas productoras de insulina, lo que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. En otras palabras, la DM1 se caracteriza por la incapacidad del cuerpo para producir insulina (Arneth *et al.*, 2019).

La diabetes tipo 2 (DM2) es el tipo más común de diabetes, se desarrolla debido a una pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β y su contexto es la resistencia a la insulina, causando una absorción reducida de glucosa en el torrente sanguíneo. Frecuentemente, el páncreas produce en exceso insulina en respuesta a la mayor cantidad de glucosa en el torrente sanguíneo (hiperinsulinemia compensatoria), pero debido a la incapacidad de los tejidos periféricos para metabolizar a la glucosa, el resultado es la hiperglucemia (American Diabetes Association, 2017; Eyth *et al.*, 2019).

La diabetes por causas específicas se deben a diversos motivos e incluye a la diabetes inducida por glucocorticoides, por tratamiento de VIH/SIDA, por trasplante de órganos, por enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística), por fármacos o sustancias químicas y por mutaciones en un solo gen (diabetes monogénica) (American Diabetes Association, 2017; Eyth *et al.*, 2019).

El cuarto tipo es la diabetes mellitus gestacional, la cual se describirá ampliamente en la siguiente sección.

2.2. Diabetes mellitus gestacional

2.2.1. Definición de diabetes mellitus gestacional

Un embarazo se asocia con resistencia a la insulina e hiperinsulinemia que pueden predisponer a ciertas mujeres a desarrollar diabetes. La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. Dicha definición no excluye la probabilidad de que la intolerancia a la glucosa no reconocida haya sido anterior al embarazo, es por ello, que el término hiperglucemia en el embarazo parece ser más apropiado, de acuerdo con lo sugerido recientemente por la Sociedad Endocrina (Alfadhli, 2015 ; Dias *et al.*, 2018). En 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó la recomendación que la hiperglucemia detectada por primera vez durante el embarazo se clasificará como diabetes mellitus en el embarazo o DMG (Alfadhli, 2015).

2.2.2. Incidencia de la diabetes mellitus gestacional

De acuerdo a las consideraciones más actuales, en el 2017 la Federación Internacional de Diabetes (FID), menciona que la DMG afecta aproximadamente al 14% de los embarazos alrededor del mundo, lo que anualmente representa aproximadamente a 18 millones de nacimientos (Ogurtsova *et al.*, 2017).

En México, no hay una incidencia nacional disponible. Sin embargo, diversos estudios de los últimos 30 años informaron una incidencia que oscila entre el 4% y más del 30%. Pero la comparación de sus hallazgos no se encuentra simplificada; ya que los diagnósticos en dichos estudios se sustentan en diferentes protocolos de detección y criterios de diagnóstico (Sosa-Rubi *et al.*, 2019; Dainelli *et al.*, 2018).

2.2.3. Cambios metabólicos en un embarazo normal

En el transcurso de un embarazo normal, el organismo de la mujer ha de transitar cambios fisiológicos que permiten ayudar al crecimiento del feto. Esto incluye modificaciones en: sistema respiratorio, sistema cardiovascular, sistema renal, hematológico y metabólico entre

otros. Referente a las modificaciones metabólicas una muy importante es la sensibilidad a la insulina que será diferente según los requisitos del embarazo (Plows et al., 2018). Ya que el desarrollo de resistencia a la insulina materna permite la asignación de nutrientes como la glucosa, para permitir el crecimiento y desarrollo fetal normal. La secreción de insulina de los islotes Langerhans aumenta en respuesta a la resistencia periférica a la insulina para mantener la normoglucemia en condiciones de ayuno (James-Allan et al., 2020).

Durante el embarazo temprano, la secreción de insulina aumenta y la sensibilidad a la insulina aumenta o no cambia, promoviendo la absorción de glucosa en las reservas de adiposidad, esto con el fin de prepararse para las demandas de energía del embarazo y durante esta primera fase la mayoría de los cambios son anabólicos como lo es el aumento progresivo del tejido adiposo. Conforme progresa el embarazo hay un aumento de hormonas locales y placentarias que implican a las siguientes: estrógeno, progesterona, leptina, cortisol, lactógeno placentario y hormona de crecimiento placentaria cada una con función específica para el desarrollo correcto del feto, pero que en conjunto promueven la resistencia a la insulina (Plows et al., 2018; Chiefari et al., 2017; Alfadhli, 2015).

Lo anterior da como resultado que la glucosa se encuentre ligeramente elevada en circulación sanguínea y además esta glucosa se pueda transportar fácilmente a través de la placenta para alimentar al feto. Conforme se acerca el final del embarazo prevalecen los cambios catabólicos como lo es el aumento de lipólisis, aumento de la glucemia, insulinemia y disminución de las reservas de grasa materna (Chiefari et al., 2017).

La evidencia en estudios sugiere que, para mantener la homeostasis de la glucosa las mujeres gestantes compensan estos cambios mediante hipertrofia e hiperplasia de las células β del páncreas, además de aumentar la secreción de insulina estimulada por glucosa (Figura 1a). La relevancia de las hormonas placentarias en este proceso se evidencia por el hecho de que la sensibilidad a la insulina materna regresa a niveles anteriores a los pocos días posteriores al parto (Mack & Tomich, 2017; Plows et al., 2018).

2.2.4. Fisiopatología de la diabetes mellitus gestacional

La DMG es causada por un desequilibrio que se presenta entre la resistencia a la insulina y la secreción de insulina durante el embarazo que, a lo largo del tiempo, se ha pensado que

ocurre cuando las células β pancreáticas no logran mantener el ritmo de la resistencia a la insulina (Figura 1b) cada vez mayor que ocurre durante la segunda mitad del embarazo. Como todas las formas de hiperglucemia, la DMG se caracteriza por una secreción de insulina que es insuficiente para satisfacer las demandas de glucosa. Por lo tanto, el embarazo representa una situación en la que la diabetes no diagnosticada, o mejor dicho la falla desconocida de las células β pancreáticas, se revela por la aparición fisiológica de resistencia a la insulina (Baz *et al.*, 2016; McCabe & Perng, 2017).

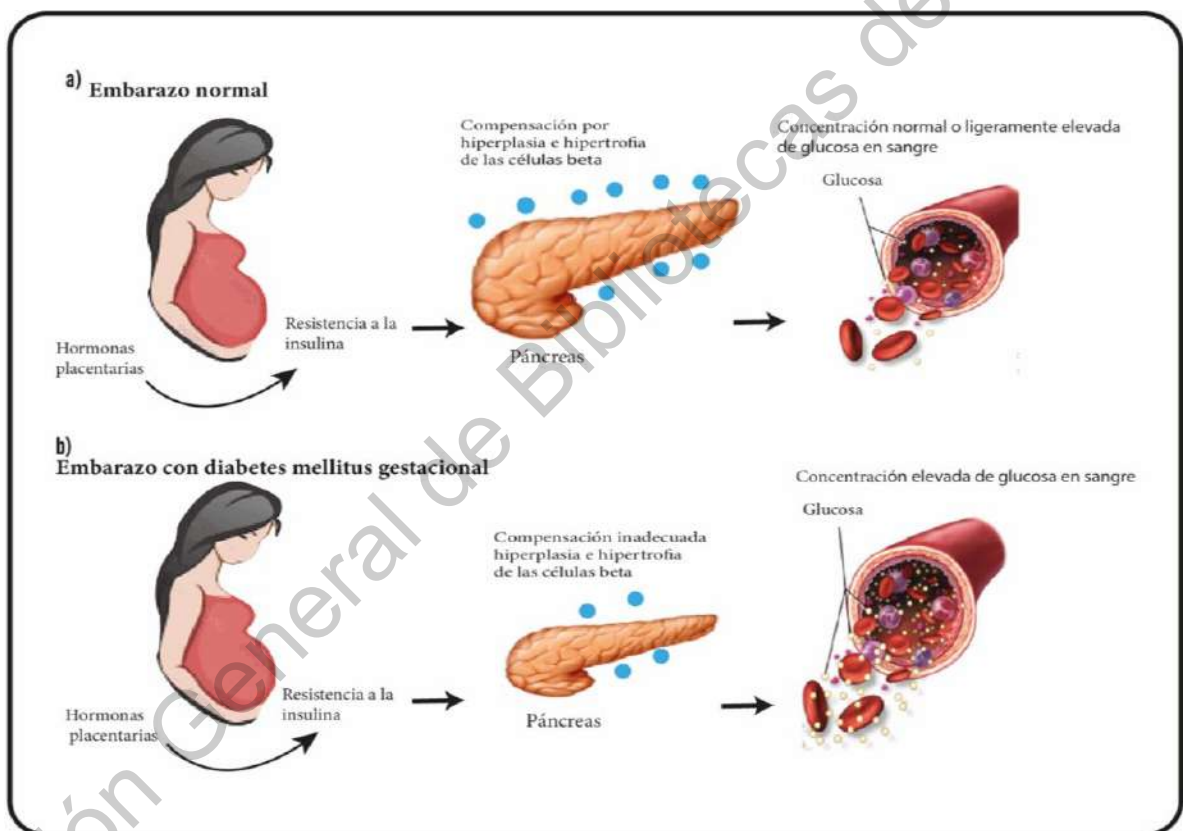


Figura 1. Resistencia a la insulina en embarazo normal y en embarazo con diabetes mellitus gestacional (Plows *et al.*, 2018).

2.2.4.1. Disfunción de las células β pancreáticas

Una célula β es una célula diferenciada con función de almacenar y secretar insulina en respuesta y regulada por la carga de glucosa, además de presentar la capacidad de adaptarse a los cambios de la demanda metabólica a través del aumento de la secreción de insulina y/o

el número de células. Cuando dichas células pierden esa capacidad de detectar de manera correcta la concentración de glucosa en la sangre o de liberar suficiente insulina, esto se clasifica como disfunción de las células β .

Dicha disfunción es el resultado de una producción excesiva y prolongada de insulina en respuesta al exceso crónico de glucosa. Sin embargo, los mecanismos exactos de la disfunción de las células β son complejos. Estos defectos pueden ocurrir en cualquier etapa del proceso: síntesis proinsulínica, modificaciones postraduccionales, almacenamiento de gránulos, detección de concentraciones de glucosa en sangre o la maquinaria compleja para la exocitosis de gránulos. Algo importante es que la mayoría de los genes de susceptibilidad implicados en la DMG están relacionados con la función de las células β , incluido el canal dependiente de voltaje de potasio tipo KTQ 1 (Kncq1) y glucoquinasa (Gck) (Benninger & Hodson, 2018).

2.2.4.2. Resistencia a la insulina crónica

La resistencia a la insulina se da cuando las células β no responden de manera apropiada a la insulina. A nivel molecular, la resistencia a la insulina suele ser un defecto en la señalización de la insulina, dando como resultado una translocación inadecuada del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) a la membrana plasmática, transportador responsable de internalizar la glucosa a la célula para que sea utilizada como sustrato de energía (Figura 2).

En la DMG, la tasa de absorción de glucosa estimulada por insulina disminuye en un 54% en comparación de un embarazo normal. La cantidad del receptor de insulina no se ve afectado; sin embargo, la resistencia a la insulina disminuye la fosforilación en tirosina o aumenta la fosforilación en serina/treonina del receptor de insulina. Además, la expresión alterada y / o la fosforilación de los reguladores de la señalización de la insulina, incluido el sustrato del receptor de insulina (IRS)-1, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y GLUT4, se ha descrito en la DMG (Catalano, 2014).

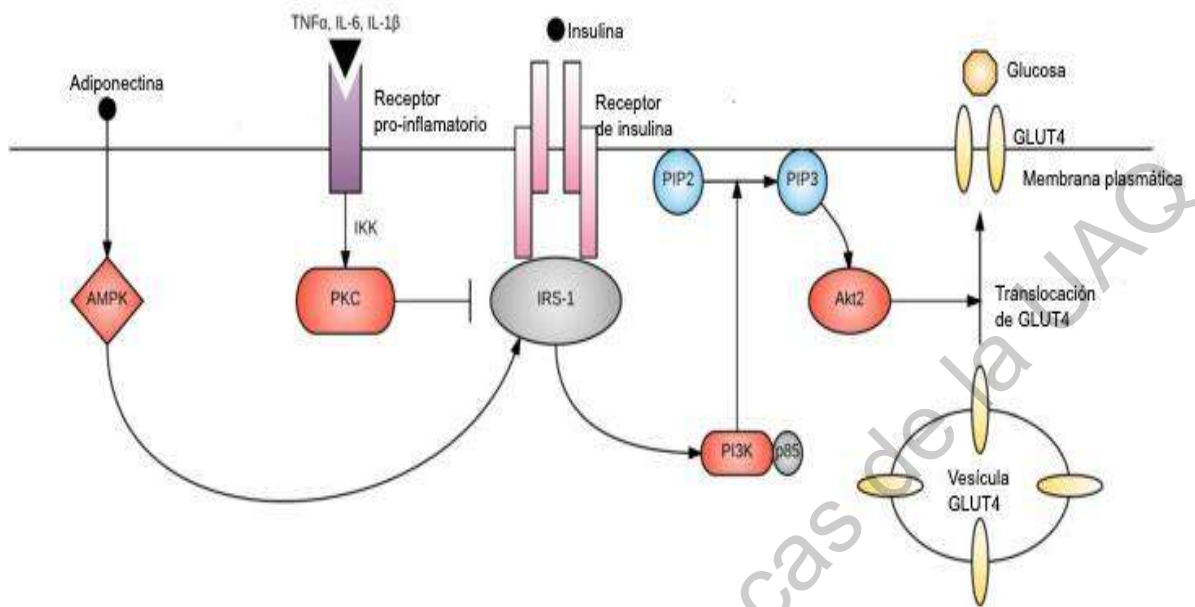


Figura 2. Diagrama de señalización de insulina (Plows et al., 2018).

2.2.4.3. Lactógeno placentario humano

El lactógeno placentario humano es una hormona liberada por la placenta durante el embarazo, la cual induce cambios metabólicos importantes durante el embarazo para apoyar el mantenimiento del estado nutricional fetal. Esta hormona es capaz de provocar alteraciones y modificaciones en los receptores de insulina. Las siguientes variaciones moleculares parecen participar con la disminución de la absorción de glucosa en los tejidos: 1) alteración molecular del receptor de insulina de la subunidad, 2) disminución de la fosforilación de la tirosina quinasa, 3) remodelaciones en el sustrato del receptor de insulina-1 y fosfatidilinositol 3-quinasa (Quintanilla Rodríguez & Mahdy, 2019).

2.2.4.4. Inflamación y adipocinas implicadas en embarazos con DMG

Entre la obesidad, la resistencia a la insulina y el desarrollo de DMG se ha reportado un nuevo vínculo, lo que tienen en común son las adipocinas. Estudios prospectivos han demostrado que la DMG está relacionada con la regulación negativa de adiponectina y citocinas anti-inflamatorias, tales como la interleucina (IL)-4 e IL-10 y la regulación positiva

de leptina y citocinas proinflamatorias, como IL -6 y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) (Lorenzo *et al.*, 2019a ; Abell *et al.*, 2015).

Las adipocinas siguientes: adiponectina, leptina, TNF- α y la proteína ligadora de ácidos grasos de adipocitos (AFABP) incrementan en la obesidad y el embarazo y son considerados claves en la fisiopatología de DMG (Fasshauer *et al.*, 2014).

2.2.4.4.1. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6)

TNF- α e IL-6 son citocinas producidas por monocitos y macrófagos del tejido adiposo que contribuyen a la resistencia a la insulina en el embarazo. TNF- α interfiere en la señalización de la insulina y en la función de las células β , contribuyendo directamente con la DMG. Los niveles aumentados de TNF- α e IL-6 se atribuyen al estrés oxidativo y los cambios inflamatorios por la hiperglucemia en la DMG. La expresión y los niveles de TNF- α en el tejido adiposo se correlacionan positivamente con la adiposidad y disminuyen cuando personas obesas tienen pérdida de peso. Mujeres con DMG presentan niveles elevados de TNF- α ; sin embargo, aún no es claro si dicha alteración se presenta debido al aumento de la adiposidad durante del embarazo o si es una consecuencia de la enfermedad (Fasshauer *et al.*, 2014).

2.2.4.4.2. Adiponectina

En el embarazo normal, la secreción de adiponectina materna disminuye progresivamente y sus niveles negativos están correlacionados con el IMC y la adiposidad. Niveles disminuidos de adiponectina (hipoadiponectinemia) potencia la resistencia a la insulina y se correlaciona con la disfunción de las células β (Wójcik *et al.*, 2014). Además, el ARNm de adiponectina también se encuentra regulado negativamente en el tejido placentario en mujeres con DMG y se considera que TNF- α y otros mediadores proinflamatorios secretados en DMG suprimen la transcripción de adiponectina por los adipocitos, empeorando la inflamación crónica de bajo grado (Abell *et al.*, 2015).

2.2.4.4.3. Leptina

La leptina es una hormona que juega un papel importante en la regulación del metabolismo de todo el organismo, ya que se ha demostrado que interviene en la secreción de insulina, internalización de la glucosa, síntesis de glucógeno y metabolismo de los ácidos grasos. La leptina es liberada en circulación por el tejido adiposo proporcionalmente a las reservas de lípidos.

La leptina puede contribuir a la fisiopatología DMG al suprimir la secreción de insulina de las células pancreáticas. Otros efectos de la leptina incluyen el control del apetito, el peso corporal, la composición corporal y el gasto de energía a través de los efectos sobre el hipotálamo, los cuales se encuentran involucrados en la fisiopatología de la DMG. El aumento de la síntesis de leptina en DMG amplifica la inflamación de bajo grado al estimular la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , lo que a su vez aumenta aún más la producción de leptina, contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina (Abell *et al.*, 2015).

2.2.5. Factores predisponentes para DMG

Los factores predisponentes que se encuentran reportados comúnmente asociados al desarrollo de DMG son obesidad, edad materna avanzada, antecedentes de DMG, antecedentes familiares de diabetes, pertenencia a grupos étnicos de alto riesgo (mujeres africanas, hispanas, indias y asiáticas), síndrome de ovario poliquístico, un historial de parto de un bebé con macrosomía (peso al nacer ≥ 4000 g), antecedentes de abortos recurrentes, antecedentes de muertes fetales inexplicables y antecedentes de hipertensión esencial o hipertensión relacionada con el embarazo (Alfadhli, 2015).

Cada uno de los factores predisponentes mencionados anteriormente están asociados directa o indirectamente con la función deteriorada de las células β y/ o la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, el sobrepeso y la obesidad están intrínsecamente relacionados con la ingesta excesiva y prolongada de calorías, lo que interfiere en la producción de insulina de las células β y las vías de señalización de la insulina (Figura 3). Inclusive independientemente del índice de masa corporal (IMC) y la ingesta calórica general, la dieta y la nutrición están

asociadas al desarrollo de DMG. Las dietas altas en grasas saturadas, carnes rojas y azúcares refinados se asocian constantemente con mayor riesgo de DMG (Bowers *et al.*, 2012).

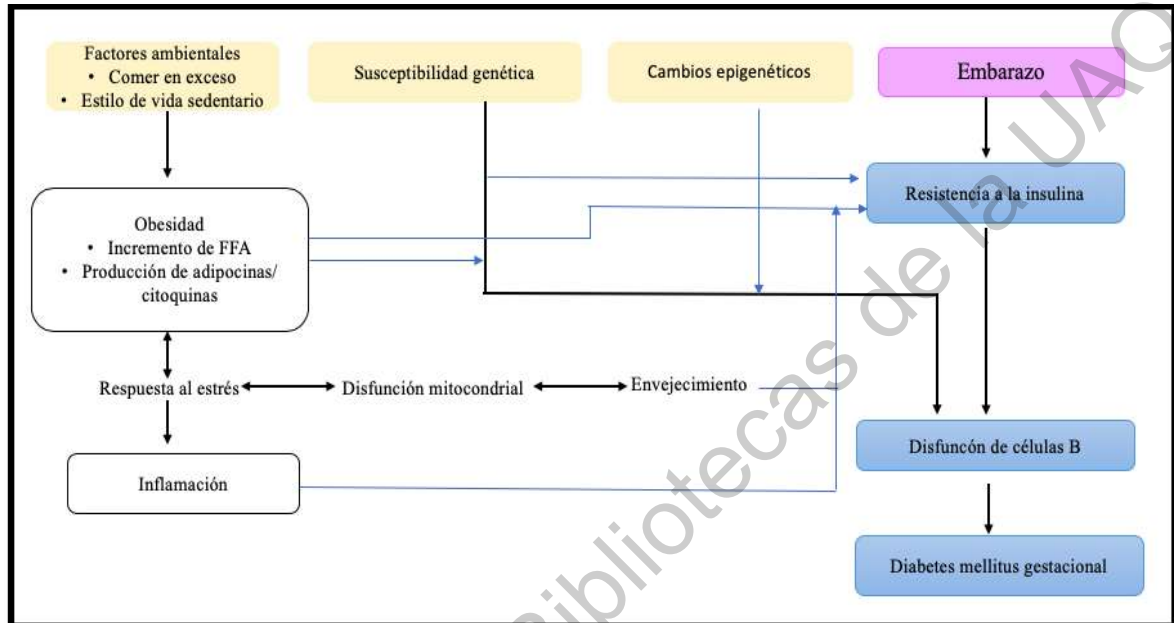


Figura 3. Factores patogénicos subyacentes a la DMG (Chiefari *et al.*, 2017).

2.2.6. Complicaciones por diabetes mellitus gestacional

2.2.6.1. Complicaciones neonatales e infantiles en la descendencia

La descendencia de madres con DMG podrían presentar diversas complicaciones a lo largo de su vida (Cuadro 1). Las complicaciones neonatales incluyen un alto riesgo de parto por cesárea, distocia de hombro y lesiones de nacimiento, las cuales normalmente se deben al peso corporal del feto. En la hipótesis de Pedersen (1954), que después fue ampliada por Freinkel (1980), se expone que el aumento del tamaño del feto es un resultado directo del exceso de glucosa materna circulante y otros nutrientes que atraviesan la placenta para proporcionar al feto sustratos de energía. El feto da respuesta a dichos sustratos de energía excesivos produciendo hiperinsulinemia fetal, que posteriormente conduce a una serie de consecuencias, en particular a un crecimiento fetal excesivo y el consiguiente aumento de edad gestacional (Szmuilowicz *et al.*, 2019).

Asimismo, la DMG incrementa el riesgo de desarrollar una hipoxia fetal en el útero, que puede ser la base del riesgo de muerte fetal y asfixia al nacer. Esta hipoxia induce una mayor producción de eritropoyetina y policitemia e hiperbilirrubinemia subsiguientes en el neonato. La hiperinsulinemia fetal altera la síntesis de surfactante pulmonar, y predispone al síndrome de dificultad respiratoria (Mitanchez *et al.*, 2015). Además, la hipoglucemia en el neonato puede hacerse presente porque el flujo materno constante de glucosa se detiene abruptamente durante el parto y la hiperinsulinemia fetal relativa continua y entonces utiliza los depósitos de glucosa neonatal (Szmuilowicz *et al.*, 2019).

En 2018, Lowe y col documentaron el hallazgo de adiposidad excesiva en los descendientes de DMG en la infancia (Lowe *et al.*, 2018). Las complicaciones a largo plazo son la resistencia a la insulina y la DM2, denominados en conjunto como trastornos del metabolismo de la glucosa.

Cuadro 1. Posibles resultados adversos en la descendencia expuesta a DMG.

Etapa de la descendencia	Posibles resultados adversos
Feto	Malformaciones, muerte fetal, corioamnionitis, asfixia al nacer, parto prematuro, macrosomía.
Neonato	Grande para la edad gestacional, lesiones al nacer, hipoglucemia, síndrome de dificultad respiratoria/ taquipnea transitoria, policitemia e hiperbilirrubinemia, hipocalcemia
Niño	Deficiencias en el desarrollo neurológico, obesidad, aumento de adiposidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa
Adulto	Obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2

(Szmuilowicz *et al.*, 2019).

2.2.6.2. Complicaciones en las mujeres embarazadas

El resultado más común en mujeres embarazadas por DMG es la cesárea. Otras complicaciones son trastornos hipertensivos como preeclampsia; que combina la hipertensión gestacional (al menos 140/90 mmHg por primera vez después de la mitad del embarazo) y proteinuria (≥ 0.3 g / 24 h); y una forma más crónica como lo es la eclampsia.

Comparando con la gestación sin anomalías metabólicas, la DMG está asociada con un incremento del 50% de riesgo de preeclampsia leve y grave (Szmuiłowicz *et al.*, 2019; Baz *et al.*, 2016). Además, existe un mayor riesgo de polihidramnios (presencia excesiva o aumento de líquido amniótico), lo que aumenta el riesgo de parto prematuro. Adicionalmente, las complicaciones para la madre con DMG a largo plazo incluyen obesidad, DM2 y enfermedades cardiovasculares (Hou *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2017).

2.2.7. Diagnóstico de DM preexistente

El diagnóstico de DM preexistente es establecido en las mujeres embarazadas antes de la semana 13 de gestación utilizando criterios estándar para DM2 en la población general (Cuadro 2). En la primera visita prenatal, asigne un diagnóstico de diabetes preexistente si alguno de los siguientes está presente: (American Diabetes Association, 2019).

Cuadro 2. Criterios para el diagnóstico de diabetes.

Prueba diagnóstica	Puntos de corte
Glucosa plasmática en ayunas	≥ 126 mg/dL (≥ 6.99 mmol/L)
Hemoglobina glicosilada (HbA1c)	$\geq 6.5\%$ (≥ 48 mmol/mol)
Glucosa en plasma aleatoria (confirmada por glucosa plasmática en ayunas o HbA1c)	≥ 200 mg / dL (≥ 11.1 mmol /L)

(American Diabetes Association, 2019).

2.2.8. Diagnóstico de DMG

Las pruebas de diagnóstico para DMG consisten en curvas de tolerancia a la glucosa oral (CTGO), la cual permite determinar la capacidad de una persona para manejar una carga de glucosa. Por lo tanto, la prueba puede mostrar si una persona puede metabolizar una cierta cantidad estandarizada de glucosa (Eyth *et al.*, 2019).

Para hacer un diagnóstico de DMG se utilizan diversos criterios, y hasta el día de hoy existe una falta de consenso entre los profesionales de la salud. De acuerdo con el estudio de

Hiperglucemia y Resultado Adverso del Embarazo (HAPO, por sus siglas en inglés), la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG, por sus siglas en inglés) propuso nuevos criterios para la realización del diagnóstico de DMG, los cuales fueron adoptados también por la OMS (Lowe *et al.*, 2018).

En dicho estudio, más de 25,500 mujeres embarazadas de 15 centros hospitalarios en 9 países accedieron a tener una CTGO de 2 h de 75 g a las 24 a 32 semanas (media 28) de gestación y a partir de ello tiene mayor uso la estrategia de un paso. El procedimiento de “un paso” consiste en la realización de una CTGO en la mañana después de un ayuno nocturno de 8 horas con 75 g de glucosa, realizando la medición de glucosa en plasma en ayunas, 1 hora y 2 horas post-carga a las 24-28 semanas de gestación. La DMG se diagnostica si al menos uno de los siguientes parámetros se encuentran alterados (Rani & Begum, 2016):

- Glucosa sérica en ayunas ≥ 92 mg/dL
- Glucosa sérica de 1 hora post carga ≥ 180 mg/dL
- Glucosa sérica de 2 horas post carga ≥ 153 mg/dL

Sin embargo, al solo requerir un valor alterado, la prevalencia de DMG ha aumentado y en algunos centros hospitalarios en distintos países siguen utilizando los criterios de dos pasos. El procedimiento de dos pasos consiste en administrar una carga de glucosa de 50 g independientemente de la última ingesta de alimentos en la semana 24-28 de gestación. Si la glucosa plasmática a la 1 h post-carga es ≥ 140 mg/dL, se debe realizar una segunda CTGO con una carga de 100 g de glucosa. El diagnóstico de DMG se realiza cuando dos o más de los siguientes parámetros se encuentran alterados (Cuadro 3)(Rani & Begum, 2016).

Cuadro 3. Detección y diagnóstico de DMG con estrategia de dos pasos.

	Carpenter-Coustan	NDGG
Ayuno	≥ 95 mg/dL	≥ 105 mg/dL
1 hora	≥ 180 mg/dL	≥ 190 mg/dL
2 horas	≥ 155 mg/dL	≥ 165 mg/dL
3 horas	≥ 140 mg/dL	≥ 145 mg/dL

NDGG: Grupo Nacional de Datos de Diabetes. (Rani & Begum, 2016)

La IADPSG sugiere evaluar a todas las mujeres embarazadas o evaluar solo a aquellas con factores de riesgo en la primera visita prenatal, mientras que la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) recomienda evaluar solo a aquellas con factores de riesgo. Ambas organizaciones recomiendan la CTGO de 2 h con 75 g para DMG a las 24–28 semanas de gestación en aquellos que aún no han sido diagnosticados con diabetes o DMG (Coustan, 2013).

Aunque la CTOG es aceptada como prueba diagnóstica para DMG por organizaciones internacionales, se pueden enumerar múltiples desventajas de realizar la CTOG como lo son las múltiples extracciones de sangre, náuseas y vómitos que interfieren en el cumplimiento de la prueba, carece de reproducibilidad, requiere de varias horas para llevar a cabo la prueba y lo más importante es su realización entre las semanas 24 y 28 de gestación, presentando como principal limitación la pequeña ventana de tiempo para implementar intervenciones para controlar la resistencia a la insulina durante la gestación (Renz *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2018).

2.2.9. Estudios sobre perfiles de riesgo para DMG

Los esfuerzos de investigación se enfocan en la detección o predicción de DMG en el primer trimestre de gestación, siendo que dicha prueba diagnóstica podría eventualmente integrarse en la práctica clínica dado que se recolecta sangre para otras evaluaciones durante el primer trimestre (McCabe & Perng, 2017). Existe una gran necesidad de investigaciones sobre posibles formas que se pueden utilizar para discriminar a las mujeres de embarazos normales y embarazos complicados por DMG.

Alanbay y col. (2012) en su investigación encontraron que la transpeptidasa de glutamil gamma (γ -GT) era mas alta en el grupo DMG siendo determinante para un factor de riesgo independiente, pero la especificidad de γ -GT para diagnosticar DMG fue sólo del 37% (Alanbay *et al.*, 2012).

Diversos estudios han indicado que las mujeres con DMG presentan niveles bajos de adiponectina, además de estar estrechamente asociados con las concentraciones de glucosa en la CTGO. Weerakiet y col. (2006) evaluaron si la adiponectina es un factor predictivo para

la DMG y si era apropiada como prueba de detección para la DMG, y llegaron a la conclusión que la adiponectina no era un predictor tan fuerte ya que el área bajo la curva ROC fue baja, presentando falta de sensibilidad y especificidad para identificar la diabetes mellitus gestacional (Weerakiet *et al.*, 2006).

2.3. Ciencias ómicas

Si bien es claro que hay avances en la comprensión de la patogénesis de diabetes, los biomarcadores que pueden reflejar efectivamente la función y masa de las células pancreáticas; así como el estado de resistencia a la insulina no tienen tan buena calidad. Por lo tanto, el apoyo en las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, metagenómica) ha ganado interés para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico. Un biomarcador es una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Strimbu & Tavel, 2010). En especial la metabolómica, la cual es una herramienta que día a día se abre paso para el descubrimiento de biomarcadores para distintas enfermedades metabólicas, ya que proporciona una huella digital fenotípica de un sistema biológico complejo, con capacidad única de medir miles de metabolitos en los sistemas biológicos. Además, la metabolómica presenta como ventaja la captura de cambios metabólicos relevantes para la enfermedad y para identificar biomarcadores de los procesos de la enfermedad (Gan *et al.*, 2019).

2.3.1. Metabolómica

La metabolómica se define como el estudio exhaustivo y amplio para análisis cualitativos y semicuantitativos de los metabolitos en células, tejido y/o biofluidos, conocidos de manera conjunta como metaboloma (Gan *et al.*, 2019). Los metabolitos se caracterizan por ser pequeñas moléculas menores a 1500 Dalton que incluyen aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, entre otros, que actúan como sustratos o productos del metabolismo, e intervienen en las funciones celulares esenciales, como la producción y el almacenamiento de energía o en la transducción de señales (Johnson *et al.*, 2016; Kind *et al.*, 2018).

En las últimas décadas, la metabolómica ha estado continuamente involucrada en la identificación de biomarcadores, la aclaración de la vía metabólica, el diagnóstico y la evaluación del tratamiento. Al momento de realizar metabolómica, existen plataformas de investigación, como la resonancia magnética nuclear (RMN), la cromatografía de gases junto con la espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida junto con la espectrometría de masas (LC-MS) todos con excelentes cualidades y ciertas limitaciones. En particular, la espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuádruplo de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC/Q-ToF) es una técnica robusta para lograr una separación efectiva, detección sensible, buena reproducibilidad del tiempo de retención, amplio rango dinámico y cobertura de amplia diversidad química, y es capaz de analizar de forma simultánea y precisa una gran cantidad de sustancias metabólicas (T. Liu *et al.*, 2016) .

Existen dos enfoques en los que generalmente se divide la metabolómica, en no dirigidos (perfil global) o dirigidos (el análisis de un conjunto de compuestos definido). Ambos utilizan detectores universales como la espectrometría de masas (MS) o la resonancia magnética nuclear (RMN). Un enfoque no dirigido tiene el objetivo de capturar tantas características de metabolitos como sea posible. Estos conjuntos de gran cantidad de datos se utilizan para comparar estados normales y de enfermedad, para posteriormente realizar la identificación de las características de metabolitos de interés. La principal característica de este enfoque es su capacidad de descubrir metabolitos nuevos y potencialmente relevantes. Por otro lado, la metabolómica dirigida tiene el objetivo de analizar un conjunto de compuestos, regularmente aquellos dentro de la misma vía metabólica o que tienen similitud estructural. Aunque su alcance es limitado ya que solo se identifican los metabolitos de interés que se plantean en la búsqueda, la metabolómica dirigida ofrece la comprensión profunda de una parte del metaboloma (Filla & Edwards, 2016).

El proceso de la metabolómica implica diversos pasos como: preparación de la muestra, extracción de metabolitos, separación cromatográfica e identificación de metabolitos.

2.3.1.1. Extracción de metabolitos

Los metabolitos poseen propiedades fisicoquímicas muy diversas y, por lo tanto, no pueden ser extraídos por un solo disolvente. Los diferentes estudios reportan adaptaciones del método de extracción de lípidos Bligh y Dyer para utilizar fracciones polares y no polares (Bligh & Dyer, 1959). Los métodos de extracción de metabolitos incluyen pasos para la precipitación de proteínas, extracción de metabolitos (usualmente en solo paso para ambas fracciones) y filtración. El disolvente empleado comúnmente para precipitar proteínas es el acetonitrilo, y los disolventes utilizados para extraer los metabolitos son metanol, agua y cloroformo (Abbiss *et al.*, 2019).

2.3.1.2. Separación cromatográfica

Las técnicas de separación cromatográfica de los analitos antes de la detección tienen como objetivo reducir la complejidad de los espectros, ya que reduce la interferencia de los picos vecinos y permite la identificación de los metabolitos al facilitar información del tiempo de retención para cada compuesto. No obstante, no siempre es posible resolver todos los picos, especialmente en análisis no dirigidos. La cromatografía acoplada a espectrometría de masas se ha utilizado ampliamente en la investigación metabolómica (Abbiss *et al.*, 2019).

2.3.2. Estudios metabolómicos en DMG

En los estudios de DMG se emplean diferentes tipos de muestras biológicas, la sangre (suero o plasma) materna es la muestra más utilizada, debido a que es de fácil obtención, el volumen de sangre es regulado y la variación entre individuos es relativamente pequeña, y proporciona una instantánea del estado metabólico en el momento del muestro (X. Mao *et al.*, 2017). En la última década diversos autores han realizado estudios metabolómicos para DMG con variación en el tiempo de gestación (primer, segundo y/o tercer trimestre) y en los objetivos de dichos estudios (Cuadro 4).

En cuanto a la detección temprana (primer trimestre), Qiu y col. (2014) en su investigación de alteraciones metabólicas tempranas urinarios en mujeres embarazadas con DMG, encontraron que las alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos podrían ser detectables a las 16 semanas de gestación, obteniendo resultados consistentes con otros

estudios realizados en hombres y mujeres no embarazadas con hiperglucemia o DM2. Sin embargo, no se realizó la propuesta como biomarcadores de diagnóstico (Qiu *et al.*, 2014).

Makgoba y col. (2011) no encontraron evidencia de una asociación entre los niveles maternos del primer trimestre de 25-hidroxivitamina-D y el desarrollo posterior de DMG en muestras de suero sanguíneo de 248 mujeres embarazadas. De manera similar, Baker y col. (2012) no encontraron una asociación entre la deficiencia de vitamina D en el primer trimestre y el desarrollo de DMG (Makgoba *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2012).

Bentley y col. (2015) encontraron que los niveles séricos de ácido antranílico, alanina, glutamato, alantoína y serina fueron significativamente más altos en mujeres con DMG en el primer trimestre de gestación, mientras que los niveles séricos de creatinina fueron más bajos en comparación con mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa. No obstante, no se realizó el análisis y la propuesta de dichos metabolitos como candidatos a biomarcador de DMG (Bentley-Lewis *et al.*, 2015).

Gao y col. (2016) estudiaron la asociación entre los perfiles séricos de ácidos biliares y el desarrollo de DMG, encontrando que las mujeres embarazadas con DMG presentaban niveles elevados de ocho especies de ácidos biliares, incluidos 2 ácidos biliares dihidroxi conjugados, 1 ácido biliar trihidroxi conjugado y 5 ácidos biliares sulfatados. El ácido β -muricólico mostró un área bajo la curva (AUC por sus siglas en inglés) de 0.098, una sensibilidad de 92.1% y especificidad de 96.3%; mientras que el di-2 con un AUC de 1.00 una sensibilidad de 100% y especificidad de 100% son adecuados para usarse como marcadores metabólicos para el diagnóstico y el diagnóstico diferencial de la DMG, respectivamente. No obstante, estos buenos resultados son en el segundo trimestre de gestación (Gao *et al.*, 2016).

Law y col (2017) encontraron en su estudio longitudinal, en muestras de plasma sanguíneo varios fosfolípidos poliinsaturados o modificados químicamente fueron más bajos en mujeres embarazadas que desarrollaron DMG versus controles sanos. Así mismo que la reducción de estos lípidos en las mujeres que desarrollan la enfermedad podrían ser detectados desde el primer trimestre y los cambios fueron independientes de la etapa de gestación y las hormonas esteroides en el plasma (Law *et al.*, 2017).

Cuadro 4. Estudios metabólicos de DMG

Muestra biológica (plataforma analítica)	Cambios significativos en los metabolitos relacionados con el desarrollo de DMG	Diagnóstico de DMG	Trimestre de gestación	Casos	Controles	Autor y año
Orina materna (LC-MS)	Etilmalonato, adipato, piruvato	ADA	1°	25	25	(Qiu <i>et al.</i> , 2014)
Suero materno (HPLC-MS/MS)	Ninguno (no se encontró que la 25-hidroxivitamina D tuviera asociación con DMG)	OMS-1999	1°	90	158	(Makgoba <i>et al.</i> , 2011)
Suero materno (LC-MS)	Ninguno (la deficiencia de vitamina D no se asoció con DMG)	NDDG	1°	60	120	(Baker <i>et al.</i> , 2012)
Suero materno (LC-MS)	Ácido antranílico alanina, glutamato, serina, alantoína, creatinina	Carpenter y Coustan	1°	96	96	(Bentley-Lewis <i>et al.</i> , 2015)
Suero materno (UPLC-MS)	8 especies de ácidos biliares, incluyendo di- y trihidroxi conjugados y sulfatados	IADPSG	2°	38	27	(Gao <i>et al.</i> , 2016)
Plasma materno (UPLC-MS)	Fosfolípidos poliinsaturados	IADPSG	1°, 2° y 3°	27	34	(Law <i>et al.</i> , 2017)

3. Justificación

En México, la diabetes mellitus gestacional (DMG) presenta una prevalencia que varía de 8.7% a 17.7 %. Es una de las complicaciones más comunes en el embarazo, asociada a trastornos hipertensivos en la madre durante el embarazo, parto por cesárea; desarrollo futuro de síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Para la descendencia, la DMG es un factor principal para el desarrollo de macrosomía, hipoglucemia neonatal, entre otras complicaciones. Es por ello por lo que es de suma importancia la identificación de las mujeres con DMG, con el fin de implementar estrategias de tratamiento oportunas para minimizar las complicaciones maternas, fetales y neonatales. Actualmente, el diagnóstico clínico de la DMG se realiza durante el segundo trimestre (24-28 semanas) de gestación mediante una curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO), la cual presenta múltiples desventajas. Motivo por lo que existen diversas investigaciones científicas enfocadas en identificar pruebas diagnósticas oportunas de DMG que puedan ser empleadas a partir del primer trimestre de gestación. En este sentido, se observa un creciente interés en el uso de las ciencias ómicas para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico. Las ciencias ómicas, en especial la metabolómica, ofrecen una forma de estudiar, identificar y clasificar los diferentes estados fisiológicos de enfermedades metabólicas, como la resistencia a la insulina y la diabetes. Se han identificado alteraciones en metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos, fosfolípidos y ácidos biliares asociados al desarrollo de DMG a lo largo del embarazo; sin embargo, aún no se cuenta con un biomarcador de diagnóstico temprano de dicha enfermedad ya que los biomarcadores deben cumplir con diversas características como reproducibilidad, sensibilidad, especificidad y en la mayoría de los estudios el objetivo ha sido comparar si difiere el perfil metabolómico entre el grupo con frente al grupo sin DMG. Por lo tanto, el presente proyecto propone el análisis metabolómico dirigido a metabolitos de clase de glicerofosfolípidos y ácidos grasos en muestras séricas de mujeres embarazadas en el primer trimestre de gestación para la propuesta y validación analítica de candidatos a biomarcador de diagnóstico temprano de DMG. Así como evaluar su comportamiento durante la progresión del embarazo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Realizar análisis metabolómico, con enfoque dirigido, de muestras séricas de mujeres mexicanas embarazadas como propuesta de nuevas herramientas de diagnóstico de diabetes mellitus gestacional y evaluar su comportamiento en la progresión del embarazo.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar los cambios en los perfiles metabolómicos de muestras séricas de mujeres sin y con diabetes mellitus gestacional en el primer trimestre de gestación por medio de un enfoque dirigido.
- Identificar metabolitos séricos candidatos a biomarcador para el diagnóstico oportuno de diabetes mellitus gestacional y evaluar su comportamiento durante la progresión del embarazo.
- Realizar la validación analítica de los metabolitos candidatos a biomarcador a través de la estimación estadística de su sensibilidad y especificidad analítica.

5. Metodología

5.1. Diseño del estudio

El diseño del estudio es de cohorte. Además, el estudio presenta las siguientes características: observacional, longitudinal y comparativo de dos grupos: mujeres embarazadas sin DMG y mujeres embarazadas con DMG. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (CBQ20/059) (Anexo A).

5.2. Definición del universo de estudio

Población de mujeres mexicanas embarazadas que asistieron a consultas prenatales en el Hospital del Niño y la Mujer en Querétaro, Querétaro en el periodo de mayo 2018 a noviembre 2019 y que decidieron participar en el estudio.

5.2.1. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se determinó utilizando la fórmula para población finita.

$$n = \frac{NZ_{\alpha}^2 pq}{d^2 (N-1) + Z_{\alpha}^2 pq} \quad n = \frac{42231 (1.96)^2 (0.13)(0.87)}{0.05^2 (42231-1) + 1.96^2 (0.13)(0.87)} \quad n = \frac{18348.7343}{106.0094} \quad n = 173$$

$$\text{Tasa de deserción } 15\% = n = \frac{173}{100} \times 15 = 26 + 173 = 199$$

En donde n=tamaño de muestra, N=total de la población acorde a la prevalencia de mujeres embarazadas en el estado de Querétaro la cual es de 42231 de acuerdo con los datos del INEGI en 2014), $Z_{\alpha}=1.96$, p=proporción esperada de acuerdo con la prevalencia en México de DMG que es del 13%, por lo que $p=0.13$, q=proporción de la población que no presenta el fenómeno estudiado ($q=0.87$), d=precisión o error muestra (5%, $d=0.05$). Como resultado se estimó un tamaño de muestra de $n=173$ mujeres embarazadas. Considerando una tasa de deserción aproximada de 15%, el tamaño de muestra mínimo fue de $n=200$ mujeres embarazadas.

5.2.2. Criterios de inclusión

Mujeres mexicanas embarazadas, de 18 a 40 años, con asistencia a visitas prenatales en el Hospital del Niño y la Mujer en Querétaro, Querétaro y que se encontraban en el primer trimestre de gestación (11-14 semanas de gestación).

5.2.3. Criterios de exclusión

Embarazo múltiple, diagnóstico de daño renal, hipertensión arterial, hepatitis B, desórdenes del sistema inmune y daño hepático.

5.2.4. Criterios de eliminación

Participantes que presenten en el transcurso del estudio los criterios de exclusión, que decidan cambiar de hospital, que no regresen a las siguientes visitas prenatales o que decidan abandonar voluntariamente el estudio.

5.3. Definición de variables

La definición de variables se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Variables y unidades de medida.

Variable	Unidades de medida
Peso	kg
Talla	m
IMC	kg/m ²
Glucosa en ayunas	mg/dL
CTGO Glucosa de 1 h	mg/dL
CTGO Glucosa de 2 h	mg/dL
Colesterol total	mg/dL
Colesterol HDL	mg/dL
Colesterol LDL	mg/dL
Colesterol VLDL	mg/dL

Triglicéridos	mg/dL
Insulina	UI/mL
Metabolitos	UA

UA: Unidades arbitrarias, UI: Unidades internacionales

5.4. Proceso de reclutamiento

El proceso de reclutamiento para la obtención de muestras biológicas fue realizado en el Hospital del Niño y la Mujer de Querétaro, Qro. por la Q.F.B Claudia Briones Hernández y Q.F. B. Samantha Arias Covarrubias en un período comprendido de mayo 2018 a noviembre de 2019.

En el primer trimestre de gestación (11-14 semanas de gestación) se realizaron las cuestiones siguientes:

- Firma del consentimiento informado (Anexo B)
- Recolección de datos personales y antecedentes familiares
- Medición antropométrica (altura y peso)
- Toma de muestra sanguínea venosa para análisis bioquímico y metabólico

En el segundo trimestre (24-28 semanas de gestación) se realizaron las cuestiones siguientes:

- Prueba diagnóstica para DMG con los criterios de la IADPSG
- Medición antropométrica (altura y peso)
- Toma de muestra sanguínea venosa para el análisis bioquímico y metabólico

En el tercer trimestre de gestación (30-33 semanas de gestación) se realizaron las cuestiones siguientes:

- Medición antropométrica (altura y peso)
- Toma de muestra sanguínea venosa para el análisis bioquímico y metabólico

5.5. Toma de muestras biológicas

Durante cada visita trimestral prenatal, se tomaron muestras de sangre por punción venosa, con un ayuno de 12 horas, obteniendo 5 ml de sangre en tubos sin anticoagulante con gel separador de suero. Con 30 min de espera para permitir la coagulación de la sangre, el paso

siguiente fue centrifugar la muestra para separación del suero. Las muestras de suero fueron almacenadas a -80 °C. El manejo de los residuos peligrosos biológico-infeccioso se realizó siguiendo las recomendaciones de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Anexo C).

5.6. Determinación de medidas antropométricas

Las medidas antropométricas como peso, talla e índice de masa corporal (IMC) de cada participante fueron determinados de la siguiente manera:

- **Peso.** Los participantes se encontraban con ropa ligera, en ayunas y fueron pesados en una balanza de uso clínico con un rango de medición de 0-150 kg.
- **Talla.** En esta determinación fue importante una postura correcta la cual consistió que el participante estuviera parado de frente al medidor, la espalda recta, erguido con hombros abajo, los talones juntos, los brazos a los costados y holgados, sin ejercer presión, con la cabeza firme y manteniendo la vista al frente en un punto fijo.
- **Índice de masa corporal (IMC)** Se calcula dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros ($IMC = \text{peso [kg]} / \text{estatura [m]}^2$). Antes de un embarazo el índice de masa corporal clasifica a las personas en cuatro grupos: bajo peso, peso normal, sobrepeso y obesidad. Durante el embarazo hay pautas en cuanto al aumento de peso gestacional (GWG, por sus siglas en inglés).

Se realizó la identificación del estado nutricional pregestacional de las participantes de acuerdo con las pautas del Instituto de Medicina (Cuadro 6).

Cuadro 6. Pautas de aumento de peso gestacional Instituto de Medicina (OIM)

Clasificación	IMC	Aumento de peso	Rango de GWG	Rango de GWG (kg)
	antes del embarazo (kg/m ²)	materno total recomendado (kg)	(kg) en las primeras 13 semanas	por semana en 2 ^{do} y 3 ^{er} trimestre
Bajo peso	<18.5	12.5-18.0	0.5-2.0	0.44-0.58
Peso normal	18.5-24.9	11.5-16.0	0.5-2.0	0.35-0.50
Sobrepeso	25.0-29.9	7.0-11.5	0.5-2.0	0.23-0.33
Obesidad	≥30.0	5.0-9.0	0.5-2.0	0.17-0.27

GWG: Aumento de peso gestacional- (Merck et al., 2015).

5.7. Determinación de perfil bioquímico

5.7.1. Determinación de la concentración de glucosa en suero

La determinación de la concentración de glucosa en suero se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Químicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Donde se empleó la técnica de kit enzimático colorimétrico de punto final (Pointe Scientific) utilizando un equipo automatizado, con los controles de calidad correspondientes.

5.7.2. Determinación del perfil de lípidos en suero

La determinación del perfil de lípidos en sangre se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Químicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Donde se empleó la técnica de kit enzimático colorimétrico de punto final (Pointe Scientific) utilizando un equipo automatizado. Se realizó la determinación de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (c-HDL) y triglicéridos, con los controles de calidad correspondientes. Las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (c-VLDL) se obtienen mediante cálculos con la fórmula de Friedewald la cual es la siguiente: $c\text{-LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicéridos}/5) - c\text{-HDL}$ y el $c\text{-VLDL} = (\text{Triglicéridos}/5)$ (Friedewald *et al.*, 1972) .

5.7.3. Determinación de insulina en suero

La determinación de insulina en suero se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Químicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Por medio del método de quimioluminiscencia utilizando un equipo automatizado (Cobas e 411), con los controles de calidad correspondientes.

5.8. Diagnóstico de DMG

El diagnóstico en las participantes fue realizado en la semana 24-28 de gestación de acuerdo con las pautas que recomiendan la ADA y la OMS del IADPSG, que consistió en realizar una prueba de tolerancia a la glucosa con una carga de 75 g de glucosa.

Se tomó la primera muestra sanguínea después de un ayuno de 8 horas, posteriormente se realizó la segunda extracción de muestra sanguínea a la hora siguiente de que la paciente

terminó su carga de glucosa y por último se realizó la tercera extracción de la muestra sanguínea a las 2 horas de la carga de glucosa. Las muestras fueron llevadas para su análisis a la Unidad de Servicios Químicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro para la determinación de la concentración de glucosa y se asignó el diagnóstico de DMG si uno de los valores estaba alterado de acuerdo con el Cuadro 7.

Cuadro 7. Criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus gestacional por medio de la estrategia de un paso.

Parámetro*	Glucosa (mg/dL)
Glucosa en ayuno	≥ 92 mg / dL
Glucosa de 1 h poscarga	≥180 mg / dL
Glucosa de 2 h poscarga	≥153 mg / dL

*Prueba de tolerancia oral a la glucosa con una carga de 75 g (Rani & Begum, 2016).

5.9. Perfil metabólico

5.9.1. Extracción de los metabolitos

El flujo experimental para la extracción de metabolitos de cada muestra de suero sanguíneo fue el siguiente (Yannell *et al.*, 2018): en un tubo eppendorf cónico de 2 mL se agregaron 80 µL de suero sanguíneo, 200 µL de cloroformo (disolvente orgánico no polar) y 360 µL de metanol (disolvente orgánico polar). Dicho tubo se colocó en el agitador vórtex por 30 segundos. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo y 200 µL de agua (disolvente orgánico polar) y por segunda ocasión se colocó el tubo en el agitador vórtex por 60 segundos, el paso siguiente fue el proceso de centrifugación a 8 000 rpm por 60 minutos; al finalizar dicho proceso se logró visualizar tres fases: la superior incolora que corresponde a los metabolitos polares; la fase intermedia de color blanco a proteínas; y la fase inferior incolora a los metabolitos no polares como se muestra en la Figura 4.

Las proteínas fueron descartadas ya que no son necesarias para el análisis metabólico. La fase polar y no polar fueron recolectadas de manera independiente en tubos cónicos de 2 mL y se evaporó el disolvente (SpeedVac, ThermoFisherScientific) a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente fue resuspendida la fase polar agregando 300 µL de metanol.

Las muestras fueron sonicadas por 10 minutos y centrifugadas por 10 minutos a 12 000 rpm. Finalmente, se recolectó el sobrenadante y fue transferido a un inserto de 250 μ L que tiene la función de facilitar el análisis de pequeños volúmenes de muestra. Dicho inserto fue colocado dentro de un vial de cromatografía para su posterior análisis.

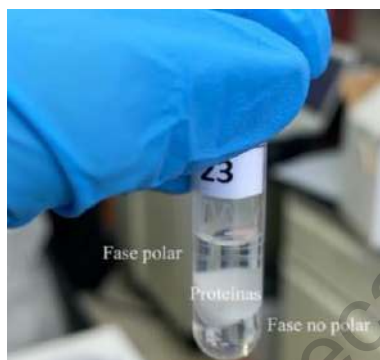


Figura 4. Extracción de metabolitos; separación de fases.

5.9.2 Método UPLC-MS para análisis metabolómico

El análisis metabolómico longitudinal fue llevado a cabo en un equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) (Waters), con un espectrómetro de masas de cuádrupolo con tiempo de vuelo que funciona en modo MS^E (QToF MS^E , (Vion). Para la separación cromatográfica de los diversos analitos se utilizó una columna BEH C18 (2.1x 100 mm, 1.7 μ m), con un programa de elución de gradiente (Cuadro 8). La fase móvil fue A) Agua con 0.1% de ácido fórmico. B) acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. La fase móvil fue administrada a una velocidad de flujo de 0.4 mL/ min, inicialmente con 5% de B y 95% de A hasta el minuto 2, seguido de un gradiente de 95% B y 5% A hasta el minuto 25 para finalmente terminar la ejecución cromatográfica 5% B y 95% A. La temperatura de la columna se ajustó a 35 °C. El volumen de inyección fue de 2 μ L. Se hizo funcionar el espectrómetro de masas en modo de iones negativos (ESI-), con energía de colisión de baja energía de 6 eV y energía de colisión de alta energía 15-45 eV; el voltaje de capilar de 2 -3.5 kV y el voltaje de cono de 40 V. Se llevó a cabo la corrección de masas durante el análisis

de cada muestra la introducción a la interfaz LockSpray de leucina/enkefalina con 200 pg cada 5 min.

Cuadro 8. Programa de elución de gradiente

Tiempo (min)	0	2	22	25	27	30
Fase A	95%	95%	5%	5%	95%	95%
Fase B	5%	5%	95%	95%	5%	5%

5.9.3 Adquisición de datos e identificación de metabolitos

Los cromatogramas fueron adquiridos y se realizó la corrección de masas en el software UNIFI. Además, se contaba con métodos de análisis en el software de UNIFI para glicerofosfolípidos y acilos grasos, que coinciden con la colección de Human Metabolome Database (HMDB), las muestras fueron sometidas a estos métodos de análisis donde eran conocidos, su fórmula química, su tiempo de retención esperado y su relación m/z esperada, dichos parámetros permitieron la identificación de metabolitos.

5.10 Análisis estadístico

Para el análisis metabolómico dirigido, la matriz de datos que incluía 81 metabolitos identificados previamente en el Software UNIFI, fue procesada en la plataforma web MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), de manera predeterminada los valores faltantes fueron reemplazados por 1/5 de los valores positivos mínimos de sus variables correspondientes, normalizando los datos por suma y transformándolos en raíz cúbica y así poder realizar el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA). Posteriormente se obtuvieron la Importancia de la variable en la proyección (VIP) de cada metabolito y fueron seleccionadas VIP con valor >1.0, dicho parámetro permitió identificar los metabolitos que discriminaron entre grupos de estudio; es decir aquellos metabolitos posibles como candidatos a biomarcador. Para realizar el análisis univariado de las determinaciones bioquímicas se utilizó el software Prism de GraphPad y la significancia estadística se definió como $p < 0.05$. La validación estadística de los candidatos a biomarcador se realizó utilizando un modelo logístico de construcción de curvas ROC para

la estimación de sensibilidad y especificidad analítica. El módulo de análisis de biomarcadores de MetaboAnalyst 4.0 se utilizó para el análisis de características operativas del receptor (ROC).

6. Resultados y discusiones

6.1. Reclutamiento

En el primer trimestre de gestación (11-14 semanas de gestación) fueron reclutadas 200 mujeres embarazadas en un periodo comprendido de mayo 2018 a noviembre 2019; no obstante, solo 117 mujeres regresaron a su participación al segundo trimestre (24-28 semanas de gestación) durante la esta segunda visita se realiza el diagnóstico utilizando los criterios de la IADSPG, se observó una tasa de deserción del 41.5%. En cuanto a la incidencia esta fue de 23.93%, ya que de las 117 mujeres embarazadas 28 mujeres desarrollaron DMG, siendo acorde a lo reportado para México donde en los últimos 30 años se informa una incidencia que oscila entre el 4-30% (Sosa-Rubi *et al.*, 2019). Para el tercer trimestre solamente completaron su participación 83 mujeres, observándose una tasa de deserción del 58.5 %. Se presentaron diversas causas de no retorno al estudio entre las que se encuentran como primer causa falta de transporte al hospital (45.20%), falta de interés de continuar con la participación (39.3%), complicaciones con el embarazo (11.96%) y abortos (3.41%). Debido a que el grupo sin DMG incluye a todas aquellas mujeres embarazadas que presentaron un resultado negativo a la prueba de la curva de tolerancia oral a la glucosa; por lo tanto, es un grupo altamente heterogéneo, ya que se podrían incluir mujeres con factores de riesgo como resistencia a la insulina, sobrepeso y obesidad. Es por ello, que se realizó un cribaje del grupo sin DMG para excluir aquellas participantes que presentaban resistencia a la insulina (índice de resistencia a la insulina (HOMA IR) >1.6 (Reyes-Muñoz *et al.*, 2017); así como aquellas participantes que presentaron sobrepeso u obesidad (IMC pregestacional >25 kg/m² (Merkx *et al.*, 2015). Por todo lo anterior, el tamaño de muestra al final fue de 31 mujeres embarazadas, de las cuales 19 mujeres fueron diagnosticadas con DMG y 12 sin DMG, las cuales cumplieron con todos los criterios de inclusión/exclusión y concluyeron su participación en el estudio en los tres trimestres de gestación.

6.2. Historia clínica de las mujeres embarazadas con DMG y sin DMG

Las características clínicas de los grupos de estudio se presentan en el Cuadro 9. Para las semanas de gestación no hubo diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tres trimestres. Las mujeres con DMG comenzaron su participación semana 12.5 de gestación y las mujeres sin DMG en la semana 12.6 de gestación. En el segundo trimestre momento en que se realiza la prueba diagnóstica la media fue semana 25.5 para el grupo con DMG y semana 26.1 para el grupo sin DMG.

Entre los dos grupos de estudio para partos, cesáreas, abortos y antecedente de DMG en embarazos anteriores al actual no se presentó diferencia estadísticamente significativa. Las características que presentaron diferencia estadísticamente significativa fueron la edad materna, el IMC, la gravidez y antecedentes de familiares directos con DMG2.

La edad materna presentó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudios ($p=0.0091$), observando que la edad materna en el grupo con DMG fue 1.21 veces más grande que en el grupo sin DMG. Se ha reportado que la edad materna avanzada (>35 años) es un factor predisponente para el desarrollo de DMG; sin embargo, solo una participante del grupo con DMG presentó edad materna >35 años. No obstante, actualmente se ha reportado que la edad de aparición de DMG ha disminuido, lo que resulta en un mayor número de mujeres con DMG en edad reproductiva (Nanditha *et al.*, 2016). Lorenzo y col. (2019) reportan que la edad materna avanzada conlleva a una pérdida de la expansión/plasticidad de las células β , por lo que disminuye la respuesta adaptativa de los islotes pancreáticos y aumenta la susceptibilidad para el desarrollo de DMG (Lorenzo *et al.*, 2019b).

El IMC fue estadísticamente significativo previo al embarazo (pregestacional; $p<0.0001$) y durante los tres trimestres de gestación ($p<0.0001$, $p=0.0003$ y $p=0.0002$); sin embargo, esto es consecuente del uso del criterio de exclusión de IMC >25 kg/m² en el grupo sin DMG. Es importante mencionar que, por su IMC pregestacional que el grupo con DMG, el 36.8% de las participantes presentaron normopeso, mientras que el 63.15% presentaron sobrepeso y obesidad de acuerdo a las Pautas de aumento de peso gestacional Instituto de Medicina (OIM) (Merx *et al.*, 2015). La obesidad y el sobrepeso propician un estado de resistencia a la insulina que se ve potenciado por el embarazo, en donde se presenta una sobreproducción

de insulina por las células β pancreáticas y se presenta un deterioro más acelerado de la plasticidad y funcionalidad de las células β ocasionado por el proceso de embarazo (Lorenzo et al., 2019b).

La gravidez fue mayor en las mujeres con DMG en comparación con las mujeres sin DMG (2.63 vs 1.66; $p=0.0284$). En este sentido, Liu *et al.* (2020) reportó que las mujeres con >3 embarazos presentaron un mayor riesgo de desarrollar DMG. El vínculo exacto entre el número de embarazos y DMG no está claro. Sin embargo, en el embarazo el aumento de hormonas esteroides y peptídicas conduce al aumento de la resistencia a la insulina del tejido materno y aunque después del parto los niveles de glucosa regresan a los niveles anteriores al embarazo al poco tiempo después de del parto, una exposición repetida a dichos cambios metabólicos y hormonales pudiera estar alterando el metabolismo de la glucosa (Berggren *et al.*, 2015). Con respecto a los antecedentes familiares de DMG, estos fueron más frecuentes en el grupo con DMG (78.9%) en comparación con el grupo sin DMG (33.3%), presentando significancia estadística ($p=0.0111$).

Cuadro 9. Características clínicas generales de los grupos de estudio.

	Sin DMG (n=12)	Con DMG (n=19)	Valor de p
Edad Materna (años)	23.92 \pm 1.74	29.00 \pm 1.15	0.0091
Semana de gestación 1 ^{er} trimestre	12.67 \pm 0.28	12.58 \pm 0.22	0.9661
Semanas de gestación 2 ^{do} trimestre	26.17 \pm 0.44	25.26 \pm 0.23	0.0956
Semanas de gestación 3 ^{er} trimestre	31.92 \pm 0.28	31.89 \pm 0.28	0.9013
IMC pregestacional	20.27 \pm 0.85	28.43 \pm 1.30	<0.0001
IMC (kg/m ²) 1 ^{er} trimestre	20.92 \pm 0.86	29.03 \pm 1.25	<0.0001
IMC (kg/m ²) 2 ^{do} trimestre	23.57 \pm 1.0	30.41 \pm 1.15	0.0003
IMC (kg/m ²) 3 ^{er} trimestre	24.45 \pm 0.99	31.39 \pm 1.12	0.0002
Gravidez	1.66 \pm 0.18	2.63 \pm 0.30	0.0284
Partos	0.25 \pm 0.17	0.84 \pm 0.25	0.1298

Cesáreas	0.25 ± 0.13	0.63 ± 0.24	0.4163
Abortos	0.16 ± 0.11	0.15 ± 0.08	>0.9999
Antecedente de DMG	0 (0%)	1 (5.2%)	>0.9999
Antecedentes de familiares con DMT2	4 (33.3%)	15 (78.9%)	0.0111

Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media. Los valores de p se determinaron mediante la t-test o la prueba U de Mann-Whitney. Los datos categóricos se presentaron como frecuencia y se aplicaron pruebas de chi-cuadrado para comparar las diferencias entre los dos grupos. DMG: diabetes mellitus gestacional; IMC: índice de masa corporal; DMT2: diabetes mellitus tipo 2.

6.3 Parámetros bioquímicos de mujeres con DMG y sin DMG en los tres trimestres de gestación.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados de los parámetros bioquímicos de las participantes del estudio. De acuerdo con la definición de DMG en la que su principal condición es la hiperglucemia, es clara la presencia de niveles elevados de glucosa en los tres trimestres para las mujeres con DMG frente al grupo control ($p = <0.0001$). Las mujeres con DMG presentaron niveles aumentados de glucosa en un 25.6% en el primer trimestre, 28.1% en el segundo trimestre y 29.1% en el tercer trimestre en comparación con las mujeres sin DMG.

En el segundo trimestre (semanas 24-28 de gestación), se realizó la curva de tolerancia oral a la glucosa para realizar el diagnóstico de DMG de acuerdo con los lineamientos de la IADPSG. Conforme con lo esperado, las mujeres con DMG presentaron niveles más altos de glucosa de 1 y 2 h poscarga en comparación con las mujeres sin DMG ($p = <0.0001$) (Figura 5).

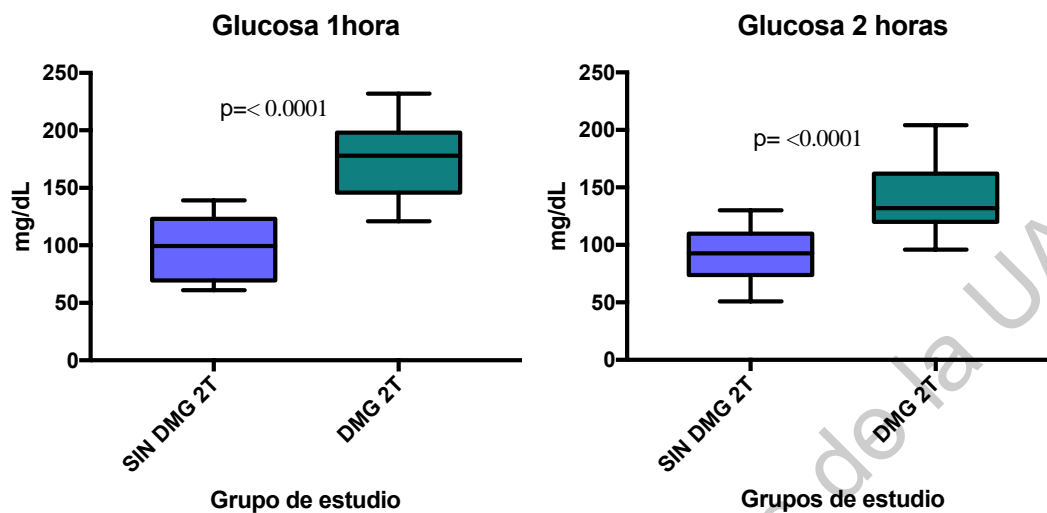


Figura 5. Niveles de glucosa post carga a 1 hora y 2 horas (75 g de glucosa) en mujeres con DMG y sin DMG. Los resultados se presentan como media y las barras de error representan el error estándar de la media. Los valores de p se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney. DMG: diabetes mellitus gestacional.

Con respecto a los niveles séricos de insulina, se observó que las mujeres con DMG presentaron niveles de insulina más elevados en comparación con las mujeres sin DMG en los tres trimestres de gestación (252.4, 152.6 y 83.0 %), la cual fue más marcada en el primer y segundo trimestre de gestación. También se observó que las mujeres con DMG presentaron resistencia a la insulina de acuerdo con el punto de corte que reportan Reyes-Muñoz (2017) para resistencia a la insulina en el primer trimestre del embarazo índice HOMA (>1.6). En el segundo trimestre de gestación, las mujeres con DMG presentaron un aumento en el valor del índice HOMA (218.75%), pero está por debajo del punto de corte reportado para mujeres embarazadas en este trimestre de gestación (>2.9); sin embargo, presentaron resistencia a la insulina de acuerdo con la CTGO. En el tercer trimestre de gestación, las mujeres con DMG presentaron un aumento en valor de índice HOMA (124.3%), pero está por debajo del punto de corte (>2.6).

Cuadro 10. Parámetros bioquímicos en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación de los grupos de estudio.

Parámetro bioquímico	Primer trimestre de gestación			Segundo trimestre de gestación			Tercer trimestre de gestación		
	Sin DMG	Con DMG	Valor de <i>p</i>	Sin DMG	Con DMG	Valor de <i>p</i>	Sin DGM	Con DMG	Valor de <i>p</i>
Glucosa ¹	72.50 ± 1.49	91.11 ± 2.09	<0.0001	73.42 ± 2.18	94.05 ± 2.24	<0.0001	75.08 ± 1.04	90.47 ± 2.17	<0.0001
Insulina ²	6.37 ± 0.61	22.45 ± 3.3	<0.0001	1.75 ± 0.29	4.42 ± 0.62	0.0005	2.24 ± 0.72	4.10 ± 0.60	0.0065
Índice HOMA ³	1.13 ± 0.10	5.24 ± 0.93	<0.0001	0.32 ± 0.05	1.02 ± 0.14	0.0001	0.41 ± 0.12	0.92 ± 0.13	0.0037
Colesterol ¹	159.30 ± 4.44	176.20 ± 5.75	0.0456	211.40 ± 5.02	215.60 ± 9.44	0.7403	229.70 ± 7.68	232.60 ± 12.7	0.8615
c-HDL ¹	51.17 ± 1.80	45.05 ± 1.85	0.0339	53.08 ± 1.76	47.89 ± 2.17	0.1039	53.42 ± 2.5	47.0 ± 2.78	0.0865
c-LDL ¹	87.33 ± 4.44	99.53 ± 5.26	0.0757	123.30 ± 7.03	121.60 ± 9.77	0.9009	113.30 ± 9.05	135.30 ± 10.97	0.6530
Triglicéridos ¹	104.30 ± 9.37	158.30 ± 12.79	0.0050	174.90 ± 15.19	227.50 ± 18.49	0.0599	212.80 ± 14.8	274.10 ± 18.77	0.0277

Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media. Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney.

Los resultados se expresan como ¹mg/dL; ²UI/mL; ³UA. DMG: diabetes mellitus gestacional; c-HDL lipoproteínas de alta densidad; c-LDL lipoproteínas de baja densidad; c-VLDL lipoproteínas de muy baja densidad; UA: unidades arbitrarias.

Adicionalmente, se observaron diversas alteraciones en el metabolismo de lípidos en las mujeres que desarrollaron DMG. Con respecto al colesterol total, las mujeres con DMG presentaron niveles más altos en comparación con las mujeres sin DMG en el primer trimestre (10.6%; $p=0.0456$), mientras que no se observaron diferencias significativas en el segundo y tercer trimestre de gestación. Es importante mencionar que se observa un aumento en los niveles séricos de colesterol total en ambos grupos de estudio conforme progresa el embarazo, que es debido a que el colesterol es utilizado como precursor de hormonas esteroideas en la placenta, el aumento en los niveles séricos de colesterol en las mujeres con DMG podría conllevar a una sobreproducción de dichas hormonas, las cuales son consideradas como diabetogénicas ya que promueven un estado de resistencia a la insulina (Ghio et al., 2011).

Por otro lado, se observó que los niveles de c-HDL tienden a ser menores en las mujeres con DMG en comparación con las mujeres sin DMG en todos los trimestres (13.6, 10.8 y 13.7%); sin embargo, únicamente se observó diferencia significativa en el primer trimestre ($p=0.03339$). Con respecto al c-LDL, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio durante el embarazo.

Los niveles de triglicéridos séricos fueron más altos en las mujeres con DMG en comparación con las mujeres sin DMG en los tres trimestres de gestación (51.8, 30.0 y 28.8%); observándose diferencias significativas en el primer ($p=0.0050$) y tercer ($p=0.0277$) trimestre. Asimismo, se observa que ambos grupos de estudio presentan un aumento gradual de los triglicéridos séricos conforme progresa la gestación. La hipertrigliceridemia en el embarazo resulta del aumento de la resistencia a la insulina, la síntesis de lipoproteínas y la lipólisis en el tejido adiposo, para poder aportar ácidos grasos como fuente de energía para el desarrollo fetal (Hajar Sharami *et al.*, 2019).

6.4. Análisis metabolómico dirigido en muestras séricas de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer trimestre de gestación

6.4.1. Identificación de metabolitos

Mediante UPLC-MS/MS, se detectó un total de 78 metabolitos en las muestras de suero de las mujeres con DMG y sin DMG obtenidas en el primer trimestre de gestación, los cuales incluyeron las clases de glicerofosfolípidos y ácidos grasos. De la primera clase se identificaron 10 metabolitos de ácidos lisofosfatídicos (LisoPA), 9 metabolitos de lisofosfoinosítoles (LisoPI), 2 metabolitos de lisofosfocolinas (LisoPC), 2 metabolitos de lisofosfoserinas (LisoPS), 5 metabolitos de lisofosfoetanolaminas (LisoPE), 8 metabolitos de fosfatidatos (PA), 12 metabolitos de fosfatidilinosítoles (PI), 11 metabolitos de fosfatidiletanolaminas (PE), 3 metabolitos de fosfatidilcolinas (PC), 5 metabolitos de fosfatidilserinas (PS); mientras que de la clase de ácidos grasos se identificaron 11 metabolitos de la subclase ácidos grasos (AG).

Todos los metabolitos fueron identificados con base en su masa exacta (error de masa <5 ppm) y el análisis de su patrón de fragmentación, para esto último se analizaron los espectros de masas de alta y baja energía de colisión. En la Figura 6 se muestra un ejemplo del espectro de masas del metabolito AG 22:6, donde el eje X indica la relación masa/carga (m/z) y en el eje Y la intensidad del compuesto. El espectro de masas de baja energía fue utilizado para identificar el ion pseudomolecular, mientras que el espectro de masas de alta energía fue utilizado para identificar sus fragmentos característicos generados durante la ionización en el espectrómetro de masas.

En el caso de los ácidos grasos, todos los iones pseudomoleculares fueron identificados con el aducto $[M-H]^-$, mientras que uno de los fragmentos característicos de los ácidos grasos bajo ionización en modo negativo es la descarboxilación ($-COO$), lo que corresponde a una pérdida de 44 Dalton. Por lo tanto, en el ejemplo indicado del ácido docosahexanoico (AG 22:6), en el espectro de masas de baja energía de colisión se identificó al ion pseudomolecular a 327 Da, mientras que el fragmento a 283 Da fue identificado en el espectro de masas de alta energía colisión.

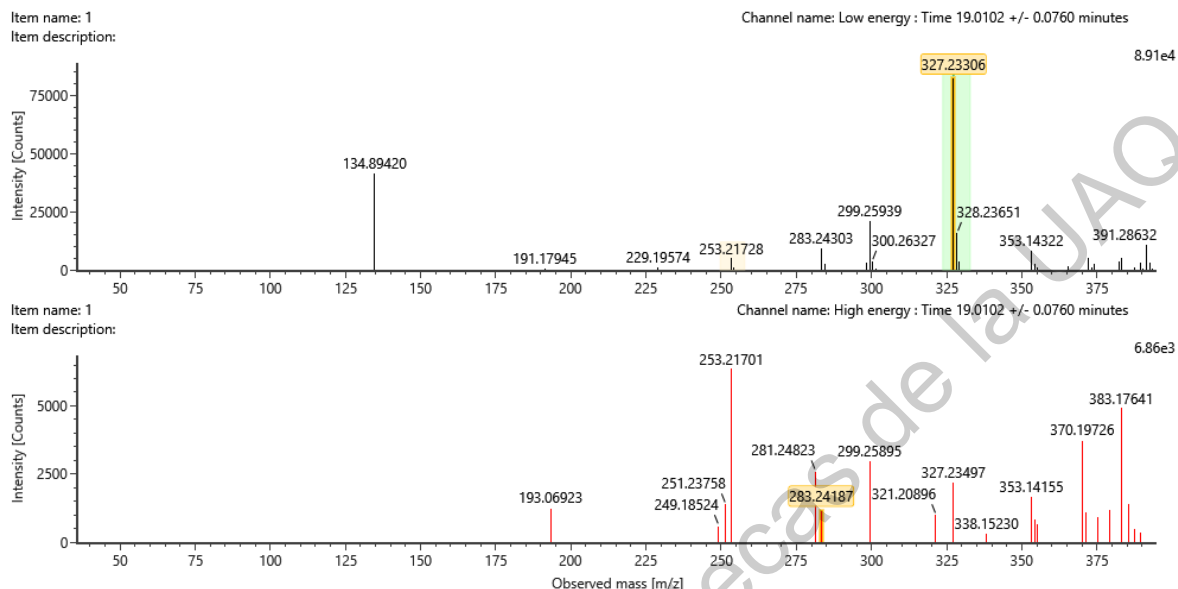


Figura 6. Espectro de masas de baja y alta energía de colisión del metabolito AG 22:6.

6.4.2. Análisis multivariado

6.4.2.1. PLS-DA del primer trimestre de gestación

En este estudio, el método de clasificación multivariante basado en análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para el primer trimestre permitió observar una moderada discriminación entre el grupo sin DMG y el grupo con DMG de acuerdo con los conjuntos de datos del perfil metabolómico. La gráfica de puntuación arrojada por el PLS-DA presentó que el componente 1 podía discriminar entre los dos grupos, que representaban el 38% de la varianza total; mientras que el componente 2 representó el 9.3% de la varianza total (Figura 7).

Dichos resultados implicaron que varios cambios en los metabolitos de glicerofosfolípidos y acilos grasos se asociaron con alteraciones metabólicas desde el primer trimestre en aquellas mujeres que desarrollaron DMG. Los parámetros de la validación cruzada del modelo de PLDA fueron Exactitud= 0.7741, $R^2= 0.7062$, $Q^2= 0.3151$ este último valor indicando que el modelo no fue sobreajustado y tiene capacidad predictiva aceptable.

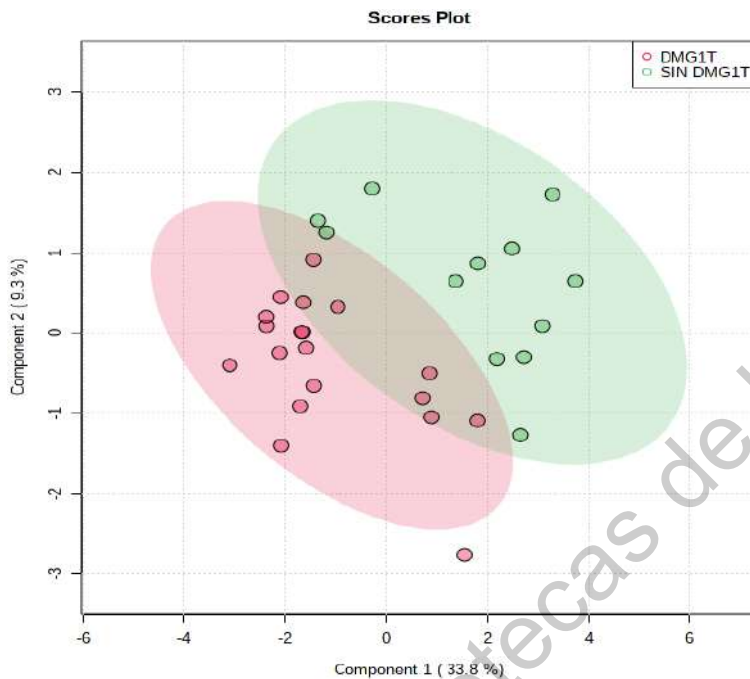


Figura 7. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del perfil metabolómico dirigido en el primer trimestre de gestación de los grupos de estudio. DMG: Diabetes mellitus gestacional.

Posteriormente, se obtuvieron los metabolitos relevantes de cada grupo de estudio, es decir, aquellos metabolitos que contribuyeron en la separación observada en el gráfico de PLS-DA. En el Cuadro 11 se muestran los 17 metabolitos responsables de la discriminación entre los dos grupos de estudio, los cuales corresponden a aquellos metabolitos con un VIP score > 1.0 . Dicho parámetro representa el valor de cada variable explicativa en el ajuste del modelo tanto para el conjunto de variables respuesta como para las variables predictoras; entre los cuales se encuentran 3 metabolitos de la clase de acilos grasos y 14 de la clase de glicerofosfolípidos.

Cuadro 11. Metabolitos candidatos a biomarcador encontrados en el primer trimestre de gestación

Metabolito	ID	m/z observada ³	Tiempo de retención (min)	VIP	Intensidad (UA)		Valor de <i>p</i>	Veces de cambio ⁴
					Sin DMG	Con DMG		
LisoPA (18:2)	HMDB0007856 ¹ HMDB0007852 ¹	437.26	17.75	4.82	35842 ± 8931	89373 ± 9857	0.0014	2.49
LisoPA (20:4)	HMDB0114742 ¹	457.23	18.17	2.48	93991 ± 19875	75773 ± 20795	0.0363	-1.24
PS (16:0/22:2)	HMDB0112351 ¹	814.56	15.80	2.47	1451 ± 652.8	4828 ± 1019	0.0023	3.32
AG (18:3)	HMDB0001388 ¹	277.21	15.19	2.00	3145 ± 778.4	7619 ± 796.8	0.0048	2.42
PI (16:1/18:1)	HMDB0009800 ¹	833.52	26.17	1.77	805.8 ± 136.4	170.6 ± 94.04	0.0003	-4.72
LisoPI (18:0)	HMDB0240261 ¹	599.32	13.98	1.65	9674 ± 3159	17414 ± 2622	0.2693	1.80
PE (18:1/18:1)	HMDB0009058 ¹	742.54	22.25	1.62	983.8 ± 363.7	172.2 ± 101.8	0.0009	-5.71
AG (20:4)	HMDB0001043 ¹	303.23	19.31	1.44	57706 ± 5704	52514 ± 5325	0.0039	-1.10
LisoPI (20:1)	LMGP06059ABA ² LMGP06059ADL ²	625.33	20.55	1.41	459.1 ± 52.82	49.26 ± 33.9	<0.0001	-9.31
LisoPE (18:0)	HMDB0011130 ¹	480.30	17.67	1.19	10863 ± 1233	17697 ± 1578	0.0226	1.62
LisoPI (20:4)	HMDB0061690 ¹	619.28	16.49	1.15	1502 ± 212.6	885.4 ± 166.3	<0.0001	-1.69
PI (16:0/20:4)	HMDB0009790 ¹	857.52	26.10	1.08	352 ± 63.48	66.95 ± 36.63	0.0014	-5.25
PI (16:1/20:3)	HMDB09788 ¹	857.52	21.49	1.02	482.4 ± 53.77	201.8 ± 63.13	0.0012	-2.39
AG (18:2)	HMDB00673 ¹	279.23	19.56	1.00	60544 ± 5978	57306 ± 3543	0.0683	-1.06
LisoPA (22:6)	HMDB0114755 ¹	481.23	17.91	1.17	10011 ± 1084	9647 ± 1978	0.2198	-1.03
PA (16:1/20:3)	HMDB0115513 ¹	753.55	22.56	1.07	401.7 ± 204.2	63.42 ± 63.42	<0.0001	-6.30
LisoPA (22:5)	HMDB0114753 ¹ HMDB0114754 ¹	483.25	19.86	1.00	758 ± 318.1	689.4 ± 296.8	0.2520	-1.09

ID de la ¹Human Metabolome Database (HMDB); ²Lipid Maps Structure Database (LMSD). ³m/z del ion pseudomolecular con el aducto [M-H]⁻. ⁴Veces de cambio entre el grupo con DMG y el grupo sin DMG. DMG: diabetes mellitus gestacional; UA: unidades arbitrarias.; PA: ácido fosfatídico; PS: fosfatidilserina; AG: ácido graso; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina. Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney.

6.4.2.2. PLS-DA del segundo trimestre de gestación

El método de clasificación multivariante basado en PLS-DA para el segundo trimestre permitió observar una moderada discriminación entre el grupo sin DMG y el grupo con DMG de acuerdo con el conjunto de datos del perfil metabolómico dirigido (Figura 8). La gráfica de puntuación arrojada por el PLS-DA presentó que el componente 1 podía discriminar entre los dos grupos, que representaban el 34.9% de la varianza total; mientras que el componente 2 representó solamente el 9.1% de la varianza total. Los parámetros de la validación cruzada del modelo de PLS-DA fueron exactitud= 0.9032, $R^2= 0.7526$, $Q^2= 0.3551$.

Los metabolitos que principalmente lograron la moderada discriminación se describen en la Cuadro 12. Es importante destacar que en el segundo trimestre para la discriminación entre grupos también coincidieron 7 metabolitos que se encuentran en la lista de candidatos a biomarcador para el primer trimestre: lisoPA (20:4), PS (16:0/22:2), AG (18:3), lisoPA (18:2), lisoPE (18:0), lisoPI (20:4), lisoPI (20:1).

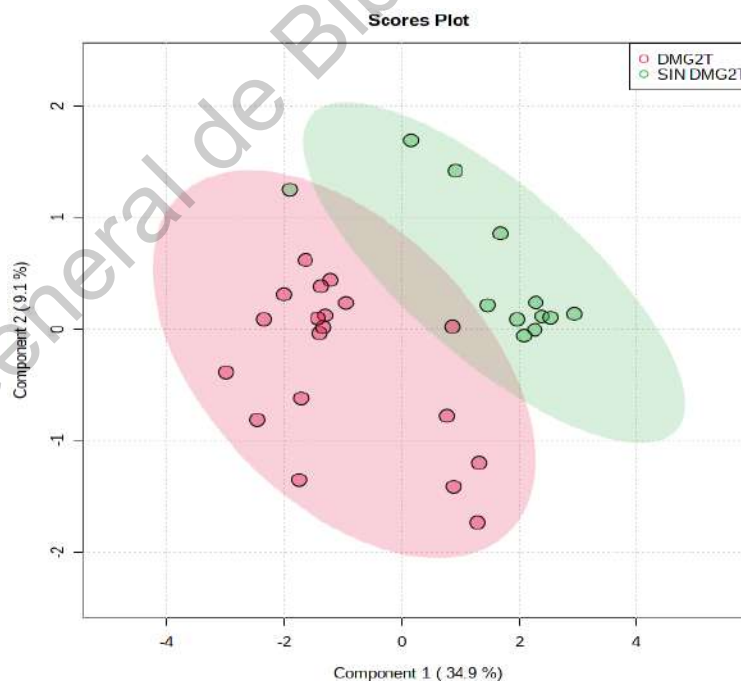


Figura 8. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) del perfil metabolómico dirigido en el segundo trimestre de gestación de los grupos de estudio. DMG: diabetes mellitus gestacional.

Cuadro 12. Metabolitos discriminatorios entre los grupos de estudio para el segundo trimestre

Metabolito	ID	m/z observada ³	Tiempo de retención (min)	VIP	Intensidad (UA)		Valor de <i>p</i>	Veces de cambio ⁴
					Sin DMG	Con DMG		
LisoPA (20:4)	HMDB0114742 ¹	457.23	18.17	3.11	627461 ± 8253	57025 ± 12973	0.0254	-1.35
PS (16:0/22:2)	HMDB0112351 ¹	814.56	15.80	2.67	446.8 ± 365.9	2696 ± 665.7	0.0009	7.23
LisoPE (16:0)	HMDB0011503 ¹ HMDB0011473 ¹	452.27	15.70	2.66	3182 ± 691.5	10662 ± 1416	<0.0001	3.31
AG (18:3)	HMDB0011473 ¹	277.21	15.19	2.43	1807 ± 531.6	6476 ± 1006	0.0064	3.71
LisoPA (18:2)	HMDB0007856 ¹	433.23	18.30	2.20	52949 ± 5786	101639 ± 11191	0.0170	1.88
AG (20:5)	HMDB0001999 ¹	301.21	16.22	1.76	5088 ± 759.6	11525 ± 1239	0.0035	2.31
LisoPI (16:0)	HMDB0061695 ¹	571.28	17.70	1.54	1592 ± 322.7	4914 ± 731.1	0.0258	2.20
LisoPI (18:2)	HMDB0240597 ¹	595.28	16.42	1.44	5088 ± 759.5	11525 ± 1239	<0.0001	-1.63
LisoPS (18:2)	HMDB0240604 ¹	520.26	15.70	1.35	256.8 ± 65.37	882.3 ± 101.3	<0.0001	3.48
LisoPE (18:0)	HMDB0011130 ¹ HMDB0011129 ¹	480.30	17.67	1.27	111440 ± 855.3	20488 ± 2068	0.0039	1.71
AG (16:0)	HMDB0000220 ¹	255.23	20.67	1.26	8396 ± 523.8	7225 ± 62	<0.0001	-1.23
LisoPI (20:4)	HMDB0061690 ¹ HMDB0062722 ¹	619.28	16.52	1.17	1452 ± 94.45	959.9 ± 100.6	<0.0001	-1.51
LisoPA (16:0)	HMDB0007853 ¹	433.23	18.30	1.08	619.7 ± 230.5	1489 ± 187	0.1100	2.34
LisoPI (20:1)	LMGP06059ABA ² LMGP06059ADL ²	625.33	20.64	1.04	261.5 ± 49.96	85.95 ± 40.47	0.0023	-3.04
PI (20:1/20:2)	LMGP06010516 ²	915.56	22.83	1.04	2219 ± 824.9	1561 ± 724.3	0.0065	-2.03
PI (16:1/20:2)	LMGP06010546 ² LMGP06010186 ²	859.54	26.11	1.02	884.3 ± 84.33	533.6 ± 121.5	0.1100	-1.60

ID de la ¹Human Metabolome Database (HMDB); ²Lipid Maps Structure Database (LMSD). ³m/z del ion pseudomolecular con el aducto [M-H]⁻. ⁴Veces de cambio entre el grupo con DMG y el grupo sin DMG. DMG: diabetes mellitus gestacional; UA: unidades arbitrarias.; PA: ácido fosfatídico; PS: fosfatidilserina; PE: fosfatidiletanolamina; AG: ácido graso; PI: fosfatidilinositol. Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney.

6.4.2.3. PLS-DA del tercer trimestre de gestación

En la Figura 9 se muestra el modelo de PLS-DA obtenido para el perfil metabólico dirigido de mujeres embarazadas sin DMG y con DMG en el tercer trimestre de embarazo. Es importante destacar que no se observa una discriminación entre los grupos de estudio; lo que sugiere que el estado metabólico de las mujeres de ambos grupos es similar.

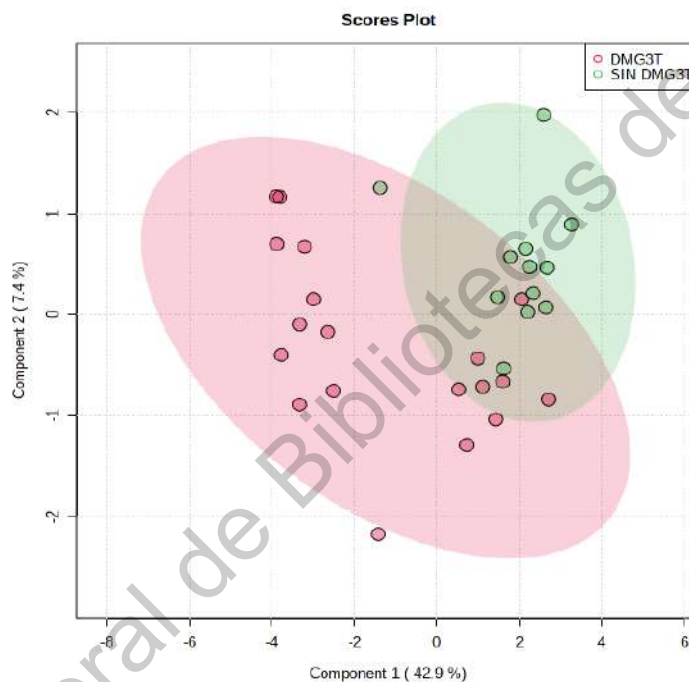


Figura 9. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) del perfil metabólico dirigido en el tercer trimestre de gestación de los grupos de estudio. DMG: diabetes mellitus gestacional.

6.4.3. Metabolitos candidatos a biomarcador

Con base en los resultados obtenidos del análisis multivariado de los perfiles metabólicos dirigidos, se realizaron las curvas ROC de los metabolitos que resultaron discriminantes entre las mujeres embarazadas sin DMG y con DMG en el primer trimestre de gestación, los cuales podrían ser candidatos como biomarcadores de diagnóstico oportuno de DMG.

Las curvas ROC presentan la sensibilidad (verdaderos positivos) de una prueba diagnóstica en función de la especificidad (falsos positivos). Un parámetro que evalúa la bondad de una prueba diagnóstica es el área bajo la curva (AUC), la cual se interpreta como la probabilidad de que el metabolito clasifique correctamente a un individuo sano (sin DMG) y otro enfermo (con DMG); siendo que un valor de AUC de 1 indicaría una prueba perfecta, mientras que se considera que un AUC <0.5 es una prueba sin utilidad diagnóstica. Por lo tanto, las curvas ROC son utilizadas para conocer el rendimiento general de una prueba diagnóstica (con el valor de AUC).

De los 17 metabolitos discriminatorios encontrados en el primer trimestre, cuatro metabolitos presentaron una alta AUC en las curvas ROC: el metabolito lisoPI (20:1) presentó un AUC de 0.952 (Figura 10), con un valor de $p = 3.58 \times 10^{-8}$; el metabolito lisoPI (20:4) presentó un AUC de 0.939 (Figura 11), con un valor de $p = 5.35 \times 10^{-4}$; el metabolito PA (16:1/20:3) presentó un AUC de 0.904 (Figura 12), con un valor de $p = 0.0091$; y el metabolito PI (16:1/18:1) presentó un AUC de 0.877 (Figura 13), con un valor de $p = 5.65 \times 10^{-5}$. Cabe mencionar que todas las curvas ROC se realizaron con el 95% de confianza.

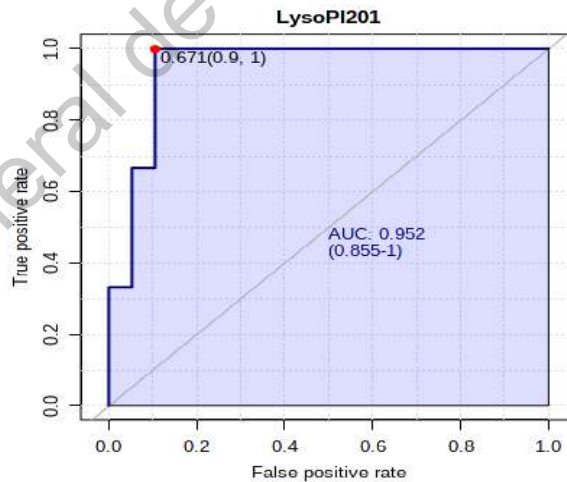


Figura 10. Curva ROC del metabolito LisoPI (20:1) en el primer trimestre de gestación.

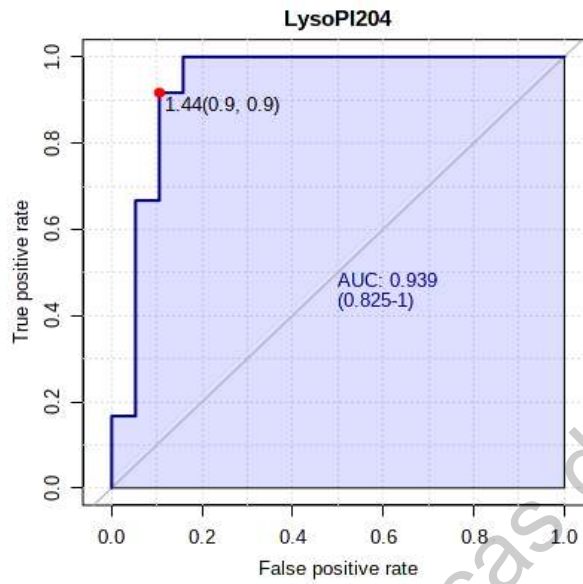


Figura 11. Curva ROC del metabolito LisoPI (20:4) en el primer trimestre de gestación.

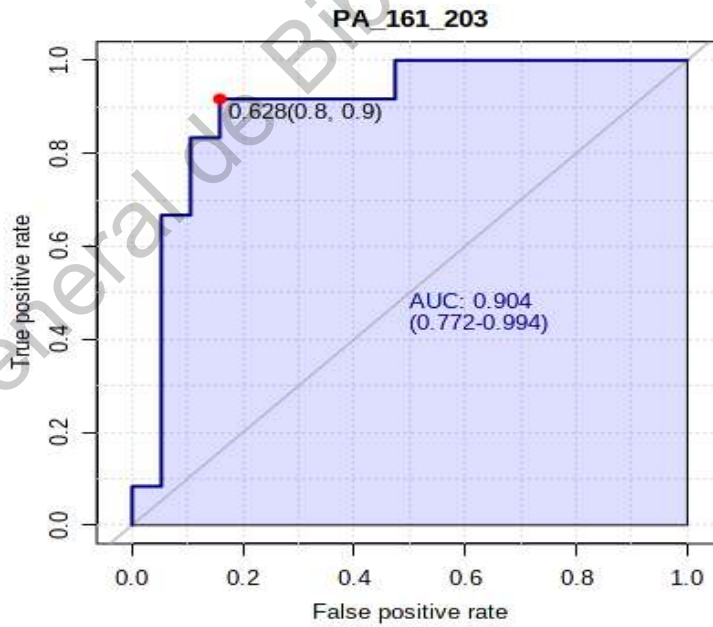


Figura 12. Curva ROC del metabolito PA (16:1/20:3) en el primer trimestre de gestación.

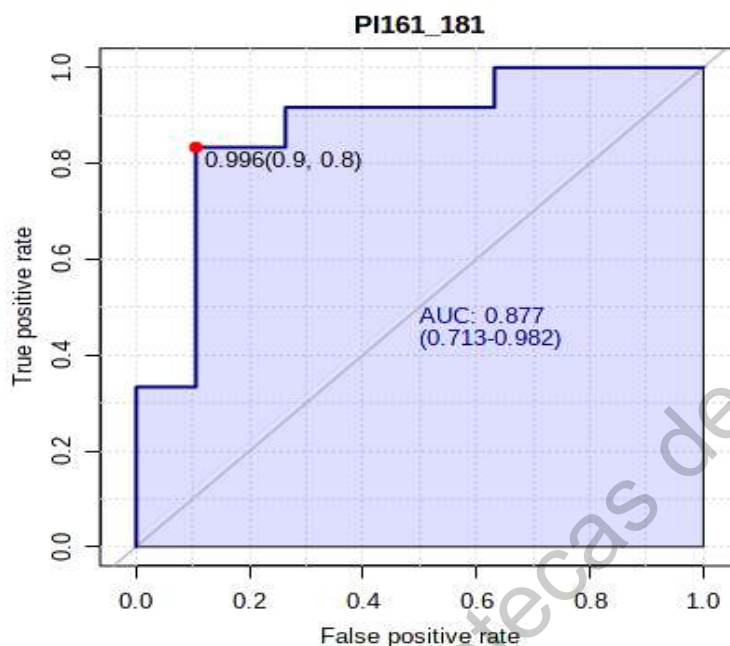


Figura 13. Curva del metabolito PI (16:1/18:1) en el primer trimestre de gestación.

6.4.3.1 Metabolito lisoPI (20:1)

El metabolito lisoPI (20:1), con fórmula química $C_{29}H_{55}O_{12}P$, pertenece a la clase glicerofosfolípidos y subclase glicerofosfoinositoles (Figura 14). Los lisofostatidilinositoles son lípidos bioactivos generados por acción de las fosfolipasas A. Se ha reportado que los lisoPI afectan diversas actividades celulares tales como crecimiento celular, diferenciación y movilización de diferentes tipos de células. Asimismo, se ha reportado que los lisoPI juegan un rol importante en el desarrollo de diversas alteraciones metabólicas, incluyendo el metabolismo y la homeostasis de la glucosa, ya que se ha demostrado que los lisoPI estimulan la liberación de insulina por las células β -pancreáticas (Arifin & Falasca, 2016). Sin embargo, no se ha reportado la implicación de los lisoPI en el desarrollo de DMG.

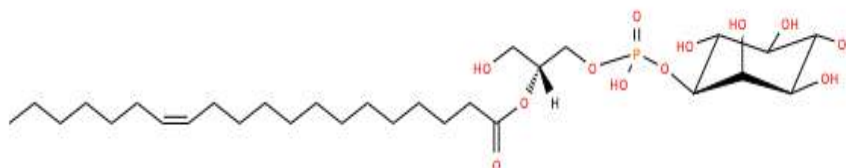


Figura 14. Estructura química del metabolito lisoPI (20:1)

El metabolito lisoPI (20:1) se encontró en niveles más bajos en aquellas mujeres embarazadas que desarrollaron DMG en comparación con las que no desarrollaron DMG en los tres trimestres de gestación; sin embargo, únicamente se observó significancia estadística entre los dos grupos de estudio en el primer y segundo trimestre (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comportamiento de LisoPI (20:1) en el primer trimestre de gestación.

LisoPI (20:1)		1er trimestre	2do trimestre	3er trimestre
Respuesta	Sin DMG	459.1 ± 52.82	261.5 ± 49.96	229.7 ± 55.53
	Con DMG	49.26 ± 33.9	85.95 ± 40.47	84.42 ± 34.41
Veces de cambio ¹		-9.31	-3.04	-2.72
Valor <i>p</i>		<0.0001	0.0023	0.1297

¹Veces de cambio entre el grupo con DMG y el grupo sin DMG. DMG: diabetes mellitus gestacional. Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney.

6.4.4.2 Metabolito lisoPI (20:4)

El metabolito lisoPI (20:4) es un lisofosfatidilinositol con fórmula química C₂₉H₄₉O₁₂P perteneciente a la clase glicerofosfolípidos y subclase glicerofosfoinositoles (Figura 15). Como se mencionó anteriormente, hasta el momento no se ha reportado ningún metabolito de la familia de los lisofosfoinositoles asociado en el desarrollo de DMG.

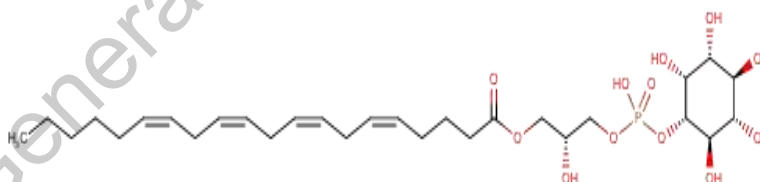


Figura 15. Estructura química del metabolito lisoPI (20:4)

De manera similar al lisoPI (20:1), el metabolito lisoPI (20:4) se observó disminuido en las mujeres embarazadas con DMG en comparación con las mujeres sin DMG en los tres trimestres de gestación. De manera interesante, este metabolito sí presentó diferencia significativa entre los grupos de estudio en los tres trimestres de gestación (Cuadro 14).

Cuadro 14. Comportamiento de LisoPI (20:4) en los tres trimestres de gestación.

LisoPI (20:4)		1er trimestre	2do trimestre	3er trimestre
Respuesta	Sin DMG	1502 ± 212.6	1452 ± 94.45	3316 ± 442.4
	Con DMG	885.4 ± 166.3	959.9 ± 100.	1847 ± 274
Veces de cambio ¹		-1.69	-1.51	-1.79
Valor <i>p</i>		<0.0001	<0.0001	0.0036

¹Veces de cambio entre el grupo con DMG y el grupo sin DMG. DMG: diabetes mellitus gestacional. Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney.

6.4.4.3 Metabolito PA (16:1/20:3)

El metabolito PA (16:1/20:3) es un ácido fosfatídico con fórmula química C₃₉H₆₉O₈P perteneciente a la clase glicerofosfolípidos y subclase glicerofosfatos (Figura 16). Los ácidos fosfatídicos (PA) son considerados intermediarios en la síntesis *de novo* de lípidos, son constituyentes de las membranas celulares y actúan como moléculas de señalización.

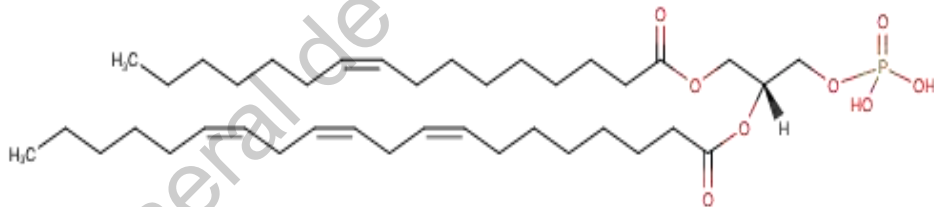


Figura 16. Estructura química del metabolito PA (16:1/20:3)

El aumento en los niveles de PA ha sido asociado con un aumento en la actividad de la aciltransferasa de diacilglicéridos (DGAT), la cual fosforila los diacilglicéridos (DAG) en PA. Se ha reportado que los PA aumentan la actividad de mTOR, el cual inhibe la síntesis hepática de glucosa (gluconeogénesis) por medio de la fosforilación de FoxO1 y estimula la glucólisis y la internalización de glucosa; lo que se refleja en una reducción de los niveles sanguíneos de glucosa (Z. Mao & Zhang, 2018) (Massart & Zierath, 2019). Por lo tanto, se ha reportado la implicación de PA en el metabolismo y homeostasis de la glucosa en el

desarrollo de DM y sus complicaciones; sin embargo, no ha sido reportado su implicación metabólica en el desarrollo de DMG.

En este estudio, no se observó una tendencia clara en los niveles de PA (16:1/20:3), ya que las mujeres con DMG presentaron significativamente niveles más bajos de este metabolito en comparación de las mujeres sin DMG en el primer trimestre de gestación (-6.30; Cuadro 15). De acuerdo con lo discutido anteriormente, los niveles bajos de PA sugieren un aumento en la gluconeogénesis hepática y podría estar asociado con el estado de hiperglucemia de las mujeres con DMG en el primer trimestre de gestación (Cuadro 10). En el segundo trimestre de gestación, las mujeres con DMG presentaron niveles de PA (16:1/20:3) más altos en comparación con las mujeres sin DMG (2.36); sin embargo, no se observó significancia estadística. Finalmente, en el tercer trimestre de gestación este metabolito únicamente fue detectado en el grupo con DMG. Por lo tanto, la relación entre los niveles de este PA y la hiperglucemia en el segundo y tercer trimestre de gestación no es clara.

Cuadro 15. Comportamiento de PA (16:1/20:3) en los tres trimestres de gestación.

PA (16:1/20:3)		1er trimestre	2do trimestre	3er trimestre
Respuesta	Sin DMG	401.7 ± 204.2	97.33 ± 66.05	0 ± 0
	Con DMG	63.42 ± 63.42	230.5 ± 74.51	57.79 ± 31.55
Veces de cambio ¹		-6.30	2.36	*
Valor <i>p</i>		<0.0001	0.5894	0.9523

¹Veces de cambio entre el grupo con DMG y el grupo sin DMG. DMG: diabetes mellitus gestacional; Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney. *No detectado en el grupo sin DMG.

6.4.2.4 Metabolito PI (16:1/18:1)

El metabolito PI (16:1/18:1), con fórmula química C₄₃H₇₉O₁₃P, pertenece a la clase de glicerofosfolípidos y su subclase glicerofosfoinositoles (Figura 17). Si bien no se ha reportado la implicación metabólica de los PI en el desarrollo de DMG, se ha reportado que el PI (36:1), junto con otros metabolitos pertenecientes a las familias de fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas y fosfatidilserinas, es positiva y significativamente

asociado con el desarrollo de DMT2 tras doce semanas de haber concluido un embarazo con DMG (Lappas *et al.*, 2015). Sin embargo, en este estudio se observó que el PI (16:1/18:1) se encontró disminuido en las mujeres con DMG en comparación con las mujeres sin DMG en los tres trimestres de gestación; observándose significancia estadística en el primer y segundo trimestre de gestación (Cuadro 16).

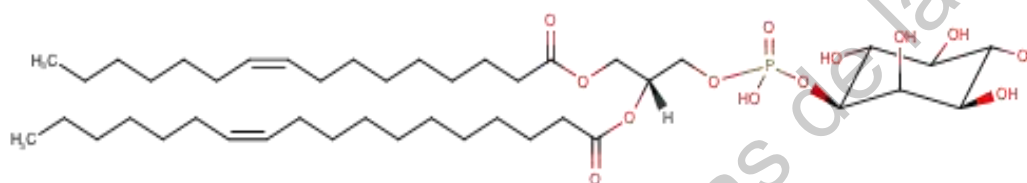


Figura 17. Estructura química del metabolito PI (16:1/18:1)

Cuadro 15. Comportamiento de PI (16:1/18:1) en el primer trimestre de gestación

PI (16:1/18:1)		1er trimestre	2do trimestre	3er trimestre
Respuesta	Sin DMG	805.8 ± 136.4	1360 ± 49.04	1901 ± 175.7
	Con DMG	170.6 ± 94.04	1124 ± 38.05	1492 ± 143.6
Veces de cambio ¹		-4.72	-1.20	-1.27
Valor <i>p</i>		0.0003	0.0012	0.1285

¹Veces de cambio entre el grupo con DMG y el grupo sin DMG. DMG: diabetes mellitus gestacional; Los valores de *p* se determinaron mediante la prueba t-test o la prueba Mann-Whitney.

7. Conclusiones

El análisis metabolómico dirigido permitió la discriminación entre mujeres mexicanas que desarrollaron DMG y aquellas que no desarrollaron esta enfermedad en el primer y segundo trimestre de gestación. Los metabolitos lisoPI (20:1), lisoPI (20:4), PA (16:1/20:3) y PI (16:1/18:1) podrían ser propuestos como candidatos a biomarcador para el diagnóstico oportuno de DMG en las semanas 11-14 de gestación debido a su alta sensibilidad y especificidad analítica.

Limitaciones

Las siguientes limitaciones del estudio deben ser consideradas: (i) los resultados del análisis metabólico dirigido son expresados como abundancia relativa, los cuales son altamente correlacionadas con las concentraciones absolutas; sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores con la cuantificación correspondiente; (ii) los análisis estadísticos no fueron ajustados por factores de riesgo conocidos de DMG; (iii) las participantes incluidas en el estudio fueron mujeres adultas mexicanas que tienen una alta probabilidad de desarrollar DMG debido a predisposiciones genéticas; por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio deben ser cuidadosamente extrapolados a otros grupos étnicos; (iv) el diseño de este estudio es considerado exploratorio ya que fue realizado solamente en el Hospital del Niño y la Mujer y las participantes presentaban características sociodemográficas similares, que podrían no representar a toda la población mexicana. Además, el número pequeño de muestra, que fue asociado a una alta tasa de deserción de las participantes (58.5%). Por lo tanto, es necesario realizar estudios prospectivos posteriores a gran escala para confirmar los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, es importante destacar que este es el primer estudio que lleva a cabo la determinación de los perfiles metabólicos y la identificación de biomarcadores séricos para el diagnóstico oportuno de DMG en mujeres mexicanas. Además del seguimiento del comportamiento de dichos metabolitos en la progresión del embarazo.

Perspectivas

El presente estudio presenta perspectivas interesantes que deben ser atendidas en estudios futuros, tales como (i) realizar el análisis cuantitativo de los metabolitos candidatos a biomarcador propuestos, con el fin de poder obtener, a través de las curvas ROC, los puntos de corte que puedan identificar a las mujeres con riesgo de desarrollar DMG en el primer trimestre de gestación; (ii) estudiar la variabilidad de los metabolitos candidatos a biomarcador resultantes ante covariables relevantes como IMC, edad, gravidez, glucosa, triglicéridos, entre otros; (iii) realizar la integración de las redes metabólicas implicadas con los datos obtenidos en el perfil metabólico para entender las alteraciones en el metabolismo de las mujeres que desarrollan DMG en los tres trimestres de gestación, lo que contribuiría en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad.

8. Referencias bibliográficas

Abbiss, H., Maker, G. L., & Trengove, R. D. (2019). Metabolomics Approaches for the Diagnosis and Understanding of Kidney Diseases. *Metabolites*, 9(2).

<https://doi.org/10.3390/metabo9020034>

Abell, S. K., De Courten, B., Boyle, J. A., & Teede, H. J. (2015). Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus.

International Journal of Molecular Sciences, 16(6), 13442–13473.

<https://doi.org/10.3390/ijms160613442>

Alanbay, I., Coksuer, H., Ercan, M., Keskin, U., Karasahin, E., Ozturk, M., Tapan, S., Ozturk, O., Kurt, I., & Ergun, A. (2012). Can serum gamma-glutamyltransferase levels be useful at diagnosing gestational diabetes mellitus? *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 28(3), 208–211.

<https://doi.org/10.3109/09513590.2011.588756>

Alfadhli, E. M. (2015). Gestational diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, 36(4), 399–406.

<https://doi.org/10.15537/smj.2015.4.10307>

American Diabetes Association. (2017). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 40(Supplement 1), S11–S24.

<https://doi.org/10.2337/dc17-S005>

American Diabetes Association. (2019). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*, 42(Supplement 1), S13–S28.

<https://doi.org/10.2337/dc19-S002>

Arifin, S. A., & Falasca, M. (2016). Lysophosphatidylinositol Signalling and Metabolic Diseases. *Metabolites*, 6(1).

<https://doi.org/10.3390/metabo6010006>

Arneth, B., Arneth, R., & Shams, M. (2019). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10).

<https://doi.org/10.3390/ijms20102467>

Baker, A. M., Haeri, S., Camargo, C. A., Stuebe, A. M., & Boggess, K. A. (2012). First-trimester maternal vitamin D status and risk for gestational diabetes (GDM) a nested case-control study. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(2), 164–168.

<https://doi.org/10.1002/dmrr.1282>

Baz, B., Riveline, J.-P., & Gautier, J.-F. (2016). ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY:

Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *European Journal of Endocrinology*, 174(2), R43-51. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0378>

Benninger, R. K. P., & Hodson, D. J. (2018). New Understanding of β -Cell Heterogeneity and In Situ Islet Function. *Diabetes*, 67(4), 537–547. <https://doi.org/10.2337/dbi17-0040>

Bentley-Lewis, R., Huynh, J., Xiong, G., Lee, H., Wenger, J., Clish, C., Nathan, D., Thadhani, R., & Gerszten, R. (2015). Metabolomic profiling in the prediction of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*, 58(6), 1329–1332. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3553-4>

Berggren, E. K., Presley, L., Amini, S. B., Mouzon, S. H., & Catalano, P. M. (2015). Are the metabolic changes of pregnancy reversible in the first year postpartum? *Diabetologia*, 58(7), 1561–1568. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3604-x>

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Bowers, K., Tobias, D. K., Yeung, E., Hu, F. B., & Zhang, C. (2012). A prospective study of prepregnancy dietary fat intake and risk of gestational diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(2), 446–453. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.026294>

Catalano, P. M. (2014). Trying to understand gestational diabetes. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 31(3), 273–281. <https://doi.org/10.1111/dme.12381>

Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D., & Brunetti, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: An updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(9), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0607-5>

Coustan, D. R. (2013). Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*, 59(9), 1310–1321. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203331>

Dainelli, L., Prieto-Patron, A., Silva-Zolezzi, I., Sosa-Rubi, S. G., Espino y Sosa, S., Reyes-Muñoz, E., Lopez-Ridaura, R., & Detzel, P. (2018). Screening and management of gestational diabetes in Mexico: Results from a survey of multilocation, multi-health care institution practitioners. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 11, 105–116. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S160658>

- Dias, S., Pheiffer, C., Abrahams, Y., Rheeder, P., & Adam, S. (2018). Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102926>
- Eyth, E., Basit, H., & Smith, C. J. (2019). Glucose Tolerance Test. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532915/>
- Fasshauer, M., Blüher, M., & Stumvoll, M. (2014). Adipokines in gestational diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *2*(6), 488–499. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70176-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70176-1)
- Filardi, T., Panimolle, F., Crescioli, C., Lenzi, A., & Morano, S. (2019). Gestational Diabetes Mellitus: The Impact of Carbohydrate Quality in Diet. *Nutrients*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071549>
- Filla, L. A., & Edwards, J. L. (2016). Metabolomics in diabetic complications. *Molecular BioSystems*, *12*(4), 1090–1105. <https://doi.org/10.1039/c6mb00014b>
- Freinkel, N. (1980). Banting Lecture 1980: Of Pregnancy and Progeny. *Diabetes*, *29*(12), 1023–1035. <https://doi.org/10.2337/diab.29.12.1023>
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, *18*(6), 499–502.
- Gan, W. Z., Ramachandran, V., Lim, C. S. Y., & Koh, R. Y. (2019). Omics-based biomarkers in the diagnosis of diabetes. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0120>
- Gao, J., Xu, B., Zhang, X., Cui, Y., Deng, L., Shi, Z., Shao, Y., & Ding, M. (2016). Association between serum bile acid profiles and gestational diabetes mellitus: A targeted metabolomics study. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *459*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.026>
- Ghio, A., Bertolotto, A., Resi, V., Volpe, L., & Di Cianni, G. (2011). Triglyceride metabolism in pregnancy. *Advances in Clinical Chemistry*, *55*, 133–153. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387042-1.00007-1>
- Hajar Sharami, S., Abbasi Ranjbar, Z., Alizadeh, F., & Kazemnejad, E. (2019). The relationship of hyperlipidemia with maternal and neonatal outcomes in pregnancy: A cross-

sectional study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 17(10), 739–748.

<https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i10.5294>

Hasin, Y., Seldin, M., & Lusic, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, 18. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>

Hou, W., Meng, X., Zhao, A., Zhao, W., Pan, J., Tang, J., Huang, Y., Li, H., Jia, W., Liu, F., & Jia, W. (2018). Development of Multimarker Diagnostic Models from Metabolomics Analysis for Gestational Diabetes Mellitus (GDM). *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 17(3), 431–441. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000121>

James-Allan, L. B., Rosario, F. J., Barner, K., Lai, A., Guanzon, D., McIntyre, H. D., Lappas, M., Powell, T. L., Salomon, C., & Jansson, T. (2020). Regulation of glucose homeostasis by small extracellular vesicles in normal pregnancy and in gestational diabetes. *The FASEB Journal*, 34(4), 5724–5739. <https://doi.org/10.1096/fj.201902522RR>

Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>

Kind, T., Tsugawa, H., Cajka, T., Ma, Y., Lai, Z., Mehta, S. S., Wohlgemuth, G., Barupal, D. K., Showalter, M. R., Arita, M., & Fiehn, O. (2018). Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(4), 513–532. <https://doi.org/10.1002/mas.21535>

Lappas, M., Mundra, P. A., Wong, G., Huynh, K., Jinks, D., Georgiou, H. M., Permezel, M., & Meikle, P. J. (2015). The prediction of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus using lipidomics. *Diabetologia*, 58(7), 1436–1442. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3587-7>

Law, K. P., Mao, X., Han, T.-L., & Zhang, H. (2017). Unsaturated plasma phospholipids are consistently lower in the patients diagnosed with gestational diabetes mellitus throughout pregnancy: A longitudinal metabolomics study of Chinese pregnant women part 1. *Clinica Chimica Acta*, 465, 53–71. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.010>

Liu, B., Song, L., Zhang, L., Wang, L., Wu, M., Xu, S., Cao, Z., & Wang, Y. (2020).

Higher Numbers of Pregnancies Associated With an Increased Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus: Results From the Healthy Baby Cohort Study. *Journal of Epidemiology*,

30(5), 208–212. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20180245>

Liu, T., Li, J., Xu, F., Wang, M., Ding, S., Xu, H., & Dong, F. (2016). Comprehensive analysis of serum metabolites in gestational diabetes mellitus by UPLC/Q-TOF-MS.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408(4), 1125–1135.

<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9211-3>

Lorenzo, P. I., Martín-Montalvo, A., Cobo Vuilleumier, N., & Gauthier, B. R. (2019a).

Molecular Modelling of Islet β -Cell Adaptation to Inflammation in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24).

<https://doi.org/10.3390/ijms20246171>

Lorenzo, P. I., Martín-Montalvo, A., Cobo Vuilleumier, N., & Gauthier, B. R. (2019b).

Molecular Modelling of Islet β -Cell Adaptation to Inflammation in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24).

<https://doi.org/10.3390/ijms20246171>

Lowe, W. L., Scholtens, D. M., Lowe, L. P., Kuang, A., Nodzenski, M., Talbot, O., Catalano, P. M., Linder, B., Brickman, W. J., Clayton, P., Deerochanawong, C., Hamilton, J., Josefsen, J. L., Lashley, M., Lawrence, J. M., Lebenthal, Y., Ma, R., Maresh, M., McCance, D., ... HAPO Follow-up Study Cooperative Research Group. (2018).

Association of Gestational Diabetes With Maternal Disorders of Glucose Metabolism and Childhood Adiposity. *JAMA*, 320(10), 1005–1016.

<https://doi.org/10.1001/jama.2018.11628>

Mack, L. R., & Tomich, P. G. (2017). Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 44(2), 207–217.

<https://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.02.002>

Makgoba, M., Nelson, S. M., Savvidou, M., Messow, C.-M., Nicolaidis, K., & Sattar, N.

(2011). First-trimester circulating 25-hydroxyvitamin D levels and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 34(5), 1091–1093.

<https://doi.org/10.2337/dc10-2264>

Mao, X., Chen, X., Chen, C., Zhang, H., & Law, K. P. (2017). Metabolomics in gestational diabetes. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 475, 116–127.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.10.019>

- Mao, Z., & Zhang, W. (2018). Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072043>
- Massart, J., & Zierath, J. R. (2019). Role of Diacylglycerol Kinases in Glucose and Energy Homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 30(9), 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.06.003>
- McCabe, C. F., & Perng, W. (2017). Metabolomics of Diabetes in Pregnancy. *Current Diabetes Reports*, 17(8), 57. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0890-3>
- Merkx, A., Ausems, M., Budé, L., de Vries, R., & Nieuwenhuijze, M. J. (2015). Weight gain in healthy pregnant women in relation to pre-pregnancy BMI, diet and physical activity. *Midwifery*, 31(7), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.midw.2015.04.008>
- Mitanchez, D., Yzydorczyk, C., Siddeek, B., Boubred, F., Benahmed, M., & Simeoni, U. (2015). The offspring of the diabetic mother – Short- and long-term implications. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 29(2), 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.08.004>
- Moon, J. H., Kwak, S. H., & Jang, H. C. (2017). Prevention of type 2 diabetes mellitus in women with previous gestational diabetes mellitus. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 32(1), 26–41. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.203>
- Nanditha, A., Ma, R. C. W., Ramachandran, A., Snehalatha, C., Chan, J. C. N., Chia, K. S., Shaw, J. E., & Zimmet, P. Z. (2016). Diabetes in Asia and the Pacific: Implications for the Global Epidemic. *Diabetes Care*, 39(3), 472–485. <https://doi.org/10.2337/dc15-1536>
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Cavan, D., Shaw, J. E., & Makaroff, L. E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>
- Pedersen, J. (1954). WEIGHT AND LENGTH AT BIRTH OF INFANTS OF DIABETIC MOTHERS. *Acta Endocrinologica*, 16(4), 330–342. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0160330>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Qiu, C., Enquobahrie, D. A., Frederick, I. O., Sorensen, T. K., Fernandez, M. A. L., David,

R. M., Bralley, J. A., & Williams, M. A. (2014). Early pregnancy urinary biomarkers of fatty acid and carbohydrate metabolism in pregnancies complicated by gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *104*(3), 393–400.

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.03.001>

Quintanilla Rodriguez, B. S., & Mahdy, H. (2019). Gestational Diabetes. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545196/>

Rani, P. R., & Begum, J. (2016). Screening and Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus, Where Do We Stand. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *10*(4), QE01–QE04. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/17588.7689>

Renz, P. B., Cavagnoli, G., Weinert, L. S., Silveiro, S. P., & Camargo, J. L. (2015). HbA1c Test as a Tool in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *PLoS ONE*, *10*(8).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135989>

Reyes-Muñoz, E., Martínez-Herrera, E. M., Ortega-González, C., Arce-Sánchez, L., Ávila-Carrasco, A., Zamora-Escudero, R., Reyes-Muñoz, E., Martínez-Herrera, E. M., Ortega-González, C., Arce-Sánchez, L., Ávila-Carrasco, A., & Zamora-Escudero, R. (2017).

Valores de referencia de HOMA-IR y QUICKI durante el embarazo en mujeres mexicanas. *Ginecología y Obstetricia de México*, *85*(5), 306–313.

Roden, M. (2016). Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. *Wiener klinische Wochenschrift*, *128*(2), 37–40. <https://doi.org/10.1007/s00508-015-0931-3>

Sosa-Rubi, S. G., Dainelli, L., Silva-Zolezzi, I., Detzel, P., Sosa, S. E. y, Reyes-Muñoz, E., Chivardi, C., Ortiz-Panozo, E., & Lopez-Ridaura, R. (2019). Short-term health and economic burden of gestational diabetes mellitus in Mexico: A modeling study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *153*, 114–124.

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.05.014>

Souza, R. T., Mayrink, J., Leite, D. F., Costa, M. L., Calderon, I. M., Rocha, E. A., Vettorazzi, J., Feitosa, F. E., & Cecatti, J. G. (2019). Metabolomics applied to maternal and perinatal health: A review of new frontiers with a translation potential. *Clinics*, *74*.

<https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e894>

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>

Szmuilowicz, E. D., Josefson, J. L., & Metzger, B. E. (2019). Gestational Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 48(3), 479–493. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.05.001>

Weerakiet, S., Lertnarkorn, K., Panburana, P., Pitakitronakorn, S., Vesathada, K., & Wansumrith, S. (2006). Can adiponectin predict gestational diabetes? *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 22(7), 362–368. <https://doi.org/10.1080/09513590600818919>

Wójcik, M., Chmielewska-Kassassir, M., Grzywnowicz, K., Woźniak, L., & Cypryk, K. (2014). The relationship between adipose tissue-derived hormones and gestational diabetes mellitus (GDM). *Endokrynologia Polska*, 65(2), 134–142. <https://doi.org/10.5603/EP.2014.0019>

Yannell, K. E., Ferreira, C. R., Tichy, S., & Cooks, R. G. (2018). Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Profiling with Biomarker Identification by LC-QTOF to Characterize Coronary Artery Disease. *The Analyst*, 143(20), 5014–5022. <https://doi.org/10.1039/c8an01017j>

Anexo A. Aprobación de bioética

C.U., Querétaro, 27 de mayo de 2020
No. de oficio, CBQ20/059

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Facultad de Química
Presente

At'n. Karla Liliana García Mejía

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado "**Identificación de metabolitos séricos para el diagnóstico oportuno de diabetes mellitus gestacional**", del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado**, con base en la resolución emitida en el dictamen CBQ19/007.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



Dra. Minerva Ramos Gómez
Secretaría



Dr. Bah Mamadou Moustapha
Representante investigador

Cop archivo

Anexo B. Consentimiento informado

Carta de consentimiento informado para participar en la investigación con la Universidad Autónoma de Querétaro

La **diabetes mellitus gestacional** se caracteriza por tener la concentración de glucosa elevada en sangre solamente durante el embarazo, es diagnosticada en el segundo trimestre de embarazo. Dicha enfermedad tiene que ser monitoreada cuando esta se diagnostique, debido a que puede conllevar complicaciones durante y después del embarazo; por ejemplo: usted puede llegar a padecer diabetes mellitus tipo 2 después del embarazo en un lapso de 2-5 años, infecciones en vías urinarias, su bebe puede llegar a padecer macrosomía (talla y peso elevado al nacer), los niños pueden padecer obesidad en su infancia. Estadísticamente la diabetes mellitus gestacional tiene una incidencia del 3-10 % a nivel mundial, por lo que se considera una cifra alarmante.

La Q.F.B. Claudia Ivonne Briones Hernández ha solicitado su consentimiento para que lleve a cabo una serie de evaluaciones con el fin de obtener información y muestras sanguíneas que le brindarán información necesaria para realizar su proyecto de investigación: **Identificación de un panel de biomarcadores para el diagnóstico temprano de diabetes mellitus gestacional.**

El fin de la investigación es identificar biomarcadores de diagnóstico temprano para la diabetes mellitus gestacional, esto con el fin de crear una herramienta preventiva para el tratamiento y acompañamiento en pacientes con diabetes mellitus gestacional y que además tiene como fin la realización de tesis para la obtención de grado académico de Maestro Química Clínica Diagnóstica.

Para poder participar en el procedimiento, será necesario generar un expediente, que servirá como herramienta para la extracción de información, para esto, deberá de cumplir con los siguientes criterios:

- Tener entre 18 y 40 años
- Ascendencia mexicana
- Estar en el primer trimestre de gestación

Una vez cumplidos los criterios mencionados, y si acepta formar parte del presente proyecto de investigación, se integrará en los siguientes procedimientos los cuales se llevarán a cabo en sus visitas pre-natales. Elaboración de expediente personal.

- Historial clínico prenatal
 - La información prenatal será obtenida de la información recopilada por el medico en sus consultas prenatales.
- Cuestionario de hábitos alimenticios
 - Se aplicará una encuesta de frecuencia de alimentos, con el fin de conocer cuáles han sido sus hábitos alimentarios durante el trimestre.
- Medición de parámetros antropométricos y presión arterial.
 - Se realizará la medición de estatura, peso, circunferencia de cintura y circunferencia de cadera, con el fin de identificar si presenta sobrepeso u obesidad.
 - Es necesario que se presente en pants o short, playera de manga corta o top, sin pulseras y/o objetos metálicos.
- Toma de muestra de sangre.
 - Se realizará la toma de una muestra de 5 mL de sangre de su brazo no dominante.
 - Es necesario que se presente con un ayuno de 8 h.

Riesgos. No existen riesgos potenciales por su participación en este estudio, sin embargo, puede ser que la toma de muestra de sangre le cause un poco de dolor a usted y que se presente un pequeño moretón (esto depende de la sensibilidad de la piel). No a todos les pasa; estas molestias son normales. La toma de muestra de sangre se hará por personal calificado y utilizando material estéril y desechable. En caso de presentar algún malestar como resultado directo de la toma muestra de este estudio, se le brindará atención médica gratuita. De llegar a padecer diabetes gestacional puede llegar a presentar algunas complicaciones (infecciones urinarias, aumento en el tamaño del feto, llegar a presentar diabetes tipo II) a las cuales se le dará seguimiento médico para que no lleguen a presentarse, al igual que se le recomendará con un nutriólogo para tratar la dieta adecuada.

Beneficios. Todos los procedimientos del estudio se proporcionarán sin ningún costo para usted. Recibirá los resultados de los análisis de glucosa y perfil de lípidos de cada trimestre, así como los resultados del diagnóstico de diabetes mellitus gestacional. Además, con su participación en este estudio contribuirá a la generación de información científica con respecto a la identificación de nuevas herramientas para identificar de manera temprana la diabetes mellitus gestacional.

Confidencialidad: Su participación en este estudio será confidencial, es decir, no se hará referencia de usted, de su hijo o de su familia por su nombre en ningún reporte del estudio. Se asigna un número de caso y las iniciales para cada participante. Sólo los investigadores y médicos del estudio contarán con sus datos completos. La Universidad Autónoma de Querétaro manejará los datos con números de identificación, códigos e iniciales y por ningún motivo será revelada la identidad de su hijo(a).

Participación voluntaria: Su participación es voluntaria y es su decisión. Si usted desea abandonar el estudio puede hacerlo con previo aviso a [Q.F.B. Iza Fernanda Pérez Ramírez], [No. Telefónico (442) 192-1200 extensión 5586, correo electrónico: iza.perez@uaq.mx] Si usted acepta participar, se compromete a proporcionar información veraz y seguir las instrucciones del estudio, además de acudir a sus citas programadas.

Información de contacto. Si tiene alguna pregunta acerca de su participación en el estudio o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar a su médico de confianza. En caso de que usted quiera ampliar la información acerca del proyecto usted puede comunicarse con la investigadora responsable del proyecto, la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez de la UAQ, al teléfono (442) 192-1200 extensión 5586.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo entiendo que mi participación es voluntaria y que tengo el derecho de no aceptar participar en el proyecto, si esta es mi decisión. Entiendo que yo me puedo retirar del estudio en cualquier momento, incluso cuando éste ya haya comenzado. Yo he leído o me han leído esta información y se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio. Las respuestas a mis preguntas fueron resueltas de manera satisfactoria y se me ha dado una copia de este consentimiento. He recibido la explicación del estudio y sus términos. Libremente y sin presión alguna doy mi consentimiento para participar en este estudio.

Participante:

Nombre: _____

Domicilio: _____

Teléfono fijo: _____ Teléfono móvil: _____

Firma: _____ **Fecha:** _____

Testigo 1:

Nombre: _____

Domicilio: _____

Teléfono fijo: _____ Teléfono móvil: _____

Firma: _____ **Fecha:** _____

Testigo 2:

Nombre: _____

Domicilio: _____

Teléfono fijo: _____ Teléfono móvil: _____

Firma: _____ **Fecha:** _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Yo o mi representante hemos discutido con el participante la naturaleza y propósito del estudio, así como los posibles riesgos y beneficios de su participación. Considero que el participante ha recibido la información completa con un lenguaje comprensible y apropiado, además de haberle contestado sus dudas.

INVESTIGADOR RESPONSABLE O REPRESENTANTE

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Anexo C. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).

De este proyecto de investigación se generarán muestras de sangre y objetos punzocortantes es por ello por lo que es necesario conocer y realizar lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Se debe cumplir con las disposiciones correspondientes a las siguientes fases de manejo, según el caso:

Identificación y envasado: en las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme a la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

Tipo de residuo	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLOGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo).

Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse,

destruible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique “RESIDUOS PELIGROSOS LIQUIDOS BIOLOGICO-INFECCIOSOS” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo)

Los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes y líquidos se llenarán hasta el 80% de su capacidad, asegurándose los dispositivos de cierre y no deberán ser abiertos o vaciados.

Almacenamiento temporal: de los residuos peligrosos biológico-infecciosos para evitar que se mezclen con la basura común, en contenedores metálicos o de plástico con tapa. Deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final.

Apéndice Normativo. Símbolo Universal De Riesgo Biológico

