



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Maestría en Química Clínica Diagnóstica



“Propuesta de biomarcadores proteicos séricos para el diagnóstico oportuno y progresión de la diabetes gestacional”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

QFB Samantha Arias Covarrubias

Dirigida por:

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Co-dirigido por:

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Santiago de Querétaro, Querétaro de Arteaga

Diciembre, 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica



“Propuesta de biomarcadores proteicos séricos para el diagnóstico oportuno y progresión de la diabetes gestacional”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

QFB Samantha Arias Covarrubias

Dirigido por:

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Co-dirigido por:

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente

Dr. José Antonio Enciso Moreno
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

M.I.M David Gustavo García Gutiérrez_
Suplente

Dra. Karla Isabel Lira De León
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre, 2020
México

Dedicatorias

A Dios, por acompañarme a lo largo de este camino y brindarme la fortaleza para finalizar una etapa más de mi vida. Gracias por siempre estar a mi lado en cada momento.

A mis papás Raquel y Juan Manuel, por el amor y cariño que siempre me han brindado, gracias por el apoyo, los consejos, el ánimo que me brindaron para salir adelante y culminar este grado académico. Ambos son mi ejemplo a seguir, por ustedes sé que con esfuerzo y dedicación puedo lograr toda meta que me proponga. Los amo papás.

A mi hermana Leslie y mi cuñado Jorge, porque ustedes también forman parte de este logro. Gracias por estar a mi lado apoyándome y alentándome cada día para finalizar este proyecto, gracias por cuidarme y estar al pendiente de mí a lo largo de estos dos años. Los quiero mucho.

A mi hermano Juan Manuel, gracias por todos los momentos y risas compartidas, gracias por tu apoyo incondicional y acompañarme en cada paso que dí a lo largo de este camino. Te quiero mucho hermanito.

A mi prometido Job Uriel, porque siempre estuviste a mi lado en cada momento de este trayecto brindándome tu apoyo, tus consejos, tu paciencia, gracias por siempre escucharme y alentarme que podía lograr todo objetivo que me propusiera sin importar las adversidades. Gracias por darme la fuerza para sacar adelante y finalizar este proyecto pero sobre todo, gracias por todos los momentos que compartiste conmigo. Te amo.

Samantha Arias Covarrubias

Agradecimientos

Agradezco sinceramente,

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química, por otorgarme la oportunidad de pertenecer a esta institución; gracias por permitirme realizar parte de mi proyecto en sus instalaciones.

A la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez, le agradezco infinitamente por haber depositado su confianza en mí para realizar este proyecto de investigación; gracias por orientarme, otorgarme su paciencia, sus conocimientos, su ayuda en todo momento y dirigirme de manera exitosa a culminar este maravilloso proyecto.

A mis sinodales; al Dr. José Antonio Enciso Moreno, por permitirme el ingreso a su laboratorio en la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas para llevar a cabo parte de este proyecto, gracias por el apoyo y los conocimientos brindados. Le agradezco la oportunidad de permitirme conocer a sus alumnos, fue una experiencia muy bonita. Al M.I.M David Gustavo García Gutiérrez, también le agradezco el ingreso a su laboratorio en la Unidad de Diagnóstico Molecular para finalizar el análisis de las muestras, gracias por su apoyo y las aportaciones otorgadas a dicho proyecto de investigación. Al Dr. Eduardo Castaño Tostado, muchas gracias por su apoyo y dedicación otorgada en la organización de la parte estadística de esta tesis. A la Dra. Karla Isabel Lira De León, por sus observaciones brindadas y apoyo durante el proceso de la escritura de la presente tesis.

A todos ustedes, miembros de mi comité de tesis, les agradezco infinitamente su asesoría y la disponibilidad brindada a lo largo de este tiempo.

Al Hospital del Niño y la Mujer de Querétaro y personal que labora en él, por recibirme para hacer uso de sus instalaciones con la finalidad de continuar con el reclutamiento de mujeres embarazadas para poder llevar a cabo nuestro proyecto de investigación de manera satisfactoria. Les agradezco el apoyo que me brindaron en todo momento.

A todas las mujeres embarazadas que aceptaron voluntariamente a formar parte de este estudio, sin ustedes no habríamos podido llegar a nuestras metas. Muchas gracias.

A CONACYT, le agradezco por la beca brindada en estos dos años que cursé la maestría. Es un gran apoyo que nos brindan a los alumnos de posgrado para poder enfocarnos completamente a nuestro proyecto de investigación. Infinitas gracias.

Samantha Arias Covarrubias

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice general

Índice de figuras	v
Índice de cuadros	viii
Siglas	x
Declaración de responsabilidad de estudiante:	1
Resumen	2
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Descripción del problema	4
1.2 Antecedentes	6
1.2.1 Diabetes mellitus gestacional	6
1.2.2 Epidemiología de la diabetes mellitus gestacional	7
1.2.3 Fisiopatología de la diabetes mellitus gestacional	8
1.2.4 Resistencia a la insulina	12
1.2.5 Factores de riesgo de la diabetes mellitus gestacional	14
1.2.6 Complicaciones de la diabetes mellitus gestacional	18
1.2.7 Diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional	19
1.2.8 Desventajas de las actuales herramientas diagnósticas de la diabetes mellitus gestacional	22
1.2.9 Nuevas propuestas para el diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional	22
1.2.9.1 Adiponectina	23
1.2.9.2 Proteína A plasmática asociada al embarazo	24
1.2.9.3 Proteína A2 plasmática asociada al embarazo	25
1.2.9.4 Proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina ...	26
1.2.9.5. Globulina fijadora de hormonas sexuales	28
1.2.9.6 Proteína de unión a retinol-4	30

1.2.9.7 Resistina	32
1.2.9.8. Proteína de unión a ácidos grasos 4	35
1.2.9.9 Afamina	36
1.3 Justificación	39
1.4 Hipótesis	40
1.5 Objetivo general	41
1.6 Objetivos específicos	41
2. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1 Diseño	42
2.1.1 Definición del universo	42
2.1.2 Tamaño de muestra	42
2.1.3 Definición de las unidades de observación	42
2.1.4 Definición del grupo control	43
2.1.5 Criterios de inclusión	43
2.1.6 Criterios de exclusión	43
2.1.7 Criterios de eliminación	43
2.1.8 Definición de variables y unidades de medida	44
2.1.9 Selección de fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información	46
2.1.9.1 Reclutamiento	46
2.1.9.2 Aplicación de encuestas	46
2.1.9.3 Obtención de muestras sanguíneas	46
2.1.9.4 Análisis bioquímico rutinario	46
2.1.9.5 Diagnóstico de diabetes mellitus gestacional mediante la curva de tolerancia a la glucosa oral.	47
2.1.9.6 Determinación de proteínas de interés	47
2.1.9.7 Cuantificación de las proteínas	51

2.1.10 Definición de plan de procesamiento y presentación de la información	56
2.1.11 Cronograma de actividades.....	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
3.1 Reclutamiento de las participantes	58
3.2 Datos clínicos de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG	60
3.3 Parámetros antropométricos y bioquímicos de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en cada trimestre de gestación.....	63
3.4 Determinación simultánea de las proteínas de interés en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer trimestre de embarazo	58
3.5 Red metabólica de mujeres embarazadas con DMG.....	69
3.6 Cuantificación de las proteínas en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG	72
3.6.1 Globulina fijadora de hormonas sexuales	73
3.6.2 Proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.....	75
3.6.3 Proteína de unión a ácidos grasos 4	77
3.7 Curvas ROC de SHBG, IGFBP-5 y FABP4 en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo	79
3.7.1 Curvas ROC en el primer trimestre de embarazo	80
3.7.2 Curvas ROC en el segundo trimestre de embarazo.....	81
3.7.3 Curvas ROC en el tercer trimestre de embarazo	83
3.8 Limitaciones del estudio.....	85
4. CONCLUSIONES.....	86
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
Anexo A. Carta de aprobación del Comité de Bioética.....	97

Anexo B. Carta de consentimiento informado para participar en investigación con la Universidad Autónoma de Querétaro	98
Anexo C. Datos clínicos y personales	104
Anexo D. Códigos R para PCA y Biplot del PCA.....	105

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de prevalencia mundial de DMG por regiones (fuente: McIntyre et al., 2019).....	8
Figura 2. Sensibilidad de las células beta, la glucemia y la insulina durante el embarazo normal (fuente: Plows et al., 2018).....	9
Figura 3. Sensibilidad de las células beta, la glucemia y la insulina durante la DMG (fuente: Plows et al., 2018).....	11
Figura 4. Señalización de la insulina (fuente: Plows et al., 2018).	13
Figura 5. Representación esquemática de la transducción de señales de adiponectina (fuente: Arunkumar & Sushil, 2017).....	23
Figure 6. Representación de la función de PAPP-A e IGFBP-4 en el sistema IGF-1 (fuente: Monget & Oxvig, 2016).....	25
Figura 7. Función de IGFBP-5 en el embarazo. TA: tejido adiposo (fuente: (Rojas-Rodríguez et al., 2015).	27
Figura 8. Modelo de unión de la SHBG a su receptor y sistema de señalización de la SHBG dependiente de AMPc (fuente: Kahn, 2002).....	28
Figura 9. Representación del mecanismo de acción de RBP4 (fuente: Graham & Kahn, 2007).....	31
Figura 10. Diagrama esquemático que muestra el papel de resistina en el desarrollo de DMG (fuente: Siddiqui & George, 2017).....	33
Figura 11. Principio del arreglo de anticuerpos G-Serie (fuente: Raybiotech, 2018).	48
Figura 12. Arreglo de anticuerpos G-serie (fuente: Raybiotech, 2018).	51
Figura 13. Principio de ELISA sándwich (fuente: Raybiotech, 2016).	52

Figura 14. Preparación de estándares de SHBG	53
Figura 15. Preparación de estándares de IGFBP-5	53
Figura 16. Preparación de estándares de FABP4	53
Figura 17. Curva estándar de SHBG	55
Figura 18. Curva estándar de IGFBP-5	55
Figura 19. Curva estándar de FABP4.....	55
Figura 20. Diagrama de reclutamiento de mujeres embarazadas. SDG: semanas de gestación.	58
Figura 21. Razones de deserción de las mujeres embarazadas reclutadas.	59
Figura 22. Distribución de la edad en el grupo de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG.....	62
Figura 23. Concentraciones séricas de glucosa 1 h (A) y 2 h (B) poscarga en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG.	55
Figura 24. Gráfico de PCA que muestra el patrón de agrupamiento de los sujetos de estudio de acuerdo a las intensidades de fluorescencia de las proteínas en el primer trimestre de gestación.	59
Figura 25. Biplot del PCA mostrando la contribución de cada variable en la discriminación de los grupos de estudio.....	60
Figura 26. Red metabólica de mujeres embarazadas con DMG.....	70
Figura 27. Implicación de las proteínas de interés en desórdenes del metabolismo de glucosa.	71
Figura 28. Implicación de las proteínas de interés en desarrollo de resistencia a la insulina.....	72

Figura 29. Concentraciones de SHBG en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo.....	75
Figura 30. Concentraciones séricas de IGFBP-5 en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo.	76
Figura 31. Concentraciones séricas de FABP4 en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo.	77
Figura 32. Curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el primer trimestre de embarazo.....	80
Figura 33. Curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el segundo trimestre de embarazo.....	82
Figura 34. Curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el tercer trimestre de embarazo.....	83

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ganancia de peso recomendada durante el embarazo (fuente: IMSS, 2016).....	15
Cuadro 2. Grupos de riesgo de diabetes mellitus gestacional (fuente: IMSS, 2016)	17
Cuadro 3. Criterios de diagnósticos de diabetes mellitus gestacional mediante la estrategia de un paso (fuente: ADA, 2020; PROY-NOM-015-SSA2-2018).....	20
Cuadro 4. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus gestacional mediante la estrategia de dos pasos (fuente: ADA, 2020).....	21
Cuadro 5. Estrategia de un paso para el diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (fuente: ADA, 2020).....	47
Cuadro 6. Semanas de gestación de las mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en cada trimestre de embarazo	60
Cuadro 7. Datos clínicos de las participantes del grupo con DMG y sin DMG.....	61
Cuadro 8. Parámetros antropométricos y bioquímicos de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación	54
Cuadro 9. Modelo de regresión lineal de SHBG.....	61
Cuadro 10. Modelo de regresión lineal de IGFBP-5.....	62
Cuadro 11. Modelo de regresión lineal de PAPP-A.....	63
Cuadro 12. Modelo de regresión lineal de RBP4	64
Cuadro 13. Modelo de regresión lineal de FABP4	65
Cuadro 14. Análisis estadístico de las 9 proteínas de interés en el primer trimestre de gestación	67

Cuadro 15. AUC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el primer trimestre de embarazo	81
Cuadro 16. AUC de FABP4, SHBG e IGFBP5 en el segundo trimestre de embarazo	82
Cuadro 17. AUC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el tercer trimestre de embarazo	84

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

Siglas

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADIPOQ	Adiponectina
AFM	Afamina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANCOVA	Análisis de covarianza
AUC	Área bajo la curva
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CTGO	Curva de tolerancia a la glucosa oral
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos 4
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IADPSG	Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina-1
IGFBP-4	Proteína de unión al factor de crecimiento 4 similar a la insulina
IGFBP-5	Proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina
IGFBPs	Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IKK	I κ B quinasa
IMC	Índice de masa corporal
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IR	Receptor de insulina
IRS 1 / 2	Sustrato del receptor de insulina 1 / 2
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH	Lipasa hepática
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Análisis de Componentes Principales
PAPP-A	Proteína A plasmática asociada al embarazo
PAPP-A	Proteína A2 plasmática asociada al embarazo

PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGF	Factor de crecimiento placentario
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfato
PKC	Proteína quinasa C
NDD	Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes
NOM	Norma Oficial Mexicana
RBP4	Proteína de unión a retinol-4
RETN	Resistina
ROC	Curva característica operativa del receptor
SDG	Semanas de gestación
sEng	Endoglina soluble
SFit-1	Tirosina quinasa-1 soluble similar a fms
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
TA	Tejido adiposo
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

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 UMO

Resumen

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es un estado hiperglucémico con primer reconocimiento durante el segundo o tercer trimestre del embarazo que genera complicaciones maternas y fetales. Actualmente el diagnóstico se realiza entre las semanas 24-28 de gestación empleando la curva de tolerancia a la glucosa oral, lo que conlleva a un diagnóstico tardío. Las proteínas ADIPOQ, PAPP-A, PAPP-A2, IGFBP-5, AFM, SHBG, FABP4, RBP4 y RETN han sido propuestas como posibles biomarcadores para el diagnóstico de DMG en el primer trimestre de gestación. Por lo tanto, este proyecto tuvo como objetivo evaluar estas nueve proteínas como candidatos a biomarcadores para incrementar la capacidad predictiva del diagnóstico oportuno y progresión de la DMG en mujeres mexicanas. Para ello, 200 mujeres embarazadas fueron reclutadas en su primer trimestre de gestación y se obtuvieron las muestras sanguíneas en cada trimestre de embarazo, realizando el diagnóstico de DMG en el segundo trimestre siguiendo los lineamientos internacionales. Al finalizar el reclutamiento, 19 mujeres embarazadas con DMG y 15 sin DMG cumplieron los criterios de inclusión/exclusión. Se determinaron las nueve proteínas de interés en muestras séricas obtenidas en el primer trimestre de gestación por medio de un arreglo de anticuerpos. El análisis multivariado y de regresión lineal permitió la identificación de tres proteínas como candidatas a biomarcador para el diagnóstico temprano (semanas 11-14 de gestación) de DMG: SHBG, IGFBP-5 y FABP4. Posteriormente, se realizó la cuantificación de dichas proteínas por medio de kits de ELISA en cada trimestre de gestación. De acuerdo con el análisis de las curvas características operativas del receptor (ROC), la proteína FABP4 presentó la mayor sensibilidad y especificidad para discriminar los grupos de estudio en el primer trimestre de gestación, por lo que puede ser propuesta como biomarcador para el diagnóstico temprano de DMG. Sin embargo, no puede ser utilizada para el monitoreo de la enfermedad, ya que su sensibilidad y especificidad disminuyó conforme progresó el embarazo.

Palabras clave: diabetes mellitus gestacional; diagnóstico temprano; biomarcadores; proteínas.

Abstract

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a hyperglycemic state with first recognition during the second or third trimester of pregnancy that generates maternal and fetal complications. Currently, the diagnosis is carried out between the 24-28th gestation weeks by an oral glucose tolerance test, leading to a late diagnosis. The proteins ADIPOQ, PAPP-A, PAPP-A2, IGFBP-5, AFM, SHBG, FABP4, RBP4 and RETN have been proposed as possible biomarkers for the diagnosis of GDM in the first trimester of gestation. Therefore, the aim of this study was to evaluate these nine proteins as biomarker candidates in Mexican women in order to increase the predictive capacity for the early diagnosis and progression of GDM. In this study, 200 pregnant Mexican women were recruited in their first trimester of pregnancy, serum samples were recollected in each trimester and the DMG diagnosis was carried out in the second trimester following the international guidelines. At the end of the recruitment process, only 19 pregnant women with DMG and 15 without DMG fulfilled the inclusion/exclusion criteria. The nine proteins of interest were determined in the serum samples obtained in the first trimester of pregnancy using an antibody array. The multivariate and lineal regression analyses allowed the identification of three proteins as biomarker candidates for the early diagnosis (11-14th gestation weeks) of DMG: SHBG, IGFBP-5 y FABP4. Then, the quantification of these three proteins was carried out using ELISA kits in each trimester of pregnancy. According to the analysis of the receptor operating characteristic (ROC) curves, the FABP4 protein showed the highest sensitivity and specificity for the discrimination of the study groups in the first trimester of pregnancy; therefore, this protein can be proposed as a biomarker candidate for DMG early diagnosis. However, this protein cannot be proposed for monitoring the progression of the disease, since its sensitivity and specificity decreased as the pregnancy advanced.

Keywords: gestational diabetes mellitus; early diagnosis; biomarkers; proteins.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Descripción del problema

La DMG es una condición temporal que se caracteriza por un estado hiperglucémico con inicio o primer reconocimiento durante el segundo o tercer trimestre del embarazo y es una complicación cada vez más frecuente. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), se estima que existe una prevalencia de DMG a nivel mundial del 16.2%, mientras que en México se ha reportado una prevalencia que va del 8.7 al 17.7%.

Las mujeres con DMG son más propensas a experimentar DMG recurrente en futuros embarazos, tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en el futuro y enfermedades cardiovasculares; así como mayores tasas de parto asistido y cesárea. Además, la DMG o hiperglucemia mal controlada durante el embarazo contribuye a la hiperinsulinemia e hiperglucemia fetal, lo que conduce a un sobrecrecimiento fetal, que incluye macrosomía (peso al nacer superior a 4 kg) así como un mayor riesgo de afecciones metabólicas como la obesidad y DM2 en la vida adulta del recién nacido. Estos posibles resultados adversos tanto en la madre como en la descendencia respaldan la importancia de diagnosticar y manejar oportunamente la DMG.

En la actualidad, los factores de riesgo clínico como edad, índice de masa corporal (IMC), raza/etnia, antecedentes familiares de diabetes e historia de DMG en un embarazo anterior, se utilizan para identificar a las mujeres que se beneficiarían de la detección oportuna de DMG durante el primer trimestre de embarazo. Debido a que la DMG es una enfermedad que se manifiesta en el contexto de una resistencia profunda a la insulina fisiológica, que se intensifica en el segundo trimestre, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG, por sus siglas en inglés) recomiendan que el diagnóstico de DMG se lleve a cabo en el segundo o tercer trimestre del embarazo (24-28 semanas de gestación) en mujeres

de bajo y moderado riesgo así como en las pacientes de alto riesgo que tuvieron resultado de glucosa normal en la primera visita prenatal.

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) y PROY-NOM-015-SSA2-2018 establece que el diagnóstico de DMG se puede realizar mediante dos estrategias: (i) un solo paso: curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO) de 75 g; o (ii) dos pasos: tamizaje con carga oral de 50 g de glucosa, de ser positiva se realiza confirmación con curva de tolerancia a la glucosa oral de 100 g.

Las estrategias para identificar a las mujeres en riesgo de DMG lo más temprano posible durante el embarazo pueden ser ventajosas, ya que se puede evitar la exposición intrauterina a la hiperglucemia. Los factores de riesgo clínico para DMG están bien descritos; sin embargo, estudios previos en los que se les ha dado consejos sobre el estilo de vida a las mujeres que presentan factores de riesgo para el desarrollo de la DMG no han demostrado ser beneficiosos para prevenir su desarrollo. Por lo que el empleo de biomarcadores para el diagnóstico temprano en el primer trimestre podrían distinguir de manera más efectiva a las mujeres con alto riesgo de DMG. Así mismo, dicha estrategia permitiría la eliminación de exámenes adicionales en mujeres de bajo riesgo y la iniciación de medidas tempranas de prevención y tratamiento en mujeres de alto riesgo, y por lo tanto, se disminuiría el desarrollo de efectos adversos maternos y fetales.

Los biomarcadores para el diagnóstico temprano y monitoreo de la progresión de la DMG podrían incluir proteínas que se encuentran afectadas durante el desarrollo de la enfermedad como lo son ADIPOQ, SHBG, PAPP-A, PAPP-A2, AFABP, AFM, RBP4, RETN e IGFBP-5 (Bawah et al., 2019; Dereke et al., 2019; Farina et al., 2017; Jin et al., 2020; Königer et al., 2018; Tu et al., 2017; Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2017).

Antecedentes

1.2.1 Diabetes mellitus gestacional

La DMG se definió durante muchos años como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se reconoce por primera vez durante el embarazo (ADA, 2020). Sin embargo, esta definición presenta la limitación que no distingue aquellas mujeres con diabetes mellitus (DM) no diagnosticada antes del embarazo que incluye DM2 y en raras ocasiones, diabetes mellitus tipo 1 (DM1) o diabetes monogénica (Johns et al., 2018).

Con la finalidad de distinguir a las mujeres con probable diabetes preexistente que se reconoce por primera vez en el embarazo de aquellas mujeres que están presentando una intolerancia transitoria a los carbohidratos debido a la resistencia a la insulina relacionada con el embarazo, la ADA y la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia definen DMG como “diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no era claramente diabetes manifiesta antes de la gestación” (ADA, 2020; Denney & Quinn, 2018; Piper et al., 2017).

En dicha patología, las mujeres sin un diagnóstico previo de diabetes presentan niveles anormales de glucosa en sangre durante el embarazo, valores que están por encima de lo normal, pero aún están por debajo del diagnóstico de diabetes mellitus (Mack & Tomich, 2017).

La DMG existe como un trastorno transitorio durante el periodo de gestación y se resuelve una vez que finaliza el embarazo en la mayoría de las pacientes. Sin embargo, las mujeres embarazadas con hiperglucemia tienen un mayor riesgo de desarrollar DMG en embarazos posteriores y aproximadamente la mitad de las mujeres con antecedentes de DMG desarrollarán DM2 dentro de 3 a 6 años posteriores al parto (IDF, 2019).

1.2.2 Epidemiología de la diabetes mellitus gestacional

La incidencia de DMG alrededor del mundo está aumentando a un ritmo alarmante. Se estima que la DMG afecta el 10-15% de los embarazos en comparación con el 3-5% de los embarazos antes del siglo XXI. Esto es debido al incremento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad, que afecta hasta el 50% de las mujeres en edad reproductiva, ocasionando un aumento en la incidencia de DMG a nivel mundial. Además, la edad materna avanzada de la población reproductiva y el estilo de vida sedentaria también ha contribuido a aumentar la prevalencia de resultados adversos maternos (Denney & Quinn, 2018; Rodrigo & Glastras, 2018).

De acuerdo con las estimaciones de la IDF, se calcula que en 2019 hubo 20,4 millones de nacidos vivos, lo que representa el 15,8%, que sufrieron algún tipo de hiperglucemia durante el embarazo. De los cuales, el 83.6% se debió a la DMG (IDF, 2019).

La prevalencia mundial de DMG varía de 1% a >30%. Es difícil compararla entre países y regiones, debido a la falta de uniformidad en los estándares de detección y los criterios de diagnóstico para DMG. La prevalencia de DMG es más alta en el medio oriente y algunos países del norte de África (15.2%), seguido por el sudeste de Asia (15%), el Pacífico Occidental (10.3%), América del Sur y Central (11.2%), África Subsahariana (10.8%), América del Norte y el Caribe (7.0%) y Europa (6.1%) (McIntyre et al., 2019). En la Figura 1 se ilustran las prevalencias de DMG por regiones.

Por otro lado, en México se ha reportado una prevalencia de DMG que va del 8.7 al 17.7% (IMSS, 2016)



Figura 1. Mapa de prevalencia mundial de DMG por regiones (fuente: McIntyre et al., 2019)

1.2.3 Fisiopatología de la diabetes mellitus gestacional

Durante un embarazo saludable, se producen innumerables cambios fisiológicos para promover el crecimiento y el desarrollo del feto. Una adaptación metabólica importante es la sensibilidad a la insulina, ya que ésta cambia durante el transcurso de la gestación, según los requisitos del embarazo (Denney & Quinn, 2018; Plows et al., 2018).

Al inicio del embarazo, la sensibilidad a la insulina aumenta con la finalidad de promover la captación de glucosa en tejido adiposo en modo de preparación para las demandas de energía del embarazo tardío (Plows et al., 2018). Sin embargo, a medida que avanza el embarazo los tejidos maternos desarrollan gradualmente resistencia a la insulina, con un aumento recíproco en la secreción de insulina y una reducción de la eliminación de glucosa en todo el cuerpo para mantener la euglucemia (niveles plasmáticos normales de glucosa) (Rodrigo & Glastras, 2018).

Las mujeres con un embarazo saludable compensan estos cambios mediante la hipertrofia e hiperplasia de las células β del páncreas para aumentar la secreción

de insulina. Como resultado, la glucosa en sangre aumenta a medida que disminuye la sensibilidad a la insulina y se transporta a la placenta para impulsar el crecimiento del feto. Después del embarazo, las células β , la glucosa en la sangre y la sensibilidad a la insulina vuelven a la normalidad (Plows et al., 2018). En la Figura 2 se proporciona un diagrama de la relación entre la disfunción de las células β y la glucemia en el embarazo normal.

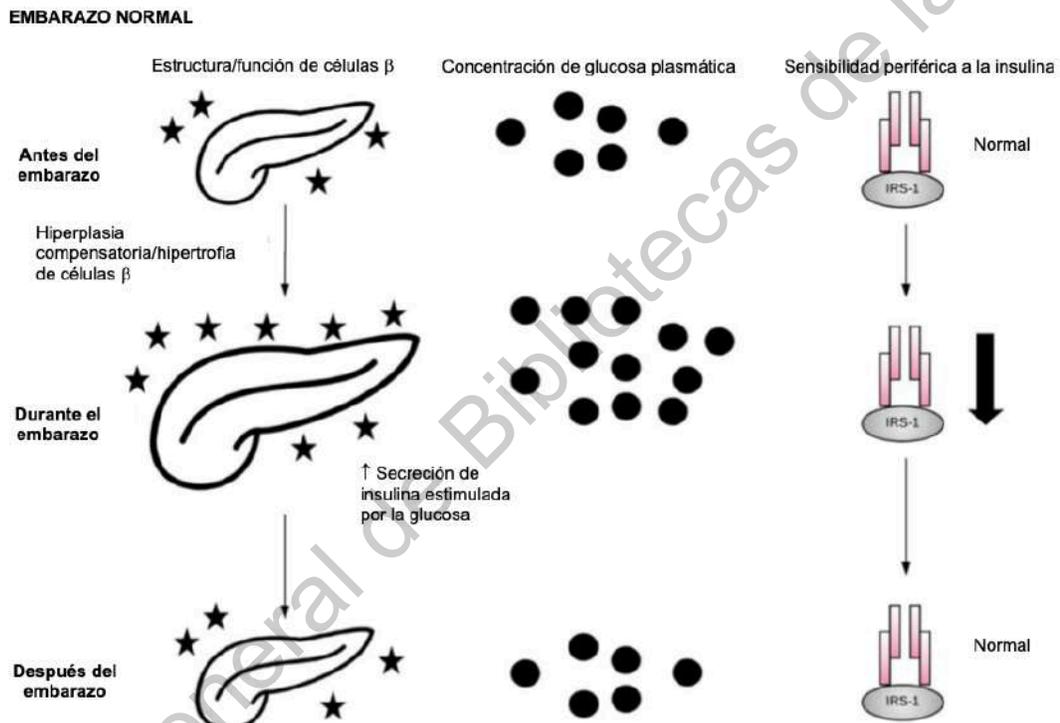


Figura 2. Sensibilidad de las células beta, la glucemia y la insulina durante el embarazo normal (fuente: Plows et al., 2018).

Conforme avanza el estado de gestación, hay un incremento en la secreción de hormonas diabetogénicas tales como el lactógeno placentario humano, el cortisol, la progesterona, los estrógenos y la prolactina, las cuales promueven generalmente a partir de la vigésima semana de gestación un estado de resistencia a la insulina. En mujeres con factores predisponentes junto con la incapacidad de superar dicha resistencia a la insulina durante el embarazo a pesar de la hiperplasia de células β

conduce a la hiperglucemia materna y por consiguiente el desarrollo de la DMG (Mack & Tomich, 2017; Ríos-Martínez et al., 2013; Rodrigo & Glastras, 2018).

Los niveles de lactógeno placentario humano aumentan al inicio del segundo trimestre de embarazo, tiene la función de promover la lipólisis materna con un aumento de los niveles de ácidos grasos libres en circulación. En consecuencia, provoca una interferencia con la señalización de la insulina al disminuir la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) (Cunningham et al., 2018).

El cortisol conlleva a un estado de hiperglicemia debido a un aumento de la liberación hepática de glucosa a través de la activación de enzimas que participan en la glucogenólisis. Los niveles de cortisol aumentan a medida que avanza el embarazo y un exceso de esta hormona se caracteriza por una disminución de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina (IR) (Aleman & Guerrero, 2018; Cunningham et al., 2018).

Después de aproximadamente 8 semanas de gestación, la placenta asume la secreción de progesterona, lo que resulta en un aumento gradual de los niveles séricos maternos durante el embarazo. La progesterona afecta la señalización metabólica de la insulina suprimiendo la ruta de PI 3-quinasa al promover la degradación del IRS-1 y suprimir la posterior fosforilación de Akt. En consecuencia, la progesterona inhibe la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa (Wada et al., 2010; Cunningham et al., 2018).

Los estrógenos en los ovarios maternos disminuye significativamente en la séptima semana de embarazo. Para la séptima semana, más de la mitad del estrógeno que ingresa a la circulación materna se produce en la placenta. Posteriormente, la placenta produce una magnitud de estrógeno en continuo aumento (Cunningham et al., 2018). El estrógeno es un regulador de la expresión del gen GLUT4 en músculo esquelético, tejido más importante involucrado en la captación de glucosa estimulada por insulina. La exposición prolongada a una alta

concentración de estrógenos inhibe la expresión del RNAm y proteínas de GLUT4, lo que conlleva a una disminución de la sensibilidad a la insulina, lo que sugiere que el hiperestrogenismo puede estar involucrado en la resistencia a la insulina inducida por el embarazo y/o DMG (Barros et al., 2008).

Durante la DMG, las células β no pueden compensar las demandas del embarazo y cuando se combinan con una sensibilidad reducida a la insulina, esto produce hiperglucemia. Después del embarazo, las células β , la glucosa plasmática y la sensibilidad a la insulina pueden volver a la normalidad o pueden permanecer deterioradas en un camino hacia la DMG en un futuro embarazo o a DM2 (Plows et al., 2018). En la Figura 3 se muestra la disfunción de las células β , la resistencia a la insulina y la DMG.

DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

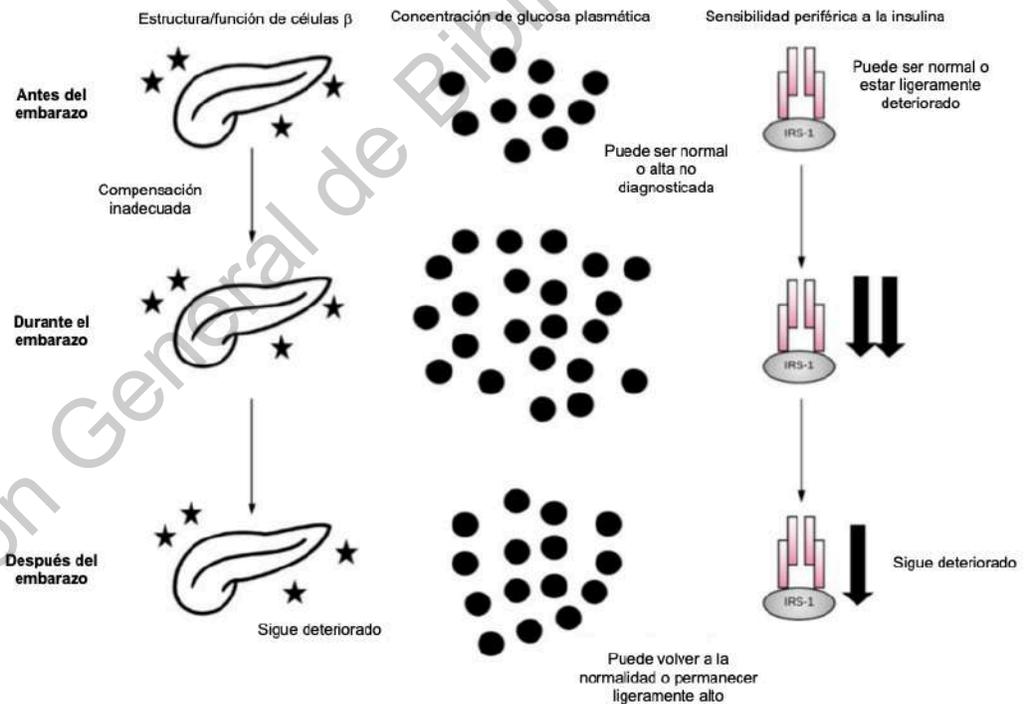


Figura 3. Sensibilidad de las células beta, la glucemia y la insulina durante la DMG (fuente: Plows et al., 2018).

En mujeres que son normoglucémicas antes del embarazo pero que desarrollan DMG, hay evidencia que existe una disminución de la sensibilidad a la insulina periférica antes de la concepción. Estas mujeres mantienen inicialmente la normoglucemia al comienzo del embarazo debido a la capacidad de las células β del páncreas para aumentar su respuesta a la insulina. Sin embargo, a medida que aumenta la resistencia a la insulina, la respuesta de esta hormona es inadecuada. Este defecto en la función de las células β se presenta antes del embarazo en muchos casos pero solo se manifiesta clínicamente con el aumento de la resistencia a la insulina asociada al embarazo, lo que resulta en una hiperglucemia (McIntyre et al., 2019).

Los datos obtenidos a partir de estudios observacionales en humanos y modelos animales han generado información sobre la biología molecular que conduce a la intolerancia glucémica. Tales estudios demuestran una regulación negativa de los receptores de insulina en las superficies de las células maternas durante la DMG (Denney & Quinn, 2018).

1.2.4 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina ocurre cuando las células no responden adecuadamente a dicha hormona. A nivel molecular, es debido a una falla en la señalización de la insulina, la cual consiste en la unión de la insulina al receptor de insulina (IR) activando el IRS-1, la adiponectina promueve la activación de IRS-1 a través de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), mientras que las citoquinas proinflamatorias activan la proteína quinasa C (PKC) a través de κ B quinasa (IKK), que inhibe el IRS-1. El IRS-1 activa la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), que fosforila el fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato (PIP2) al fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfato (PIP3). PIP3 activa Akt2, que promueve la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) y la captación de glucosa en la célula (Plows et al., 2018). En la Figura 4 se muestra un diagrama simplificado de la señalización de la insulina.

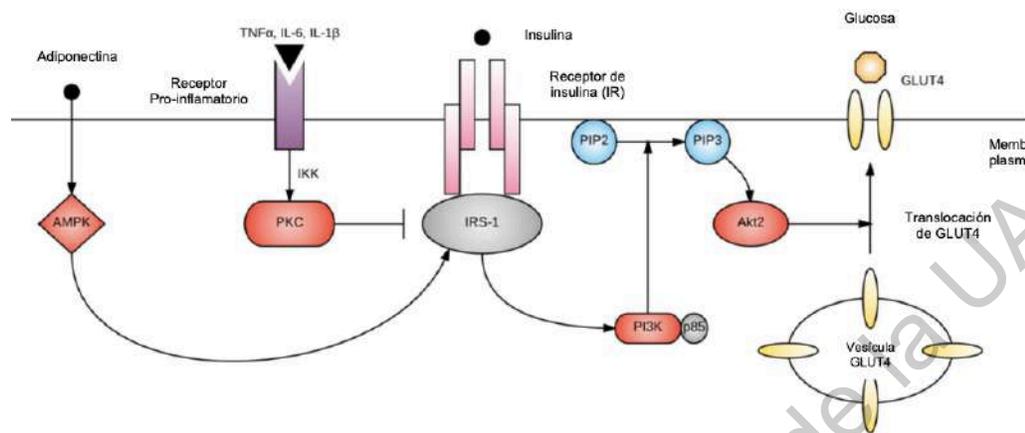


Figura 4. Señalización de la insulina (fuente: Plows et al., 2018).

La resistencia a la insulina no es el resultado de la disminución de receptores de insulina, sino que es ocasionada por una translocación inadecuada de la membrana plasmática del GLUT4, el cual es el principal transportador responsable de llevar la glucosa dentro de la célula para usarla como energía. Esto es debido a que hay una reducción en la fosforilación de tirosina o un aumento en la fosforilación de serina/treonina en el receptor de insulina reduciendo la señalización de la insulina. La tasa de captación de glucosa estimulada por la insulina se reduce en un 54% en la DMG en comparación con el embarazo normal. Varios factores de riesgo para la DMG ejercen sus efectos al interferir con la señalización de la insulina. Por ejemplo, los ácidos grasos saturados y las citocinas proinflamatorias inhiben la tirosina quinasa, IRS-1 y PI3K (Plows et al., 2018).

1.2.5 Factores de riesgo de la diabetes mellitus gestacional

Los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la DMG incluyen (IDF, 2017; Stewart & Murphy, 2014; Chiefari et al., 2017):

- Edad materna avanzada > 35 años;
- IMC pregestacional > 30 kg/m²;
- Aumento excesivo de peso corporal durante el embarazo;
- Antecedentes de DMG en embarazos previos;
- Antecedentes familiares de diabetes;
- Antecedentes de muerte fetal;
- Bebé macrosómico en previo embarazo;
- Síndrome de ovario poliquístico (SOP);
- Origen étnico con alta prevalencia de DM2 (asiáticos, hispanos, nativos americanos y afroamericanos).

Si bien se han identificado múltiples factores de riesgo de DMG, la obesidad y la edad avanzada son los más importantes. En México, el 34.5% de las mujeres mayores de 20 años presentan obesidad y el 37.4% tienen sobrepeso, es decir, más del 70% de las mujeres mexicanas tienen sobrepeso u obesidad. El embarazo es considerado un estado diabetogénico y comenzarlo con sobrepeso u obesidad origina un aumento de la resistencia a la insulina, lo que ocasiona agotamiento de la capacidad de las células β del páncreas de secretar la cantidad de insulina requerida por el embarazo, aumentando el riesgo de desarrollar DMG (Nava D et al., 2011). Las mujeres con IMC pregestacional >30 tienen una probabilidad 5 a 6 veces mayor de desarrollar DMG, asociada a su vez con otras complicaciones como aborto espontáneo, muerte fetal, aumento de la frecuencia de malformaciones congénitas, macrosomía fetal, hipertensión inducida por el embarazo y cesárea (Frías-Ordoñez et al., 2016). Asimismo las mujeres que al momento de embarazarse tienen un IMC normal y una ganancia de peso adecuada durante la gestación presentan una mejor evolución en el embarazo y el parto que aquellas mujeres con

una ganancia de peso mayor a la recomendada. Por lo que, mujeres con una ganancia de peso gestacional mayor a la recomendada presentan un incremento en el riesgo de desarrollar DMG, hipertensión asociada con el embarazo, complicaciones durante el trabajo de parto, macrosomía, retención de peso posparto y subsecuente desarrollo de obesidad (Zonana-Nacach et al., 2010). En el Cuadro 1 se muestra la ganancia de peso recomendada durante el embarazo, acorde con el IMC de la mujer embarazada.

Cuadro 1. Ganancia de peso recomendada durante el embarazo (fuente: IMSS, 2016).

Estado Nutricional	Ganancia de peso recomendado
Bajo peso (IMC < 19.8)	12.5-18 Kg
Peso normal (IMC 19.9-24.8)	11-16.5 Kg
Sobrepeso (IMC 24.9-29.9)	7-11.5 Kg
Obesidad (IMC >30)	5-9 Kg

IMC: índice de masa corporal; Kg: kilogramo.

En cuanto a la edad materna avanzada, esta se considera comúnmente a partir de 35 años y el embarazo a esta edad se ha vuelto más frecuente en las últimas décadas. Sin embargo, estas mujeres tienen mayor probabilidad de presentar complicaciones como trastornos hipertensivos, DMG, prematuridad, mayor índice de cesáreas, muerte perinatal y bajo peso al nacer (Baranda-Nájera et al., 2014; Kahveci et al., 2018).

Otro de los principales factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la DMG es haber presentado en embarazo previo esta complicación ya que se ha estimado

que la DMG reaparece en aproximadamente del 30-69% de todos los embarazos posteriores después de un embarazo afectado por DMG (Chen et al., 2015).

Por otro lado, mujeres embarazadas que presentan SOP tienen un alto riesgo de desarrollar DMG debido a que tienen un estado preexistente de resistencia a la insulina que puede estar acompañando al síndrome, adicionando que durante el embarazo hay un aumento de resistencia a la insulina causada principalmente por las hormonas placentarias (Toulis et al., 2009).

La DMG ha demostrado seguir una fuerte heredabilidad debido a que las mujeres con DMG suelen presentar el antecedente familiar de DM2. Al comparar cualquier mujer embarazada con tolerancia normal a la glucosa y una mujer con DMG, esta última siempre parece tener un historial parental significativamente mayor de DM2. Estos hallazgos demuestran que la DMG sigue una tendencia familiar (Chen et al., 2015). Sin embargo, aunque estos factores de riesgo aumentan el riesgo de DMG, se ha estimado que el 30-50% de las mujeres afectadas con DMG no presentan factores de riesgo (Frías-Ordoñez et al., 2016). Dichas mujeres sin factores de riesgo son diagnosticadas hasta el 2º trimestre, lo que representa un diagnóstico tardío, incrementando el riesgo de desarrollar complicaciones maternas y fetales.

Las pacientes embarazadas se pueden clasificar en tres grupos de riesgo para desarrollar DMG de acuerdo con las características que cumplan, las cuales se muestran en el Cuadro 2 junto con su nivel de riesgo (IMSS, 2016)

Cuadro 2. Grupos de riesgo de diabetes mellitus gestacional (fuente: IMSS, 2016)

Nivel de Riesgo	Criterios
Riesgo bajo	<p>A este grupo pertenecen las mujeres que cumplan todas las características siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo étnico con bajo riesgo de diabetes • Sin diabetes conocida en familiares de primer grado • Edad menor de 25 años • IMC normal antes del embarazo • Peso normal al nacer • Sin antecedente de alteración en el metabolismo de la glucosa • Sin historia de pobres resultados obstétricos.
Riesgo intermedio	Mujeres que no cumplen criterios de bajo ni alto riesgo
Riesgo alto	<p>Mujeres que presentan cualquiera de las siguientes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obesidad severa • Diabetes conocida en familiares de primer grado • Antecedente de alteración en el metabolismo de la glucosa (diabetes o intolerancia) en embarazo previo Diagnóstico establecido de intolerancia a la glucosa <ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico previo de síndrome de ovarios poliquísticos • Antecedente de productos macrosómicos (>4 kg al nacer) • Presencia de glucosuria

1.2.6 Complicaciones de la diabetes mellitus gestacional

La DMG es una de las condiciones patológicas que con mayor frecuencia complican el embarazo, con gran influencia en el futuro de la mujer y su hijo. La morbilidad neonatal se incrementa en un 23% cuando no se diagnostica o recibe el tratamiento adecuado (Coustan, 2013).

Durante la gestación, una de las complicaciones más graves y frecuentes de la diabetes es el excesivo crecimiento fetal (macrosomía) y las complicaciones derivadas de este. Como consecuencia de la hiperglucemia materna, el feto está expuesto a unos niveles elevados de glucosa debido a que la glucosa atraviesa fácilmente la placenta, por lo que el páncreas fetal responde a este aumento de concentraciones de la glucosa produciendo y liberando más insulina. El crecimiento fetal excesivo provocado por la hiperinsulinemia da lugar a fetos macrosómicos y conduce a depósitos de grandes cantidades de grasa subcutánea y hombros anchos, que predisponen a los niños a la distocia del hombro en el momento del parto. Como efectos a largo plazo, se ha observado que los bebés macrosómicos presentan una mayor prevalencia de obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 en edad adulta (Coustan, 2013; Maiz & Plasencia, 2014). Los bebés de madres diabéticas gestacionales que nacen prematuramente tienen más probabilidades de desarrollar síndrome de dificultad respiratoria y probablemente se debe a la disminución de la síntesis de las proteínas del surfactante (proteína surfactante A y B) cuando las concentraciones circulantes de insulina son elevadas (Bougherara et al., 2018)

El desarrollo de la DMG también conlleva complicaciones para la madre. La preeclampsia y las cesáreas se incrementan en la DMG no tratada y no diagnosticada oportunamente. La cesárea es común en mujeres con DMG debido a la macrosomía fetal, cuando la estimación del peso fetal está por arriba de 4000 g se recomienda considerar la cesárea sin trabajo de parto para evitar la distocia del hombro. La preeclampsia se define como la aparición de hipertensión y proteinuria a partir de la semana 20 de gestación y debido al incremento de la

concentración de glucosa plasmática en la DMG ocasionada por una resistencia a la insulina que se observa predominantemente en el tejido muscular, disminuye la glicólisis en el tejido muscular y aumentan los ácidos grasos libres causando este mecanismo alteraciones precoces que se producen en el desarrollo de los vasos placentarios dando lugar a una hipoperfusión relativa de ésta, seguida de hipoxia e isquemia, que produce liberación de factores antiangiogénicos tales como proteínas antiangiogénicas solubles en tirosina quinasa 1 (sFlt-1) y la endoglina soluble (sEng) hacia la circulación materna provocando una disfunción endotelial sistémica, que causa la hipertensión y las manifestaciones clínicas de la preeclampsia (Sibai, 2015; Weissgerber & Mudd, 2015; Bougherara et al., 2018). La sFlt-1 reduce la biodisponibilidad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PGF) al unir estos ligandos proangiogénicos como un señuelo de no señalización. Por otro lado sEng inhibe la unión del factor de crecimiento transformante β 1 a la endoglina, evitando la activación de la sintetasa del óxido nítrico endotelial y la posterior vasodilatación (Weissgerber & Mudd, 2015).

Con respecto a las complicaciones a largo plazo, las mujeres con DMG presentan un alto riesgo de padecer DM2 de 3 a 6 años después del parto y antes de los 40 años de edad, así como desarrollar nuevamente DMG en sus siguientes embarazos (IDF, 2019). Las complicaciones de la DMG pueden ser prevenidas con el diagnóstico y tratamiento oportuno.

1.2.7 Diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional

El empleo de la CTGO para el diagnóstico de DMG se realiza usualmente entre las semanas 24-28 de gestación, cuando la resistencia a la insulina materna aumenta para preservar los nutrientes por el rápido crecimiento del feto. Directrices internacionales como la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG, por sus siglas en inglés) recomiendan que la detección de DMG se realice en todas las mujeres embarazadas (Donovan et al., 2018).

El diagnóstico de la DMG se puede lograr con cualquiera de las siguientes dos estrategias (ADA, 2020; PROY-NOM-015-SSA2-2018):

- a) Estrategia de un paso: CTGO de 75 g
- b) Estrategia de dos pasos: tamizaje con carga oral de 50 g de glucosa, de ser positiva se realiza una prueba de confirmación con CTGO de 100 g.

La estrategia de un paso consiste en hacer una CTGO de 2 h en la que se administra una carga de 75 g de glucosa a las mujeres gestantes en ayuno. De acuerdo al enfoque de la OMS, se miden los niveles de glucemia en ayuno y 2 horas poscarga, mientras que según el enfoque de la IADPSG la medición se hace en ayuno, 1 y 2 horas poscarga. Posteriormente se realiza la comparación de los resultados con los criterios de diagnóstico correspondientes. La CTGO debe ser realizada en la mañana, después de un ayuno de por lo menos 8 horas. La OMS y la IADPSG consideran el diagnóstico de la DMG como la alteración de un valor de los niveles glicémicos medidos (Cuadro 3; Frías-Ordoñez et al., 2016).

Cuadro 3. Criterios de diagnósticos de diabetes mellitus gestacional mediante la estrategia de un paso (fuente: ADA, 2020; PROY-NOM-015-SSA2-2018).

Criterios de diagnósticos	Glucemia en ayuno (mg/dL)	Glucemia 1 hora poscarga (mg/dL)	Glucemia 2 horas poscarga (mg/dL)
OMS	126		140
IADPSG	92	180	153

OMS: Organización Mundial de la Salud; IADPSG: Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo.

En la estrategia de dos pasos, el primer paso consiste en realizar la prueba de tamizaje, una CTGO con 50 g de glucosa sin necesidad de ayuno. Si el nivel de glucemia medido 1 hora poscarga es menor al punto de corte correspondiente (<140 mg/dL) se considera que la paciente es negativa para DMG y no requiere realizarse

otra prueba. Si el nivel de glucemia es mayor al del punto de corte (>140 mg/dL) se deberá continuar con el segundo paso, el cual consiste en realizar una CTGO con 100 g de glucosa. Esta última prueba requiere que la paciente este en ayuno y mide los niveles de glucemia en ayuno, 1, 2 y 3 horas. Posteriormente, los resultados son comparados con los criterios diagnósticos correspondientes para el diagnóstico de DMG. El diagnóstico de DMG es positivo si se presentan al menos dos de los cuatro valores alterados de glucosa en plasma (Cuadro 4; Frías-Ordoñez et al., 2016).

Cuadro 4. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus gestacional mediante la estrategia de dos pasos (fuente: ADA, 2020).

Paso 1. Prueba de tamizaje con la prueba de carga de glucosa con 50 g de glucosa				
Glucemia 1 hora poscarga \geq 140 mg/dL				
Paso 2. Prueba de tolerancia oral a la glucosa con 100 g de glucosa				
Criterios diagnósticos	Glucemia en ayuno (mg/dL)	Glucemia 1 hora poscarga (mg/dL)	Glucemia 2 horas poscarga (mg/dL)	Glucemia 3 horas poscarga (mg/dL)
Carpenter/Coustan	95	180	155	140
NDDG	105	190	165	145

NDDG: Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes.

El aumento de la incidencia de obesidad y sobrepeso ha contribuido al desarrollo de DM2 en mujeres de edad fértil, con un incremento en el número de mujeres embarazadas con DM2 no diagnosticadas, por ello es importante realizar las pruebas de diagnóstico de diabetes mellitus desde la primera visita prenatal o antes de la semana 13 de gestación, a las mujeres con factores de riesgo tales como, IMC mayor a 30 kg/m², antecedentes de DMG en embarazo previo o tolerancia alterada

a la glucosa (ADA, 2018; Donovan et al., 2018; IMSS, 2016). Las mujeres diagnosticadas con diabetes (glucosa en ayuno >126 mg/dL) en el primer trimestre deben clasificarse como diabéticas preexistentes (DM2 o muy raramente DM1), ya que la DMG es el tipo de diabetes que se diagnostica por primera vez en el segundo o tercer trimestre del embarazo. Debido a que la DMG confiere un mayor riesgo para el desarrollo de DM2 en un lapso de 3-6 años después del parto, se deberá reclasificar a todas las pacientes que cursaron con este padecimiento a partir de la sexta semana postparto con una CTGO. Si el resultado es normal, se deberá repetir cada año (ADA, 2018; PROY-NOM-015-SSA2-2018; IDF, 2019).

1.2.8 Desventajas de las actuales herramientas diagnósticas de la diabetes mellitus gestacional

Actualmente la CTGO es el “estándar de oro” para el diagnóstico de la DMG pero esta prueba tiene muchos inconvenientes, tales como que es una prueba lenta (tiene una duración de 2-3 horas), bastante exigente para el paciente e invasiva ya que requiere múltiples extracciones de sangre (Agarwal, 2016). A pesar de que esta prueba se complica con náuseas y vómitos en mujeres embarazadas, la CTGO sigue siendo aceptable como prueba de diagnóstico para DMG (Agarwal, 2016). Sin embargo, diversos autores consideran necesaria la identificación de nuevas y mejores herramientas para el diagnóstico oportuno de la DMG; ya que la CTGO presenta como principal desventaja su uso hasta el segundo trimestre en mujeres sin factores de riesgo, debido a que la resistencia a la insulina es desarrollada hasta la semana 20 de gestación (Ríos-Martínez et al., 2013).

1.2.9 Nuevas propuestas para el diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional

Se han propuesto varias proteínas como posibles biomarcadores para realizar el diagnóstico temprano de DMG, tales como adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales, proteína A plasmática asociada al embarazo, proteína A2 plasmática asociada al embarazo, proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos,

afamina, proteína de unión a retinol-4, resistina y proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

1.2.9.1 Adiponectina

La adiponectina (ADIPOQ) es una proteína que se secreta tanto del tejido adiposo como de la placenta durante el embarazo. La adiponectina modula el metabolismo de la glucosa al afectar la sensibilidad a la insulina, esto se logra promoviendo la captación de glucosa en la masa del músculo esquelético y disminuyendo la producción de glucosa en el hígado (Corcoran et al., 2018). En la Figura 5 se muestra la interacción de la adiponectina con sus receptores (Adipo R1 y R2) dando como resultados la activación de múltiples vías de señalización. La activación del sustrato del receptor de insulina 1 / 2 (IRS1 / 2) por señalización de la adiponectina es un mecanismo importante por el cual la adiponectina sensibiliza la acción de la insulina en tejidos sensibles a la insulina (Arunkumar & Sushil, 2017)

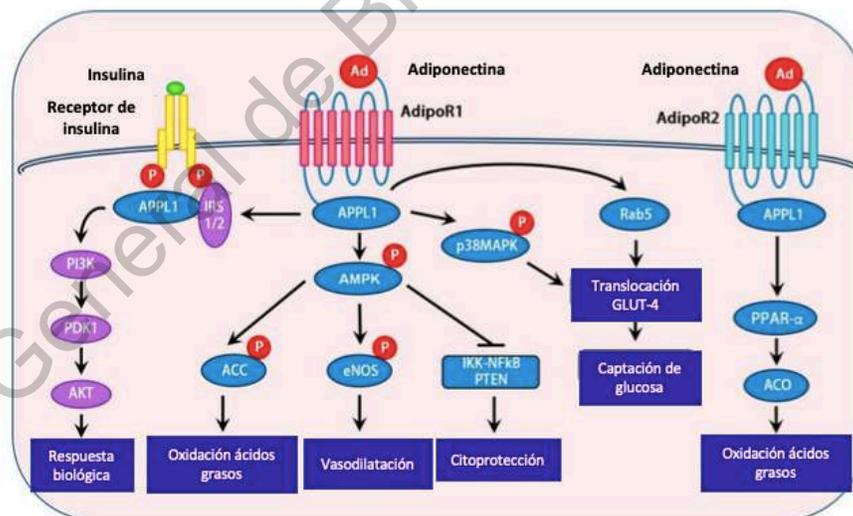


Figura 5. Representación esquemática de la transducción de señales de adiponectina (fuente: Arunkumar & Sushil, 2017).

Los niveles de adiponectina se correlacionan inversamente con el porcentaje de grasa corporal y, por lo tanto, se observan niveles bajos en la obesidad. Asimismo, los bajos niveles de adiponectina están fuertemente asociados con la aparición de

DMG independientemente del IMC materno previo al embarazo (Corcoran et al., 2018).

Corcoran et al. (2018) encontraron en un estudio de cohorte de 248 mujeres irlandesas consideradas de alto riesgo para DMG que los niveles de adiponectina en el primer trimestre se relacionan de forma independiente con el riesgo de desarrollar DMG más adelante en el embarazo, encontrando además que los niveles séricos de adiponectina $<8.9 \mu\text{g/ml}$ da una razón de probabilidad de 3.3 para la DMG. Hasta la fecha, la información disponible sobre la adiponectina como posible biomarcador para la DMG proviene de pequeños estudios retrospectivos de casos y controles o de estudios transversales.

1.2.9.2 Proteína A plasmática asociada al embarazo

La proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) es producida por células de trofoblasto y es una proteasa que puede escindir las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBPs) 4 y 5. Las IGFBPs se unen al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) e impide su unión al receptor de IGF-1 (Rojas-Rodríguez et al., 2015).

La principal función de PAPP-A es modular la actividad de IGF-1 mediante la hidrólisis de los IGFBPs y liberación de IGF-1. Con ello se facilita el transporte de glucosa y aminoácidos a la placenta. Por lo tanto, niveles disminuidos de PAPP-A pueden conducir al desarrollo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Farina et al., 2017; Donovan et al., 2018). En la Figura 6 se muestra el control local de la señalización de IGF-1 por PAPP-A.

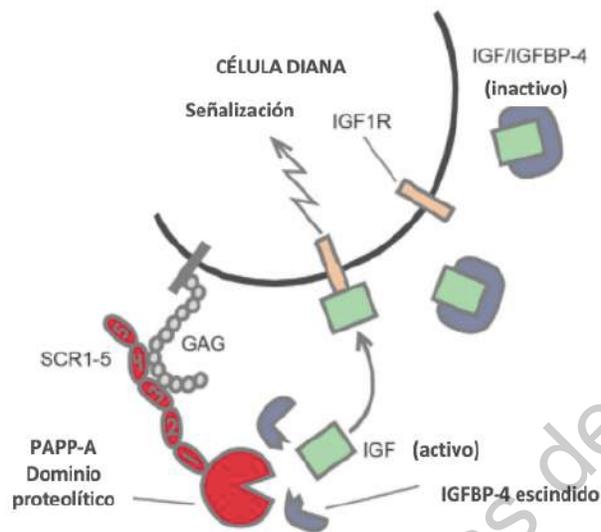


Figure 6. Representación de la función de PAPP-A e IGFBP-4 en el sistema IGF-1 (fuente: Monget & Oxvig, 2016).

Farina et. al. (2017) realizaron un estudio de casos y controles (que incluyó a 188 mujeres italianas, de las cuales 12 desarrollaron DMG) para evaluar un panel de biomarcadores para la predicción de DMG en el primer trimestre, el cual incluyó las siguientes proteínas: PAPP-A, endoglina soluble, proteína de embarazo 13 y adiponectina. Dichos autores encontraron que la combinación de adiponectina y PAPP-A arrojó una tasa de detección del 63.6% con una tasa de falsos positivos del 10% y la adición del IMC aumentó la tasa de detección a 72.7%. Por lo que dichos autores sugieren la combinación de dos proteínas y un parámetro antropométrico para la identificación de mujeres con alto riesgo de desarrollar DMG.

1.2.9.3 Proteína A2 plasmática asociada al embarazo

La proteína A2 plasmática asociada al embarazo (PAPP-A2) es una proteína proteasa que es estructuralmente similar a PAPP-A. La función que tiene PAPP-A2 es escindir específicamente IGFBP-5. En contraste con la escisión de IGFBP-4 por PAPP-A que requiere estrictamente la presencia de IGF-1, la escisión de IGFBP-5 por PAPP-A2 es independiente de IGF-1. La expresión de PAPP-A2 es más abundante en la placenta y sus efectos regulatorios afectan tanto el crecimiento

fetoplacentario como el desarrollo placentario (Overgaard et al., 2001; Dereke et al., 2019)

Dereke et al. (2019) realizaron un estudio de casos y controles para determinar si los niveles de PAPP-A2 aumentan en los embarazos tempranos complicados posteriormente por DMG y si la edad gestacional influye en los niveles de esta proteína. Para ello reclutaron mujeres embarazadas en el primer trimestre de embarazo de las cuales 99 mujeres posteriormente fueron diagnosticadas con DMG y 100 mujeres con embarazo normal conformaron el grupo control. Dichos autores encontraron que los niveles circulantes de PAPP-A2 están elevados en mujeres con DMG en comparación con el grupo control y observaron que las concentraciones de esta proteína aumentan con el avance de la edad gestacional en mujeres embarazadas con DMG. Con el propósito de identificar a las mujeres con mayor riesgo de DMG, se reportó un punto de corte de >10.1 ng/ml con una sensibilidad del 71% y una especificidad del 72%.

1.2.9.4 Proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina

La proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina (IGFBP-5) es una proteína inhibitoria, la cuál se une con alta afinidad a IGF-1 e inhibe la señalización mediante el secuestro de este factor de crecimiento. IGF-1 es una hormona similar en estructura a la insulina que activa al receptor insulínico, por lo que el incremento de los niveles séricos de IGFBP-5 resultaría en una disminución en la actividad del IGF-1 (Rojas-Rodríguez et al., 2015). La expresión de IGFBP-5 en el tejido adiposo y la secreción de PAPP-A por la placenta sugiere un mecanismo por el cual la concentración de IGF-1 aumenta a través de la interacción con IGFBP-5 y se libera en respuesta a la secreción de PAPP-A, coordinando así la función placentaria con expansión del tejido adiposo materno. En la Figura 7 se muestra como IGFBP-5 secuestra a IGF-1 y la proteasa específica para el embarazo PAPP-A degrada IGFBP-5 para liberar IGF-1, promoviendo la expansión del tejido adiposo (Rojas-Rodríguez et al., 2015).

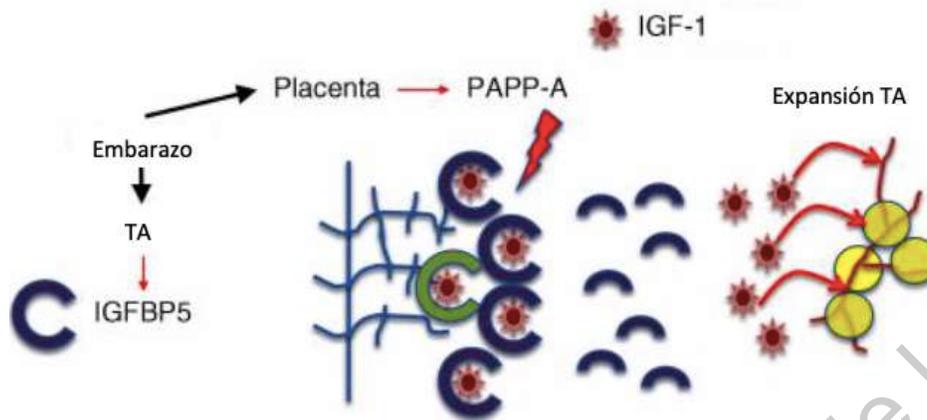


Figura 7. Función de IGFBP-5 en el embarazo. TA: tejido adiposo (fuente: (Rojas-Rodríguez et al., 2015)).

Zhao et al. (2017) realizaron un estudio proteómico para identificar biomarcadores séricos que les permitiera predecir el desarrollo de DMG en etapas tempranas, para lo cual reclutaron mujeres chinas embarazadas en el primer trimestre, de las cuales 30 mujeres fueron diagnosticadas posteriormente con DMG a las 24 a 28 semanas y se seleccionaron 30 mujeres embarazadas normoglucémicas como controles. Dichos autores identificaron 33 proteínas expresadas diferencialmente entre los dos grupos, de las cuales 4 proteínas (Apo E, F9, FGA e IGFBP5) fueron confirmadas como discriminantes con kits de ELISA. La validación de dichas proteínas de manera independiente resultó en áreas bajo la curva ROC de 0.965, 0.780, 0.793 y 0.899, respectivamente; valores que fueron incrementados con la combinación de las cuatro proteínas (0.985), presentando una sensibilidad del 80% y una especificidad del 95%. Dichos resultados sugieren por un lado que la DMG es una enfermedad multifactorial complicada con alteraciones en la respuesta inflamatoria e inmune, coagulación sanguínea y homeostasis. Asimismo, dichos resultados sugieren que la combinación de Apo E, F9, FGA e IGFBP5 podría ser utilizada para el diagnóstico temprano de DMG.

1.2.9.5. Globulina fijadora de hormonas sexuales

La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) es una glicoproteína producida por el hígado que se une a las hormonas sexuales, andrógenos y estrógenos en la circulación. Mientras estén ligadas a la SHBG, las hormonas esteroideas están inactivas y sirven como reservorio para uso futuro (Corcoran et al., 2018). Tras la interacción de SHBG con su receptor, el ligando sexual ocupa el sitio de unión, provocando la disociación del complejo con el receptor y liberando SHBG y el estrógeno. Esto inicia la activación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en varios tejidos como el tejido mamario y la placenta (Kahn, 2002). En la Figura 8 se muestra un diagrama de la señalización de SHBG.

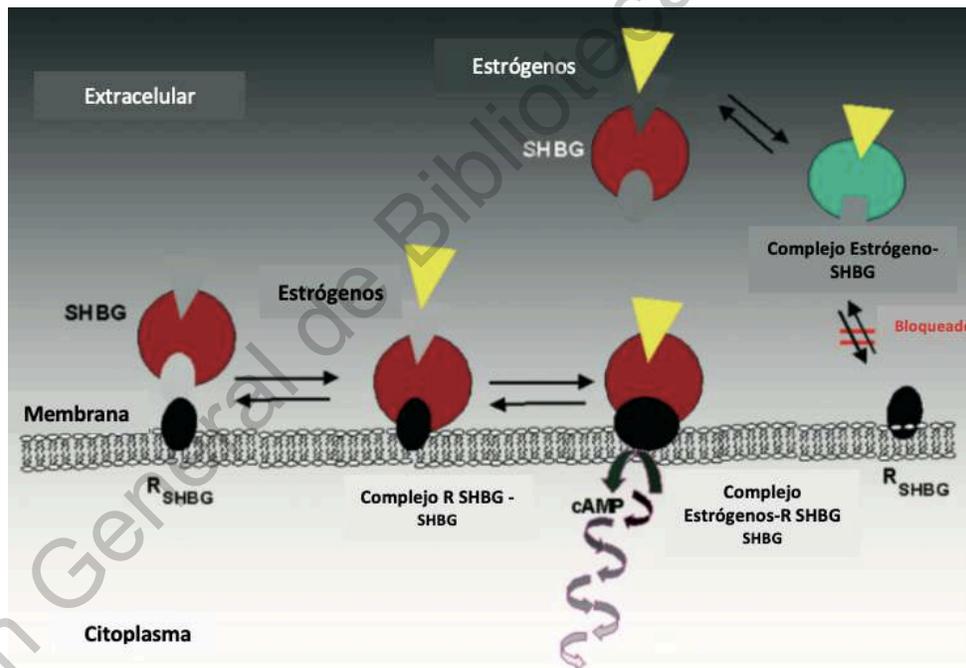


Figura 8. Modelo de unión de la SHBG a su receptor y sistema de señalización de la SHBG dependiente de AMPc (fuente: Kahn, 2002).

La secreción de SHBG se suprime por la insulina, por lo tanto, los niveles bajos de SHBG se observan con frecuencia en los estados de resistencia a la insulina (Corcoran et al., 2018). Durante el embarazo, los niveles de SHBG aumentan progresivamente hasta las 24 semanas de gestación. Posteriormente, el nivel de

SHBG se estabiliza y esto puede ser atribuible a la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina que aumentan progresivamente a partir del último trimestre (Tawfeek et al., 2017)

Tawfeek et al. (2017) realizaron en Arabia Saudita, un estudio de casos y controles, una comparación de los niveles de SHBG en suero entre 45 mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa y 45 mujeres diagnosticadas con DMG. Dichos autores encontraron que las concentraciones circulantes de SHBG estuvieron disminuidas en las pacientes con DMG en comparación con las mujeres embarazadas con tolerancia a glucosa normal y reportaron un punto de corte de SHBG de 50 nmol/L para el diagnóstico de DMG con 90% de sensibilidad y 96% de especificidad. Por lo que concluyeron que SHBG podría ser un biomarcador potencialmente útil para la predicción del riesgo de desarrollar DMG. Sin embargo, este biomarcador fue determinado en las semanas 24-28 de gestación, por lo que no se validó su uso como biomarcador para el diagnóstico oportuno, es decir, en el primer trimestre de gestación.

Zhang et al. (2018) realizaron un estudio de cohorte prospectivo para investigar la asociación de los niveles de SHBG en el embarazo temprano con el desarrollo de DMG. Para ello se midieron los niveles de SHBG en mujeres chinas, 40 con DMG y 266 sin DMG durante el primer trimestre (<12 semanas de gestación). Dichos autores encontraron niveles significativamente bajos en mujeres con DMG en comparación con mujeres sin DMG, concluyendo que la disminución de dicha proteína durante el primer trimestre puede predecir el desarrollo de DMG. Sin embargo, al realizar el análisis de curvas característica operativa del receptor (ROC) reveló que la capacidad de los niveles de SHBG para predecir DMG es moderada (área bajo la curva: 0.704).

1.2.9.6 Proteína de unión a retinol-4

La proteína de unión a retinol-4 (RBP4) es secretada principalmente en el hígado y el tejido adiposo. Es miembro de la familia de las lipocalinas, una clase de proteínas que se unen y transportan pequeñas moléculas lipofílicas o anfipáticas como los ácidos grasos, los esteroides, las bilinas y los retinoides. RBP4 es la única proteína de transporte en suero específica para el retinol (vitamina A) (Graham & Kahn, 2007).

Se ha reportado que las personas con resistencia a la insulina presentan niveles elevados de RBP4 en circulación. Hallazgos sobre estas investigaciones implican que niveles aumentados de RBP4 deteriora la señalización de insulina en músculo, incrementa la producción de glucosa hepática y contribuye a la resistencia a la insulina en pacientes con obesidad y DM2. En algunos estudios, la sobreexpresión de RBP4 indujo resistencia a la insulina en ratones normales. Mientras tanto, la destrucción del gen RBP4 incrementó la sensibilidad a la insulina (Du et al., 2015).

En condiciones normales, GLUT4 media la absorción de glucosa estimulada por insulina en los adipocitos y estos liberan algo de RBP4. En estados resistentes a la insulina, como la obesidad y DM2, la expresión de GLUT4 se regula negativamente en el tejido adiposo. Esto da como resultado un transporte de glucosa deteriorado en el tejido adiposo y una mayor secreción de RBP4, los niveles elevados de RBP4 causan resistencia a la insulina en el músculo al alterar la transducción de señal de la insulina y en el hígado al inducir la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). En la Figura 9 se muestra el mecanismo de acción de RBP4 (Graham & Kahn, 2007).

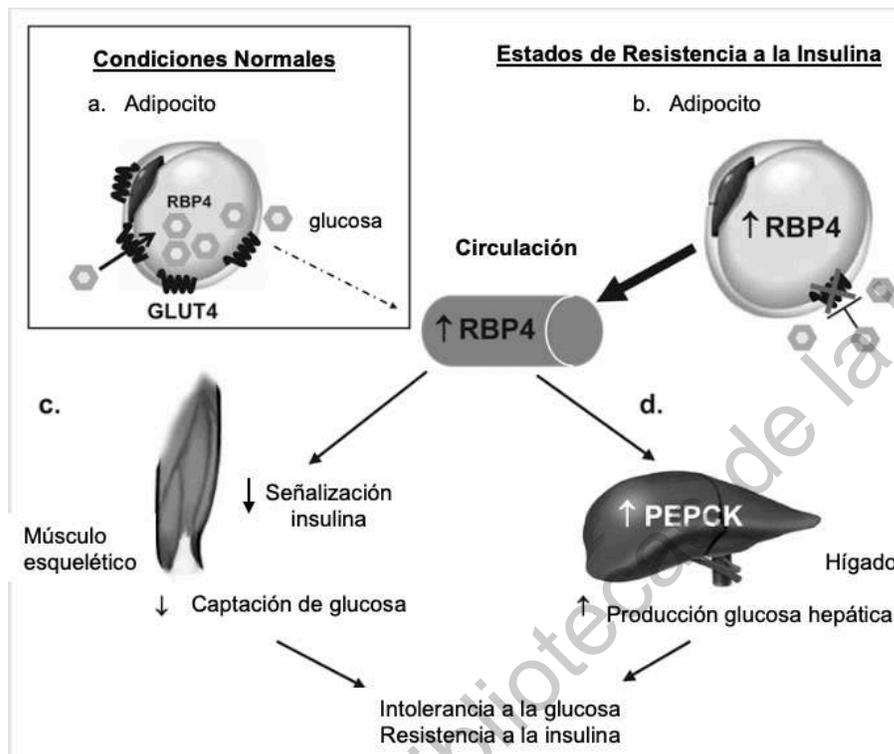


Figura 9. Representación del mecanismo de acción de RBP4 (fuente: Graham & Kahn, 2007).

Du et al. (2015) reclutaron 38 mujeres embarazadas con DMG y 38 mujeres con embarazo normal para investigar la relación entre RBP4 y la DMG. Dichos autores encontraron que las concentraciones séricas de RBP4 fueron significativamente más altas en las pacientes con DMG en comparación del grupo control, por lo que sugieren que los niveles elevados de RBP4 pueden estar implicados en la patogénesis de la DMG. Asimismo, reportaron un punto de corte de 0.363 $\mu\text{g/ml}$ con una sensibilidad de 0.974 y especificidad de 0.053 para predecir la aparición de DMG. Sin embargo, dicha proteína fue determinada entre las semanas 37-42 semanas. Por lo tanto, no fue evaluado como biomarcador de diagnóstico temprano de DMG.

Jin et al., (2020) evaluaron la asociación entre los niveles séricos de RBP4 en el primer y segundo trimestre de embarazo con el riesgo de desarrollar DMG en mujeres

chinas. Para ello midieron las concentraciones de dicha proteína en 135 casos de DMG y 135 controles anidados, encontrando niveles más altos de RBP4 en el primer y segundo trimestre que los controles. Sin embargo, solamente se observaron diferencias significativas en el primer trimestre de embarazo. Posteriormente realizaron modelos de regresión logística condicional encontrando que, con el ajuste por dieta, actividad física y otros factores de riesgo de DMG, el riesgo de DMG aumentó con cada incremento de 1 log $\mu\text{g/L}$ de RBP4 y la razón de probabilidad fue de 3.12 en el primer trimestre y 3.38 en el segundo trimestre. Dichos autores concluyeron que los niveles plasmáticos de RBP4 tanto en el primer como en el segundo trimestre, se asociaron de forma dosis-dependiente con un mayor riesgo de DMG. Sin embargo, no realizó la validación de dicho biomarcador.

1.2.9.7 Resistina

La resistina (RETN) es secretada principalmente de los adipocitos y su producción se induce durante la adipogénesis. Informes recientes sugieren que la RETN también se expresa en muchos otros tejidos, como los islotes pancreáticos, los músculos esqueléticos, las células mononucleares, la placenta y las células hepáticas (Siddiqui & George, 2017).

La RETN altera la señalización de la insulina en los islotes pancreáticos, lo que conduce al deterioro de la secreción de insulina inducida por glucosa. Esta adipocina induce la expresión de SOCS3 e inhibe la fosforilación de Akt conllevando resistencia a la insulina en las células beta pancreáticas, el hígado y los músculos. En músculo esquelético disminuye la translocación de GLUT 4 y la captación de glucosa. En el hígado, afecta principalmente el metabolismo del glucógeno y reduce la sensibilidad del hígado hacia la insulina. Además, la RETN inhibe la fosforilación de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina hepática, lo que disminuye la beta oxidación y aumenta la esterificación de ácidos grasos en los triglicéridos, lo cual conduce a la acumulación de lípidos. Durante el embarazo, la placenta también sintetiza y secreta RETN a la circulación materna por lo que RETN

aumenta la resistencia a la insulina y causa hiperglucemia que conduce al desarrollo de DMG. La variación en los niveles de resistina entre embarazos con DMG y embarazos normales indica su importancia en la fisiopatología de DMG. Además, la RETN está ganando importancia como un potencial biomarcador de DMG (Siddiqui & George, 2017).

Estos hallazgos muestran que la RETN se expresa en diferentes órganos donde la insulina actúa y participa en el mecanismo de resistencia a la insulina que conduce a DMG, como se muestra en la siguiente Figura 10 (Siddiqui & George, 2017).

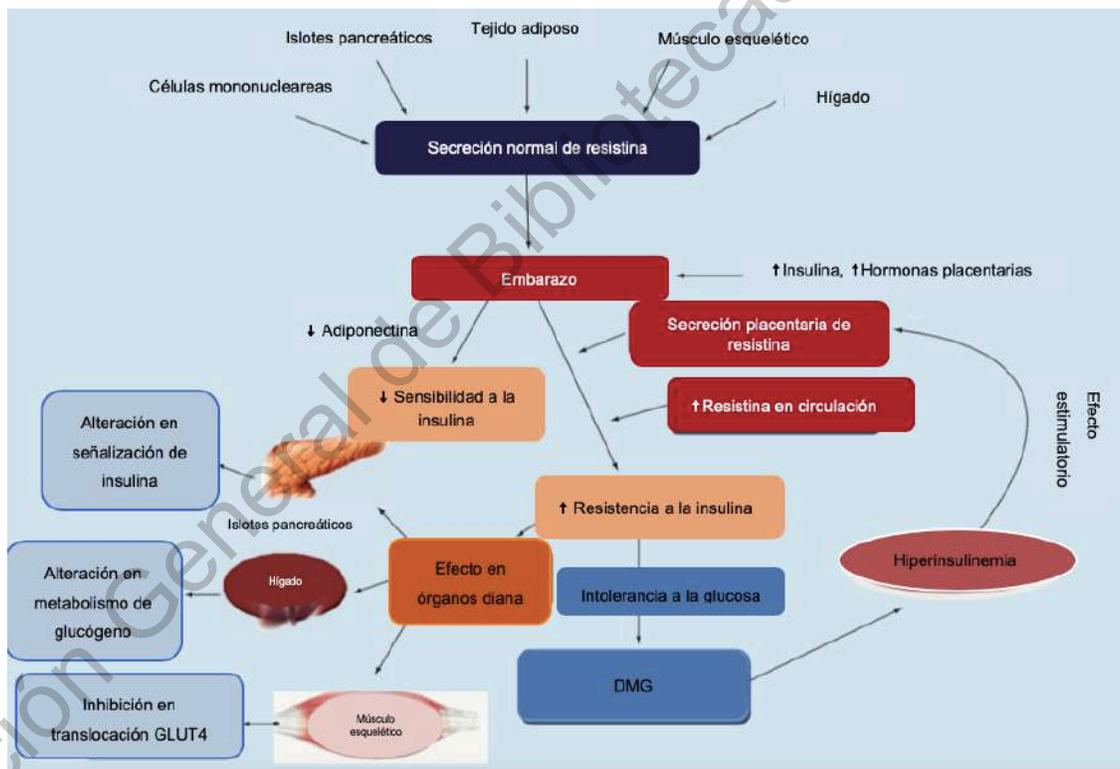


Figura 10. Diagrama esquemático que muestra el papel de resistina en el desarrollo de DMG (fuente: Siddiqui & George, 2017).

Vitoratos et al. (2011) investigaron los cambios en los niveles séricos de RETN durante el embarazo y el posparto, para ello reclutaron 30 mujeres con embarazo normal y 30 mujeres embarazadas con diagnóstico de DMG, a las cuales les tomaron muestra sanguínea a las 26-28, 38 semanas de gestación y al tercer día posparto para la determinación de RETN. Dichos autores encontraron niveles séricos altos de resistina en el grupo de mujeres con DMG en comparación del grupo control pero no presentaron diferencia significativa, esto a las 26-28 semanas de gestación. Por otro lado, el grupo de DMG presentó niveles séricos de resistina significativamente más altos tanto a las 38 semanas de gestación como al tercer día posparto en comparación del grupo control. También se observó en el grupo de DMG que los niveles de resistina aumentaron significativamente de 26-28 a 38 semanas de gestación y disminuyeron inmediatamente después del parto. Por lo que dichos autores sugieren que la DMG está asociada con un aumento de los niveles séricos de resistina desde el segundo trimestre de embarazo. Sin embargo, no se evaluó dicha proteína en el primer trimestre como biomarcador temprano de DMG.

Bawah et al. (2019) realizaron en Ghana un estudio prospectivo de 70 mujeres que desarrollaron posteriormente DMG (casos) y 70 mujeres sin DMG (controles) para determinar si en el primer trimestre de embarazo, la leptina, resistina, visfatina se ven afectados en embarazos que posteriormente desarrollan DMG como base para predecir DMG. Para ello se cuantificaron las adipocinas entre las semanas 11-13 de gestación, encontrándolas significativamente elevadas en el grupo de DMG durante el primer trimestre. Además, reportaron un punto de corte para predecir DMG de leptina ≥ 18.90 ng/mL (sensibilidad 95.7% y especificidad 68.6%); resistina ≥ 5.30 ng/mL (sensibilidad 95.7% y especificidad 61.4%) y visfatina ≥ 2.80 ng/mL (sensibilidad 87.1% y especificidad 70%). Por lo que dichos autores sugieren utilizar la combinación de estos biomarcadores para la predicción temprana de DMG. Sin embargo, no determinaron la sensibilidad y especificidad que se pudiera alcanzar al combinar las tres adipocinas.

1.2.9.8. Proteína de unión a ácidos grasos 4

La proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) pertenece a la superfamilia de proteínas fijadoras de ácidos grasos y está altamente expresada en adipocitos, macrófagos y células endoteliales (Fasshauer et al., 2014). FABP4 es capaz de unirse reversiblemente a ligandos hidrófobos, tales como ácidos grasos de cadena larga saturada e insaturados. En consecuencia, forma parte en la regulación del tráfico de lípidos y las respuestas a nivel celular, se dedican al transporte de ácidos grasos a orgánulos específicos en la célula, incluidas las mitocondrias, los peroxisomas, el núcleo y el retículo endoplásmico. Por lo tanto, FABP4 desempeña un papel importante en la oxidación de lípidos, la regulación transcripcional mediada por lípidos y la señalización, el tráfico y la síntesis de membranas. FABP4 contribuye a la acumulación de ácidos grasos libres de cadena corta y suprime la actividad de proteínas relevantes en la vía de señalización de PI3K-AKT. En consecuencia, FABP4 inhibe la glucólisis, disminuye la captación y utilización de glucosa en los músculos y el hígado (Trojnar et al., 2019).

Se ha reportado que esta adipocina deteriora la tolerancia a la glucosa en ratones al aumentar la producción de glucosa hepática. Además, las altas concentraciones circulantes de FABP4 predicen de forma independiente el riesgo de desarrollar síndrome metabólico, DM2 y enfermedad cardiovascular en seres humanos (Fasshauer et al., 2014).

Kralisch et al. (2009) investigaron en un estudio de casos y controles las concentraciones séricas de FABP4 en mujeres con DMG (40 mujeres) en comparación con mujeres embarazadas sanas (80 mujeres) y demostraron que los niveles séricos maternos de la adipocina FABP4 aumentan significativamente en pacientes con DMG en comparación con los controles de gestantes sanas, lo cual fue independiente de marcadores de adiposidad, leptina, triglicéridos y creatinina. Por lo tanto, dichos autores concluyeron que los niveles de FABP4 en la circulación materna podrían contribuir al incremento del riesgo cardiovascular de la DMG. Sin

embargo, no se evaluó el potencial de la FABP4 como biomarcador para diagnóstico de la DMG.

Tu et al. (2017) realizaron en China un estudio de cohorte prospectivo y los grupos de quedaron conformados por 135 mujeres con DMG y 1,015 mujeres sin DMG. Esto con la finalidad de determinar si las concentraciones séricas de FABP4 en el primer trimestre de embarazo están asociadas con la DMG. Dichos autores encontraron niveles elevados significativamente de FABP4 en el primer trimestre en mujeres que desarrollaron DMG en comparación con las mujeres sin DMG. Además, estimaron que el punto de corte de FABP4 para el desarrollo posterior de DMG fue de 18.5 ng/mL con una sensibilidad de 81.8% y especificidad de 71.2%. Por lo tanto, se concluyó que las concentraciones altas de FABP4 en el primer trimestre se asocian con un mayor riesgo de DMG en mujeres chinas.

1.2.9.9 Afamina

Afamina (AFM) es una proteína de unión a vitamina E en el plasma humano expresada principalmente en el hígado y secretada en el torrente sanguíneo. La vitamina E es un importante antioxidante que protege contra el estrés oxidativo. Afamina desempeña un papel en los procesos celulares antiapoptóticos relacionados con el estrés oxidativo, el cual está fuertemente asociado con resistencia a la insulina y obesidad. Koninger et al. (2018) demostraron que las concentraciones séricas altas de afamina se asocian con la presencia de resistencia a la insulina y con concentraciones elevadas de glucosa. Asimismo, durante el embarazo, la gravedad de la resistencia a la insulina aumenta con la edad gestacional en curso por lo que las concentraciones séricas de afaminan aumentan linealmente.

Koninger et al. (2018) analizaron las concentraciones de afamina en 59 mujeres con DMG y 51 controles en una cohorte de primer trimestre de un estudio observacional prospectivo. Además, las concentraciones de esta proteína se examinaron de forma transversal en una cohorte a mitad del embarazo de 105

mujeres y se compararon con los resultados de una CTGO realizada simultáneamente. Dichos autores observaron que las mujeres que desarrollaron DMG presentaron concentraciones de afamina significativamente más altas durante el primer trimestre que las pacientes sin DMG independientemente del IMC y la edad gestacional. De igual manera, en la cohorte a mitad del embarazo encontraron que las concentraciones séricas de afamina fueron significativamente mayores entre los pacientes con hallazgos patológicos por la CTGO que entre el grupo control. Por lo tanto, dichos autores sugieren que la afamina podría ser propuesta como un nuevo biomarcador temprano para las alteraciones metabólicas de la glucosa durante el embarazo.

Por lo tanto, existen diversas proteínas propuestas como candidatas a biomarcador para el diagnóstico temprano de la DMG, las cuales incluyen biomarcadores glucémicos, inflamatorios, de resistencia a la insulina, así como biomarcadores derivados de apocitos y de placenta. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido realizados en diseños de caso-control o transversales tanto en el primer como en el segundo trimestre de gestación, siendo que aquellos evaluados en el primer trimestre presentan un mayor poder predictivo de la DMG. Se ha propuesto que los candidatos a biomarcador identificados en estudios transversales deben ser trasladados a estudios longitudinales con el fin de identificar si estos biomarcadores pueden ser utilizados en un diagnóstico temprano de la enfermedad, así como para llevar a cabo el monitoreo de la progresión de la enfermedad durante el embarazo (Powe, 2017).

Powe (2017) propone que el biomarcador óptimo de la DMG debe ser capaz de predecir la enfermedad antes de que se desarrolle, por lo que idealmente el biomarcador debería ser monitoreado en la primera cita de cuidado prenatal. Dicho biomarcador debería permitir:

- i. la eliminación del monitoreo de DMG en mujeres de bajo riesgo con CTGO, por lo que el biomarcador debe presentar alta sensibilidad; y
- ii. la identificación de las mujeres con DMG en el primer trimestre del embarazo para iniciar de manera oportuna la intervención dietaria y de actividad física (mujeres de riesgo intermedio) o farmacológica (de alto riesgo), por lo que el biomarcador debe presentar alta especificidad.

1.2 Justificación

La DMG es una complicación común del embarazo que se caracteriza por la elevación de los niveles de glucosa en sangre durante el período de gestación. Actualmente, el diagnóstico de la DMG se realiza durante el segundo o tercer trimestre de embarazo, empleando la prueba de CTGO, ya sea de 75 g o 100 g. Sin embargo esta herramienta diagnóstica, a menudo se complica con náuseas y vomito. Asimismo, el diagnóstico se realiza casi al final del embarazo en mujeres sin factores de riesgo, lo que representa un diagnóstico tardío que disminuye el tiempo para realizar la intervención dietaria o farmacológica.

Por lo tanto, el presente proyecto propone la evaluación de nueve proteínas como candidatas a biomarcadores séricos para el diagnóstico temprano (11-14 semanas de gestación) de DMG. Las proteínas que serán incluidas en el estudio serán ADIPOQ, SHBG, PAPP-A, PAPP-A2, FABP4, AFM, RBP4, RETN e IGFBP-5, las cuales han sido evaluadas previamente como biomarcadores candidatos para la DMG en otras poblaciones. Dichas proteínas han sido propuestas como candidatas a biomarcador para el diagnóstico de la DMG en estudios transversales pero no han sido evaluadas para el monitoreo de la progresión de la DMG.

La detección oportuna de la DMG permitirá identificar las mujeres en riesgo de desarrollar esta afección y con ello implementar medidas preventivas para así mismo evitar complicaciones tanto maternas como fetales que pudieran llegar a presentarse en un futuro, tales como desarrollar DM2 al finalizar el embarazo o en la etapa adulta del bebé, así como reducir el riesgo de macrosomía fetal como consecuencia de la hiperglucemia materna.

1.3 Hipótesis

Las proteínas adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales, proteína A plasmática asociada al embarazo, proteína A2 plasmática asociada al embarazo, proteína de unión a ácidos grasos 4, afamina, proteína de unión a retinol-4, resistina y proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina, las cuales son activadas por mecanismos independientes relacionados con el metabolismo de glucosa y desarrollo de resistencia a la insulina, pueden ser utilizadas para el diagnóstico temprano y monitoreo de la progresión de la DMG en mujeres mexicanas.

1.4 Objetivo general

Evaluar el potencial como biomarcadores de proteínas en suero para el diagnóstico oportuno y el monitoreo de la progresión de la diabetes mellitus gestacional.

1.5 Objetivos específicos

1. Determinar las proteínas de interés (ADIPOQ, SHBG, PAPP-A, PAPP-A2, FABP4, AFM, RBP4, RETN e IGBP5) en suero de mujeres en el primer trimestre de embarazo.
2. Evaluar el poder predictivo y la sensibilidad de las proteínas de interés como candidatos a biomarcador para el diagnóstico temprano de la diabetes mellitus gestacional.
3. Evaluar las proteínas identificadas en el objetivo 2 como candidatos a biomarcador para el monitoreo de la progresión de la diabetes mellitus gestacional por medio de su cuantificación en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño

El diseño del proyecto fue longitudinal, prospectivo, observacional y comparativo. Cabe mencionar que el presente proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (CBQ17/095) (Anexo A).

2.1.1 Definición del universo

Mujeres embarazadas que acudieron a visitas prenatales en el Hospital del Niño y la Mujer de la ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro de Arteaga.

2.1.2 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue de 200 mujeres embarazadas aparentemente sanas en su primer trimestre de embarazo (semanas 11-14 de gestación), las cuales fueron monitoreadas durante todo su embarazo.

El tamaño de la muestra del estudio longitudinal fue estimado con base en la fórmula para población finita: $n = \frac{NZ_{\alpha}^2pq}{d^2(N-1)+Z_{\alpha}^2pq}$. Donde: n=tamaño de muestra, N=total de la población (la prevalencia de mujeres embarazadas en Querétaro es de 42231 de acuerdo con el INEGI, 2014), $Z_{\alpha}=1.96$ (confianza bilateral de $\alpha=0.05$), p= proporción esperada (la prevalencia media de DMG en México 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 muestral (5%, $d=0.05$). Con base en lo anterior, se estima un tamaño de la muestra de $n=173$ mujeres embarazadas. Considerando una tasa de deserción del 15%, el tamaño de la muestra mínimo necesario para este proyecto es $n=200$ mujeres embarazadas.

2.1.3 Definición de las unidades de observación

Se realizaron mediciones antropométricas (peso corporal y talla), toma de muestra sanguínea para los análisis bioquímicos séricos rutinarios (colesterol total,

c-HDL, c-LDL, c-VLDL triglicéridos, glucosa, insulina e índice HOMA), diagnóstico de DMG (glucosa basal, 1 h poscarga y 2 h poscarga) y proteínas séricas (ADIPOQ, SHBG, PAPP-A, PAPP-A2, FABP4, AFM, RBP4, RETN e IGFBP-5).

2.1.4 Definición del grupo control

El grupo control está conformado por mujeres embarazadas sanas, es decir, sin DMG ni enfermedades diagnosticadas antes o durante el embarazo, sin sobrepeso ni obesidad pregestacional (IMC >25 Kg/m²), así como presentar un índice HOMA <1.6 en el primer trimestre de embarazo.

2.1.5 Criterios de inclusión

Mujeres mexicanas embarazadas de 18 a 40 años que asistieron a evaluaciones prenatales en el Hospital del Niño y la Mujer en Santiago de Querétaro, Querétaro de Arteaga. Se reclutaron mujeres embarazadas que se encontraban en el primer trimestre (semanas 11-14 de gestación) y que asistieron a las visitas prenatales trimestrales (primer trimestre: semanas 11-14 de gestación; segundo trimestre: semanas 24-28 de gestación; tercer trimestre: semanas 30-33 de gestación).

2.1.6 Criterios de exclusión

- Embarazo múltiple.
- Preeclampsia.
- Desórdenes del sistema inmune.
- Diagnóstico previo de daño renal o hepático.
- Diagnóstico previo de hipertensión arterial.

2.1.7 Criterios de eliminación

- Pacientes que presentaron o desarrollaron durante el embarazo cualquiera de las condiciones anteriormente mencionadas en los criterios de exclusión.
- Pacientes que decidieron cambiar de hospital.
- Pacientes que no continuaron con sus visitas prenatales.

- Pacientes que decidieron retirarse del estudio voluntariamente.

2.1.8 Definición de variables y unidades de medida

Nombre	Unidades	Método
Edad	Años	Historia clínica
Peso	Kg	La balanza se colocó sobre una superficie plana. La paciente vistió ropa liviana, se presentó en ayuno y tras haber evacuado recto y vejiga. La participante permaneció en el centro de la balanza, inmóvil, con los hombros hacia atrás y los brazos descansando al lado del cuerpo.
Talla	m	Se tomó estando la mujer de pie. La cabeza, hombros, caderas y talones estando pegados a la pared bajo la línea de la cinta del estadímetro.
IMC	Kg/m ²	Se calculó dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros.
Colesterol total	mg/dL	La medición se realizó mediante kits enzimáticos-colorimétricos (Pointe Scientific, MI, USA) y se utilizó un analizador automatizado (BS-200 Chemistry Analyzer, Mindray Medical International Co., Shenzhen, China).
c-HDL	mg/dL	
c-LDL	mg/dL	
Triglicéridos	mg/dL	
Glucemia basal	mg/dL	
		La medición se realizó mediante kits enzimáticos-colorimétricos (Pointe Scientific, MI, USA) y se

Glucosa de 1 h CTGO	mg/dL	utilizó un analizador automatizado (BS-200 Chemistry Analyzer, Mindray Medical International Co., Shenzhen, China).
Glucosa de 2 h CTGO	mg/dL	
Insulina	uU/mL	La medición se realizó mediante un kit de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (Cobas, Indianapolis, IN, USA) en equipo automatizado (Cobas e 411 analyzer, Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japón).
Índice HOMA	—	Se calculó multiplicando los valores de glucosa por insulina y dividiendo el resultado entre 405.
Proteínas: ADIPOQ, SHBG, PAPP-A, IGFBP-5, FABP4, AFM, PAPP-A2, RBP4, RETN	μg/mL, nmol/L, MoM, ng/mL, μg/L, mg/L, ng/mL, μg/mL, ng/mL, respectivamente. e.	La determinación de proteínas de interés se llevó a cabo mediante un custom arreglo de anticuerpos y posteriormente se cuantificaron con un kit de ELISA sándwich (Raybiotech).

2.1.9 Selección de fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información

2.1.9.1 Reclutamiento

Las participantes fueron reclutadas en su primer trimestre de embarazo (semanas 11-14 de gestación) en el Hospital del Niño y la Mujer de Santiago de Querétaro, Querétaro de Arteaga. Se realizó la invitación verbal para su participación en el proyecto. Posteriormente, se realizó el procedimiento del consentimiento informado, en donde se explicó en qué consiste su participación, así como los riesgos y beneficios. Si el individuo decidió participar en el proyecto, se llevó a cabo el llenado y firmado del consentimiento informado (Anexo B). Las participantes fueron monitoreadas a las semanas 11-14 (primer trimestre), 24-28 (segundo trimestre) y 30-33 (tercer trimestre) de gestación. En cada valoración se realizó la aplicación de encuestas y la toma de muestra sanguínea.

2.1.9.2 Aplicación de encuestas

Tras concluir con el proceso del consentimiento informado, se realizó una encuesta a cada participante para la recolección de datos personales, antecedentes familiares y datos clínicos (Anexo C).

2.1.9.3 Obtención de muestras sanguíneas

Se tomaron dos tubos de muestras sanguíneas a las pacientes durante las visitas prenatales trimestrales teniendo un tiempo de ayuno de 12 horas. De acuerdo con la técnica de sistema al vacío, se tomó un volumen de sangre de aproximadamente 5 ml en cada tubo sin anticoagulante con gel separador. Se dejó reposar el tubo de manera vertical durante 30 minutos para la formación completa del coágulo y posteriormente se centrifugó la muestra para separar el suero.

2.1.9.4 Análisis bioquímico rutinario

Una tubo suero fue entregada en la Unidad de Servicios Químicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro para la cuantificación de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total, c-LDL y c-HDL.

2.1.9.5 Diagnóstico de diabetes mellitus gestacional mediante la curva de tolerancia a la glucosa oral.

El diagnóstico de DMG se realizó entre las semanas 24-28 de gestación, empleando la estrategia de un paso, la cual consiste en realizar una CTGO de 2 horas en la que se administra una carga de 75 g de glucosa. De acuerdo con el enfoque de la IADPSG, se realizó la toma de muestra sanguínea en ayuno, 1 y 2 h poscarga para la posterior determinación de glucosa.

Se tomó una muestra de sangre periférica de la paciente por la mañana, después de un ayuno de 12 horas y posteriormente se determinó la concentración de glucosa. Después la participante tomó una solución de 75 g de glucosa y permaneció en reposo en las siguientes dos horas sin ingerir ningún tipo de alimento. Al transcurrir una hora de que la paciente ingirió la solución de glucosa, se le tomó nuevamente una muestra sanguínea, así como a las dos horas poscarga para determinar los niveles de glucosa y compararlos con los criterios de diagnóstico recomendados. La IADPSG consideran el diagnóstico de DMG como la alteración de un valor de los niveles glicémicos medidos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estrategia de un paso para el diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (fuente: ADA, 2020).

Criterios de diagnóstico	Glucosa en ayuno (mg/dL)	Glucosa 1 h poscarga (mg/dL)	Glucosa 2 h poscarga (mg/dL)
IADPSG	92	180	153

2.1.9.6 Determinación de proteínas de interés

Se realizó la determinación simultánea de las proteínas de interés (adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales, proteína A placentaria asociada al embarazo, proteína de unión a ácidos grasos 4, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina, proteína de unión al retinol-4, resistina y

proteína A2 placentaria asociada al embarazo) en las muestras de suero correspondientes al primer trimestre de gestación. Lo anterior se realizó utilizando un custom arreglo de anticuerpos (RayBio Custom G-Series Human Antibody Array, Cat.: AAH-CUST-G, RayBiotech, Norcross, GA, USA), el cual emplea una plataforma de chip de vidrio que utiliza el principio de diseño de sándwich-ELISA y una lectura de señal fluorescente.

Los anticuerpos correspondientes a las proteínas de interés se imprimen en el soporte de vidrio. Después de un paso de bloqueo, las muestras se incuban con las matrices. Las proteínas no específicas se lavan y las matrices se incuban con un cóctel de anticuerpos biotinilados de detección, seguido de un fluoróforo conjugado con estreptavidina. Las señales se visualizan usando un escáner láser de fluorescencia (Figura 11).



Figura 11. Principio del arreglo de anticuerpos G-Serie (fuente: Raybiotech, 2018).

A continuación se describe el procedimiento para realizar la determinación de las proteínas de interés en microarreglos de proteínas. Se agregaron 100 μ l del buffer de bloqueo 1X en cada pocillo de las laminillas de vidrio y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para bloquear las láminillas. Se decantó el buffer de bloqueo, posteriormente se aspiró el líquido remanente de cada pocillo. Se agregaron 100 μ l de muestra en cada laminilla y se cubrió la cámara de incubación con una película adhesiva. La muestra fue diluida 1:2 con buffer de

bloqueo 1X. Los arreglos se incubaron con muestra a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró la película adhesiva y se aspiró con cuidado las muestras. Se lavaron las laminillas tres veces durante 2 min con 150 μ l del buffer de lavado I a temperatura ambiente, retirando el buffer de lavado en cada lavado.

Posteriormente, se colocó la laminilla en un recipiente limpio y se agregó suficiente buffer de lavado I 1X para sumergir la laminilla manteniendo el marco intacto (aproximadamente 30-50 ml) y se eliminaron todas las burbujas de los pocillos. Se lavaron las laminillas durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se retiró la laminilla del contenedor. El buffer del contenedor se decantó y se colocó buffer de lavado I 1X para sumergir la laminilla y lavarla durante 10 minutos con agitación suave. Las laminillas se retiraron y se invirtieron para decantar el líquido. Posteriormente, se decantó el buffer del contenedor y se agregó buffer de lavado II para lavar las laminillas 2 veces, 5 minutos por lavado. Se retiraron las laminillas del contenedor, se decantaron y después se aspiró con cuidado el líquido de los pocillos.

Se añadieron 70 μ l de anticuerpos secundarios conjugados con biotina 1X a cada pocillo. Se cubrió la cámara de incubación con una película adhesiva y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Se aspiró el sobrenadante y se lavaron las laminillas con buffer de lavado I y II siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Se agregaron 70 μ l de estreptavidina conjugada con fluoróforo a cada pocillo. Se cubrió la cámara de incubación con una película adhesiva y posteriormente se cubrió todo el conjunto con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Transcurrida la incubación se retiró el papel aluminio y la película adhesiva. Con cuidado se aspiró el sobrenadante y se lavaron las laminillas con buffer de lavado I y II siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

Se retiró el marco de la laminilla de vidrio y se colocó cada laminilla en un tubo de centrífuga de 30 ml, agregando suficiente buffer de lavado I para cubrir toda la laminilla (aproximadamente 20 ml). Se incubaron las laminillas a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación suave. Transcurrida la incubación, se decantó el buffer y se lavaron las laminillas con buffer de lavado I y II siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, pero esta vez usando el buffer de lavado II por solo 2-3 minutos.

Se retiró la laminilla del tubo y posteriormente se enjuagó suavemente con agua desionizada. Se eliminaron las gotas de agua aplicando suavemente succión con una punta de pipeta. Después se dejó secar la laminilla en una campana de flujo durante 20 minutos o hasta que esté completamente seca. Se colocó la laminilla debajo de una hoja de papel aluminio para protegerlo de la luz. Finalmente se procedió al escaneo de las laminillas en un escáner láser (GenePix 4100A, Molecular Devices, San José, CA, USA) utilizando el canal cy3 o “verde” (frecuencia de excitación= 532 nm). Los valores de las señales fueron extraídas usando el software GenePix Pro 6.0. Posteriormente, los datos de intensidad de fluorescencia fueron normalizadas con los controles positivos del arreglo y utilizando el software RayBio Analysis Tool. En la Figura 12 se muestra como funciona el arreglo de anticuerpos G-Series, resumiendo los pasos a seguir.

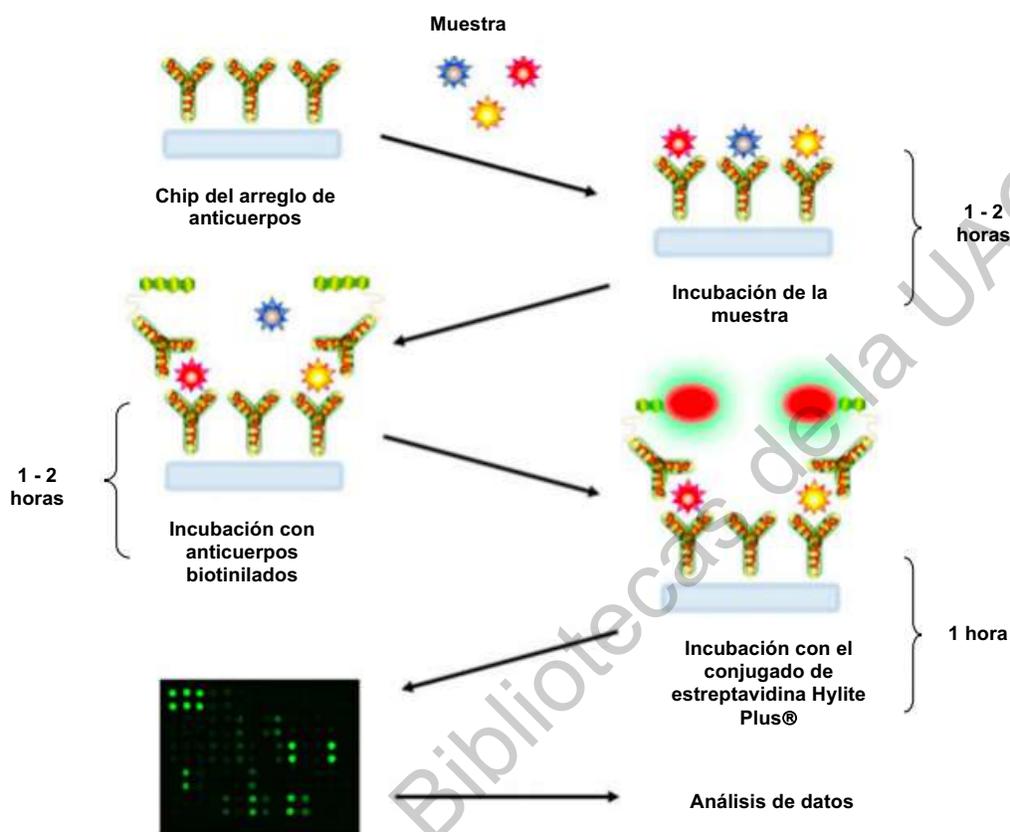


Figura 12. Arreglo de anticuerpos G-serie (fuente: Raybiotech, 2018).

2.1.9.7 Cuantificación de las proteínas

Se realizó la identificación de las proteínas candidatas a biomarcador por medio de los análisis estadísticos descritos en la siguiente sección. Posteriormente se realizó la cuantificación de dichas proteínas por medio de kits de ELISA tipo sándwich (RayBiotech, Norcross, GA, USA. Cat.: ELH-SHBG, ELH-IGFBP5 y ELH-FABP4) en las muestras correspondientes al primer, segundo y tercer trimestre de gestación, con el fin de evaluar el potencial de dichas como biomarcadores de progresión de la enfermedad.

El kit de ELISA es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas in vitro para la medición cuantitativa de muestras biológicas tales como suero, plasma o sobrenadantes de cultivos de células. Este ensayo emplea un anticuerpo específico de captura que se encuentra recubierto en una placa de 96 pocillos. Los patrones y

las muestras que contienen la proteína diana, se pipetea en los pocillos para que ésta se una al anticuerpo inmobilizado. Los pocillos se lavan y se añade el anticuerpo de detección marcado con biotina. Después de haber realizado otro lavado para eliminar los anticuerpos biotinilados no unidos, se agrega estreptavidina conjugada con HRP a los pocillos. Los pocillos se lavan de nuevo para posteriormente agregar una solución de sustrato TMB a los pozos para que se desarrolle un color. La intensidad del color será proporcional a la concentración de la proteína diana unida al anticuerpo específico de captura. La solución de stop cambia el color de azul a amarillo y la intensidad del color se mide a 450 nm (Figura 13).

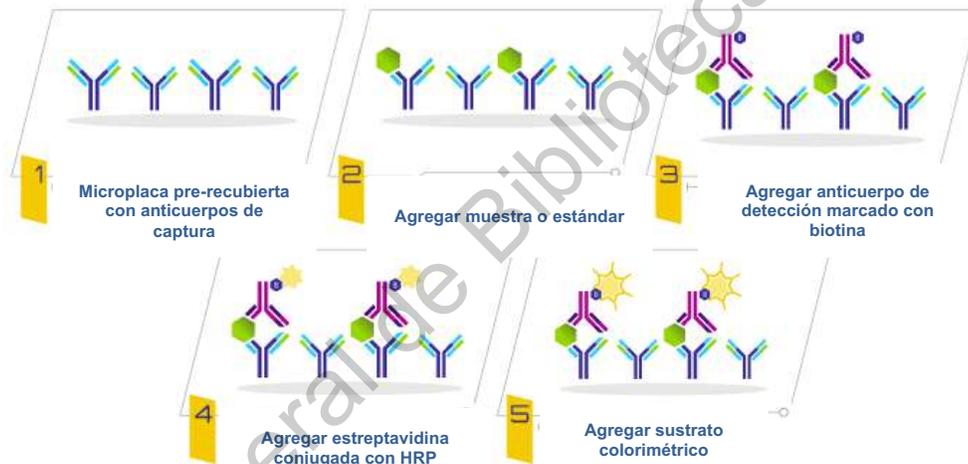


Figura 13. Principio de ELISA sándwich (fuente: Raybiotech, 2016).

A continuación se describe el procedimiento que se siguió para realizar la cuantificación de las proteínas de interés con kits de ELISA tipo sandwich. Previo al inicio de la técnica, se colocaron todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18-25°C). El diluyente de ensayo 1X fue utilizado para la preparación de los estándares de cada proteína. En la Figura 14, 15 y 16 se muestra un diagrama de como se preparó la curva estándar de SHBG, IGFBP-5 y FABP4, respectivamente.

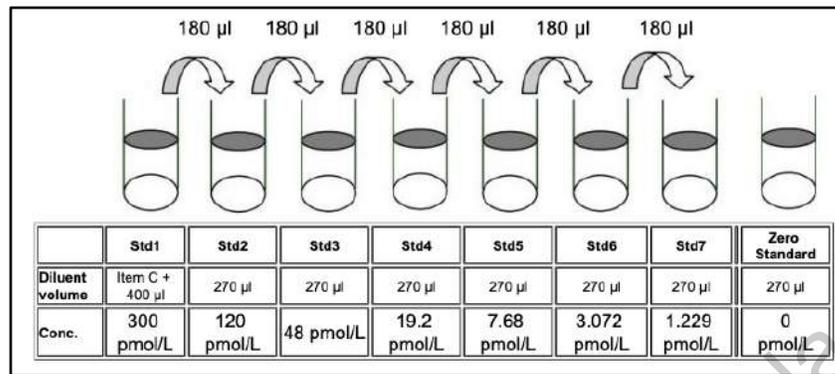


Figura 14. Preparación de estándares de SHBG

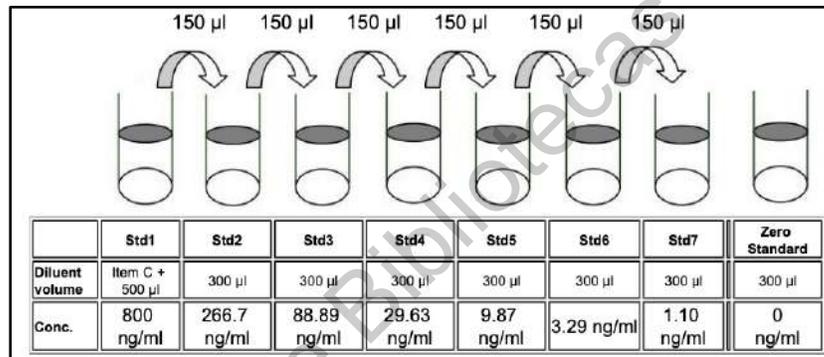


Figura 15. Preparación de estándares de IGFBP-5

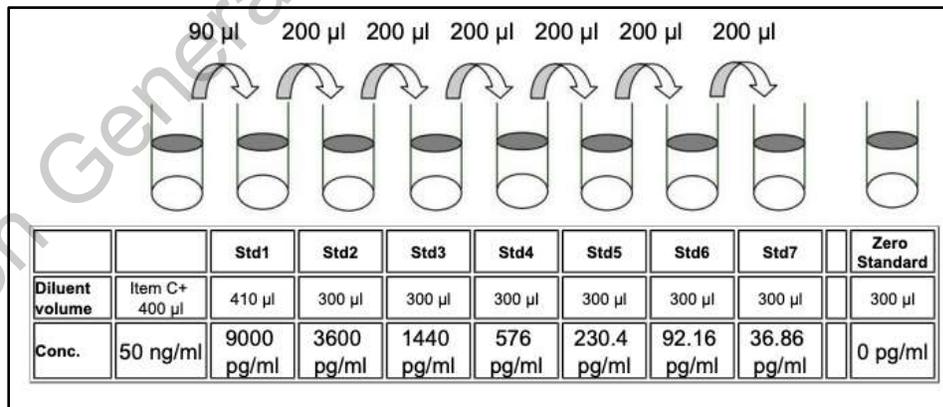


Figura 16. Preparación de estándares de FABP4

Para la cuantificación de SHBG las muestras fueron diluidas 1:50000. En cuanto a IGFBP-5 las muestras no fueron diluidas, en caso de que se requiriera se realizó una dilución 1:2 y en la cuantificación de FABP4 las muestras se diluyeron 1:20. En todos los casos se utilizó el diluyente de ensayo 1X.

Posteriormente, se agregaron 100 μ l de cada estándar o muestra en los pocillos correspondientes, después se cubrieron los pocillos y se incubaron durante 2.5 horas a temperatura ambiente.

Se desechó la solución y se lavaron 4 veces con la solución de lavado 1X (300 μ l). Después del último lavado, se eliminó el buffer de lavado restante aspirando o decantando y posteriormente se invirtió la placa y se secó con una toalla de papel.

Posteriormente se agregaron 100 μ l de anticuerpo biotinilado 1X a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se desechó la solución y se repitió el lavado siguiendo los pasos descritos anteriormente. Se agregaron 100 μ l de solución de estreptavidina a cada pocillo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se desechó la solución y se repitió el lavado siguiendo los pasos descritos anteriormente. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de reactivo de sustrato TMB a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad utilizando papel aluminio. Finalmente se agregaron 50 μ l de solución de stop a cada pocillo y se leyeron las absorbancias a 450 nm por medio de un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan™ GO, Thermo Scientific™, Finland).

A continuación se muestra en las Figuras 17, 18 y 19 la curva estándar obtenida de SHBG, IGFB-5 y FABP4 con su respectiva ecuación, la cual fue utilizada para calcular las concentraciones de dichas proteínas en las muestras correspondientes del primer, segundo y tercer trimestre de embarazo de mujeres con DMG y sin DMG.

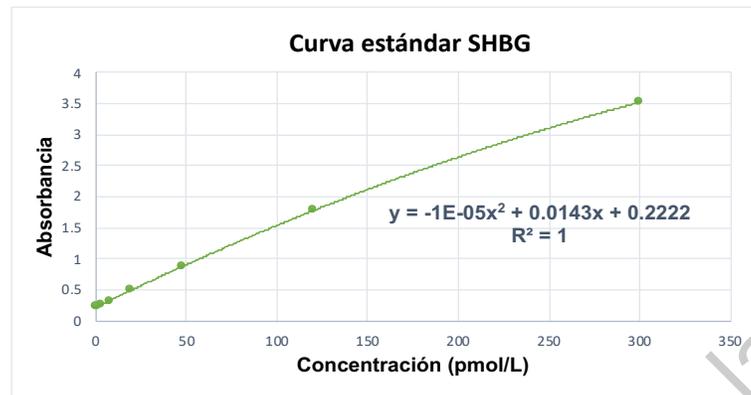


Figura 17. Curva estándar de SHBG

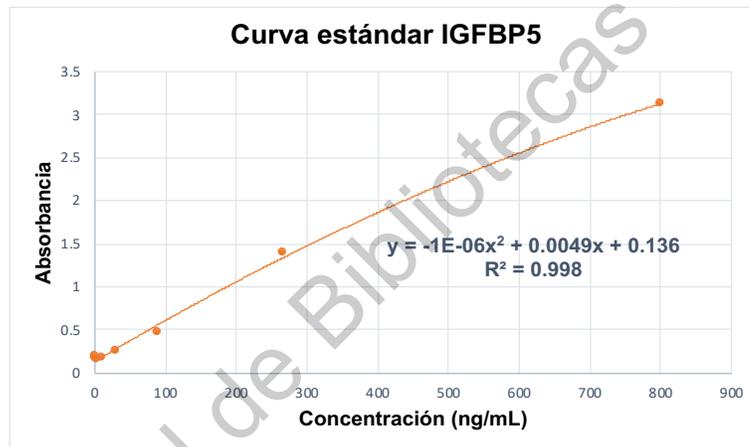


Figura 18. Curva estándar de IGFBP-5

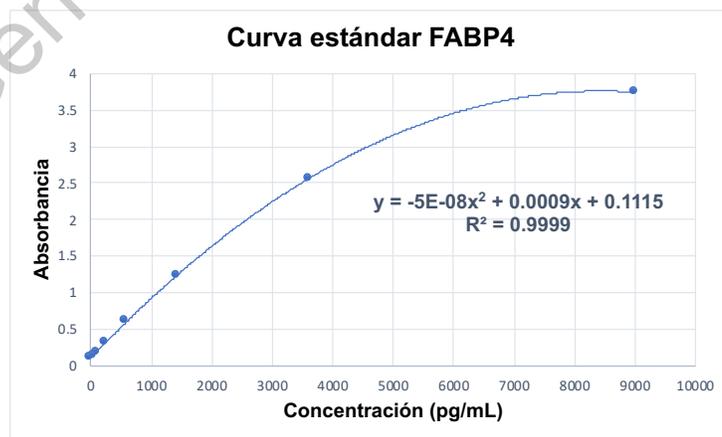


Figura 19. Curva estándar de FABP4

2.1.10 Definición de plan de procesamiento y presentación de la información

El análisis univariado de los datos clínicos, parámetros antropométricos y bioquímicos fueron analizados por medio de la prueba U de Mann-Whitney y T de student. Los datos de la determinación de las proteínas de interés en el primer trimestre de embarazo fueron analizados por medio de un Análisis de Componentes Principales (PCA) y posteriormente mediante modelos de regresión lineal, lo que permitió identificar aquellas proteínas que discriminen a las mujeres embarazadas sin DMG de aquellas diagnosticadas con DMG. Dichas proteínas fueron consideradas como candidatas a biomarcador de la DMG y fueron monitoreadas en cada trimestre de embarazo. Los datos de este estudio longitudinal fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney. Además, se utilizaron las curvas ROC para identificar la mejor proteína que discrimina los grupos de estudio, así como estimar el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad posible.

2.1.11 Cronograma de actividades

Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
Redacción de protocolo de tesis	Agosto 2018	Febrero 2019
Aprobación del protocolo por el comité de bioética	Febrero 2019	Marzo 2019
Registro de tema de tesis ante el Consejo de Investigación y Posgrado de la Facultad de Química	Marzo 2019	Abril 2019
Reclutamiento	Enero 2019	Diciembre 2019
Recopilación de datos personales, clínicos y parámetros antropométricos	Enero 2019	Diciembre 2019
Toma de muestras sanguíneas	Enero 2019	Diciembre 2019
Determinación de las proteínas de interés por medio de arreglos de anticuerpos	Septiembre 2019	Noviembre 2019
Identificación de las proteínas discriminantes entre grupos	Diciembre 2019	Junio 2019
Cuantificación de las proteínas discriminantes por medio de kits de ELISA	Agosto 2020	Septiembre 2020
Redacción de tesis	Septiembre 2020	Octubre 2020

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Reclutamiento de las participantes

Un total de 200 mujeres embarazadas fueron reclutadas en su primer trimestre de embarazo (11-14 semanas de gestación), de las cuales 83 participantes asistieron a las tres visitas trimestrales para la recolección de datos clínicos, antropométricos, muestra sanguíneas y el diagnóstico de DMG en el segundo trimestre de embarazo mediante la estrategia de un paso (CTGO de 75 g de glucosa, 2 h) bajo los criterios de IADPSG. Cabe mencionar que 49 participantes que concluyeron los tres muestreos fueron excluidas del grupo sin DMG a consecuencia que no cumplieron con los criterios de inclusión, ya que presentaron sobrepeso/obesidad pregestacional ($IMC >25 \text{ Kg/m}^2$) y/o resistencia a la insulina (índice HOMA ≥ 1.6 en el primer trimestre de embarazo), por lo que los grupos de estudio quedaron conformados por 19 mujeres embarazadas con DMG y 15 sin DMG. En la Figura 20 se muestra un diagrama del número inicial y final de las participantes de este estudio.

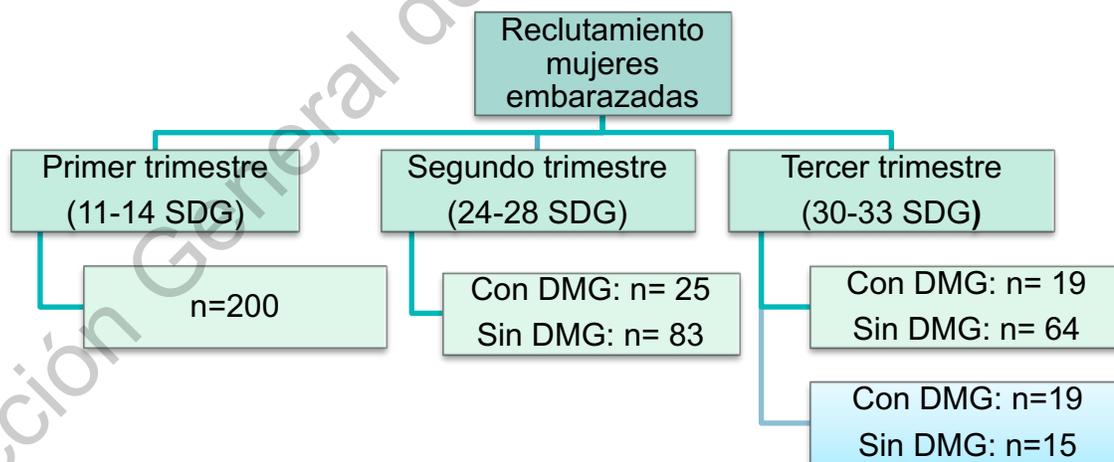


Figura 20. Diagrama de reclutamiento de mujeres embarazadas.

SDG: semanas de gestación.

Por lo tanto, se obtuvo una tasa de deserción del 58.5% ($n=117$) lo cual se debió a diversos motivos tales como la falta de transporte al hospital, falta de interés,

complicaciones en el embarazo y abortos. En la Figura 21 se muestra una gráfica de pastel indicando la razón de deserción con su respectivo porcentaje.

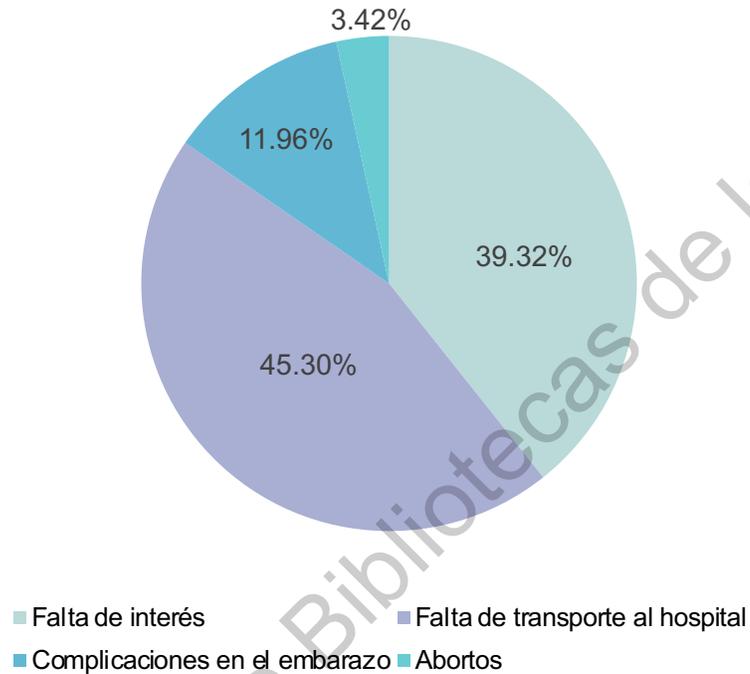


Figura 21. Razones de deserción de las mujeres embarazadas reclutadas.

En el Cuadro 6 se muestran las semanas promedio de gestación que presentaron las participantes en cada visita trimestral. Las mujeres con DMG y sin DMG tuvieron en promedio 12 semanas, 26 semanas y 32 semanas de gestación en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Lo cual indica que los tiempos de muestreos fueron homogéneos.

Cuadro 6. Semanas de gestación de las mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en cada trimestre de embarazo

Trimeste	Con DMG (n=19)	Sin DMG (n=15)	Valor de p
Primer trimestre	12.58 ± 0.22	12.8 ± 0.24	0.6454
Segundotrimestre	25.26 ± 0.24	26.13 ± 0.40	0.0985
Tercer trimestre	31.89 ± 0.26	32.3 ± 0.77	0.5552

Los resultados son mostrados como media ± error estándar de la media. Los valores de $p < 0.05$ son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba U de Mann-Whitney.

3.2 Datos clínicos de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG

En el Cuadro 7 se muestran los datos clínicos de las 34 participantes (con DMG, $n=19$; sin DMG, $n=15$) que concluyeron las tres visitas trimestrales. El grupo de mujeres embarazadas con DMG presentaron significativamente mayor edad en comparación de las mujeres embarazadas sin DMG ($p=0.0039$).

Cabe mencionar que la edad materna avanzada se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar DMG (McIntyre et al., 2019). En este estudio la mayoría de las mujeres embarazadas diagnosticadas con DMG se encuentran entre los 30-34 años de edad (36.8%), lo cual se puede observar en la Figura 22. Dicho resultado es similar al reportado por Qazi et al. (2016), quienes observaron la prevalencia más alta de DMG en el grupo etario de 31-35 años (36%).

Además, la mayoría de las mujeres con dicha patología eran multíparas (40%), es decir mujeres que han tenido más de un parto. En nuestro estudio se observó que el grupo con DMG presentó mayor propensión a gravidez (número de embarazos) con diferencia significativa ($p=0.0106$) y mayor número de partos a comparación del grupo sin DMG. Sin embargo, en este último parámetro no se

presentaron diferencias significativas entre los grupos. La asociación entre la paridad y la diabetes esta relacionada con la edad, ya que las mujeres con mayor paridad tienden a ser de edad avanzada (Qazi et al., 2016).

Cuadro 7. Datos clínicos de las participantes del grupo con DMG y sin DMG

Variable	Con DMG (n=19)	Sin DMG (n=15)	Valor de p
Edad (años)	29 ± 1.15	23.8 ± 1.44	0.0039
Gravidez	2.63 ± 0.31	1.6 ± 0.16	0.0106
Partos	0.84 ± 0.25	0.27 ± 0.15	0.1281
Cesáreas	0.6316 ± 0.24	0.2 ± 0.11	0.2535
Abortos	0.16 ± 0.08	0.13 ± 0.09	>0.9999
Antecedentes familiares con diabetes mellitus			
Sí	14 (73.68%)	7 (46.67%)	0.1075
No	5 (26.32%)	8 (53.33%)	
DMG en embarazos previos			
Sí	1 (5.26%)	0 (0%)	0.3671
No	18 (94.74%)	15 (100%)	

Los resultados de edad, gravidez, partos, cesáreas y abortos son mostrados como media ± error estándar de la media; antecedentes familiares con diabetes y DMG en embarazo previo son mostrados como n(%). Los valores de p=0.0039 y p=0.0106 son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba U de Mann-Whitney o Chi cuadrada. DMG: Diabetes mellitus gestacional.

Los antecedentes familiares de diabetes mellitus son considerados como un factor de riesgo para el desarrollo de DMG (Farahvar et al., 2019). Moosazadeh et al. (2017) reportaron que la razón de probabilidad de desarrollar DMG en mujeres que presentan el antecedente familiar de diabetes fue de 3.46 veces más que en aquellas mujeres que no lo presentan. Respecto a nuestros resultados, el 73.68% de las mujeres embarazadas con DMG presentan dicho antecedente, lo cual era de esperarse de acuerdo con lo establecido en la literatura. Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre los grupos de estudio.

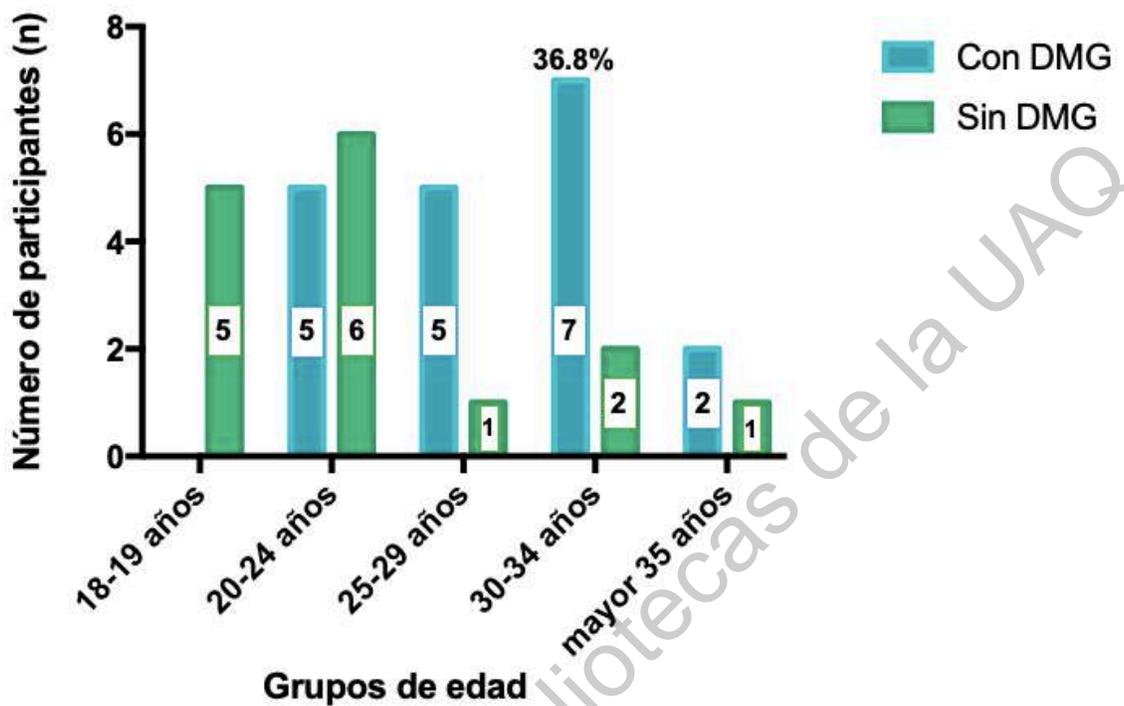


Figura 22. Distribución de la edad en el grupo de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG.

El haber presentado DMG en embarazos previos es una de las complicaciones maternas a largo plazo y factor de riesgo que contribuye al desarrollo de esta patología (McIntyre et al., 2019). La DMG tiene una tasa de recurrencia que varía del 30 al 84% en embarazos posteriores (Farahvar et al., 2019). En este estudio, solamente una paciente del grupo con DMG presentó el antecedente de DMG en embarazo previo. Es importante resaltar que la mayoría de las participantes encuestadas mencionaron que no les realizaron la CTGO para el diagnóstico de DMG en sus embarazos anteriores; por lo que el número de participantes con DMG en embarazos previos podría estar subestimado.

3.3 Parámetros antropométricos y bioquímicos de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en cada trimestre de gestación

En el Cuadro 8 se muestran los parámetros antropométricos y bioquímicos que fueron medidos en cada trimestre de embarazo en las 34 participantes que finalizaron los muestreos trimestrales, de las cuales 19 son mujeres embarazadas con DMG y 15 sin DMG. Las mujeres embarazadas con DMG presentaron un IMC significativamente mayor en el primer ($p < 0.0001$), segundo ($p = 0.0003$) y tercer ($p = 0.0002$) trimestre de gestación.

Cabe mencionar, que el riesgo de desarrollar DMG aumenta con el incremento del IMC materno debido a que la obesidad y la DMG comparten características metabólicas tales como la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperlipidemia e hiperglucemia (Martin et al., 2015). Martin et al. (2015) reportaron que las mujeres con obesidad tienen el doble de probabilidad de desarrollar DMG en comparación con las mujeres que presentan sobrepeso.

Las concentraciones de insulina disminuyeron del primer al segundo trimestre de gestación en ambos grupos de estudio manteniéndose constante hasta el tercer trimestre, lo cual es un resultado que no se esperaba. De acuerdo con la literatura, la segunda mitad de la gestación se caracteriza por un incremento progresivo en la resistencia a la insulina, de modo que los niveles de esta hormona incrementan aproximadamente 4 veces (Benasach, 2012).

Por otro lado, los niveles séricos de insulina se encontraron significativamente elevados en mujeres embarazadas con DMG en cada trimestre de embarazo ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$; $p = 0.0027$). Como reflejo de la aparición de la resistencia a la insulina en el periodo de gestación; en un embarazo complicado por DMG no puede hacer frente a las exigencias del embarazo, aún aumentando la secreción de insulina, ésta es insuficiente para mantener la euglucemia. Por lo tanto, se presenta la hiperglucemia y el desarrollo de DMG (Baz et al., 2016).

Cuadro 8. Parámetros antropométricos y bioquímicos de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación

Variables	Primer trimestre			Segundo trimestre			Tercer trimestre		
	Con DMG (n=19)	Sin DMG (n=15)	Valor de p	Con DMG (n=19)	Sin DMG (n=15)	Valor de p	Con DMG (n=19)	Sin DMG (n=15)	Valor de p
IMC (kg/m ²)	29.03 ± 1.25	21.41 ± 0.74	<0.0001	30.59 ± 1.14	24.5 ± 0.81	0.0003	31.39 ± 1.12	25.07 ± 0.91	0.0002
Insulina (uU/mL)	22.45 ± 3.56	6.435 ± 0.50	<0.0001	4.43 ± 0.63	1.65 ± 0.25	<0.0001	4.11 ± 0.60	2.09 ± 0.59	0.0027
Glucosa en ayunas (mg/dL)	91.11 ± 2.09	72.2 ± 1.27	<0.0001	94.05 ± 2.24	74 ± 1.81	<0.0001	90.47 ± 2.17	75.13 ± 0.91	<0.0001
Colesterol total (mg/dL)	176.2 ± 5.75	159.4 ± 3.95	0.0295	215.2 ± 9.35	213 ± 4.57	0.8499	232.6 ± 12.17	225.1 ± 7.33	0.6243
Triglicéridos (mg/dL)	158.3 ± 12.79	103.9 ± 7.49	0.0017	227.5 ± 18.49	174.5 ± 12.83	0.0591	274.1 ± 18.77	210 ± 11.85	0.0107
c-HDL (mg/dL)	45.05 ± 1.85	48.73 ± 2.03	0.1916	47.89 ± 2.18	53.67 ± 1.63	0.0536	47 ± 2.78	52.67 ± 2.04	0.1279
c-LDL (mg/dL)	99.53 ± 5.26	89.93 ± 4.02	0.1443	121.6 ± 9.77	124.4 ± 6.13	0.8233	135.3 ± 10.97	130 ± 8.02	0.7148
c-VLDL (mg/dL)	31.63 ± 2.55	20.73 ± 1.51	0.0017	45.63 ± 3.69	34.93 ± 2.56	0.0539	54.89 ± 3.78	42.07 ± 2.36	0.0111

Los resultados son mostrados como media ± error estándar de la media. Los valores de p<0.0001, p=0.0003, p=0.0002, p=0.0027, p=0.0295, p=0.0017 y p= 0.0111 son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba T de student o U de Mann-Whitney. DMG: diabetes mellitus gestacional; IMC: índice de masa corporal; c-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad; c-LDL: colesterol de lipoproteína de baja densidad; c-VLDL: colesterol de lipoproteína de muy baja densidad.

En cuanto a la glucosa en ayuno, el grupo de mujeres embarazadas con DMG presentó niveles significativamente elevados en cada trimestre de embarazo ($p < 0.0001$), lo cual era de esperarse ya que la DMG se caracteriza por un estado de hiperglucemia como consecuencia de la incapacidad de superar la resistencia a la insulina asociada al embarazo, la cual es originada por la secreción de hormonas diabetogénicas tales como el lactógeno placentario humano, el cortisol, la progesterona, los estrógenos y la prolactina (Johns et al., 2018; Mack & Tomich, 2017; Sert & Ozgu-Erdinc, 2020).

Asimismo, al llevar a cabo la CTGO para realizar el diagnóstico de DMG en el segundo trimestre de embarazo (semanas 24-28 de gestación), las mujeres embarazadas con DMG presentaron niveles significativamente ($p < 0.0001$) elevados de glucosa 1 h y 2 h poscarga en comparación de las mujeres embarazadas sin DMG, lo cual se puede observar en la Figura 23. Las mediciones de glucosa en ayunas, 1 y 2 h poscarga se toman en cuenta para realizar el diagnóstico de dicha patología, de acuerdo con los criterios de IADPSG (ADA, 2020).

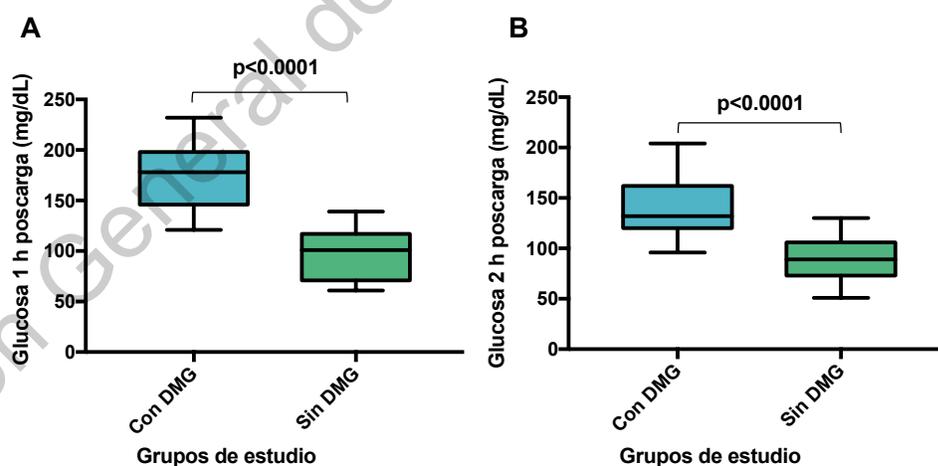


Figura 23. Concentraciones séricas de glucosa 1 h (A) y 2 h (B) poscarga en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG. Los valores de $p < 0.0001$ son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba T de student.

Respecto al perfil de lípidos, se observa que los niveles séricos de triglicéridos y c-VLDL tienen una tendencia en aumento conforme avanza el embarazo en los dos grupos de estudio. Durante los dos primeros tercios de la gestación, hay un aumento en la acumulación de grasa materna, asociado tanto con hiperfagia como con mayor lipogénesis. El último tercer trimestre se asocia con niveles altos de triglicéridos debido al aumento de lipólisis materna, por lo que hay mayor suministro de ácidos grasos y glicerol. En consecuencia se reesterifican en el hígado para formar triglicéridos y salir a la circulación en forma de VLDL. Asimismo, hay una disminución en la eliminación de VLDL de la circulación debido a la actividad reducida de la lipoproteína lipasa (LPL), la cual es una enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos en las VLDL (Herrera & Desoye, 2016; Wang et al., 2019).

Las mujeres embarazadas con DMG presentaron niveles más elevados de triglicéridos y c-VLDL que las mujeres embarazadas sin DMG en cada trimestre de embarazo. Solamente en el primer y tercer ($p=0.0107$ y $p=0.0111$, respectivamente) trimestre se presentaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. La resistencia a la insulina pronunciada en DMG promueve un aumento de la liberación de ácidos grasos libres desde los adipocitos, lo que induce la síntesis hepática de triglicéridos y por consiguiente una sobreproducción de partículas VLDL ricas en triglicéridos, este hecho explica la hipertrigliceridemia en la diabetes (Cuevas M. & Alonso K, 2016).

Por otro lado, los niveles de c-HDL se encuentran disminuidos en las mujeres embarazadas con DMG en comparación del grupo sin DMG en cada trimestre de embarazo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativa entre los grupos. Además, los niveles de c-HDL aumentaron del primer al segundo trimestre manteniéndose sin cambios al tercer trimestre de gestación en el grupo de mujeres embarazadas con DMG.

En presencia de la hipertrigliceridemia y del aumento de VLDL en el embarazo complicado por DMG, hay un aumento en la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) que promueve la transferencia de triglicéridos de VLDL a LDL y HDL. Por lo tanto, se produce un enriquecimiento en el contenido de triglicéridos de las partículas HDL siendo sustrato para LPL y la lipasa hepática (LH) que hidrolizan sus triglicéridos, resultando la eliminación de HDL. Este mecanismo explica las concentraciones bajas de c-HDL en los sujetos con DMG (Cuevas M. & Alonso K, 2016; Herrera & Desoye, 2016).

En el Cuadro 8 se muestra tanto el colesterol total como c-LDL aumentan conforme avanza el embarazo en las mujeres embarazadas con DMG y sin DMG. El colesterol es utilizado en la placenta como precursor para la síntesis de hormonas esteroideas, las cuales se incrementan a lo largo del embarazo (Ghio et al., 2011).

Estos dos parámetros bioquímicos se encuentran más elevados en el grupo de DMG. Referente a los niveles de LDL, el catabolismo de dicha lipoproteína se reduce en pacientes con diabetes debido a que disminuye el número de receptores de superficie celular de LDL B/E como consecuencia a la reducción de la expresión de estos genes mediada por insulina, lo cual induce una mayor duración de LDL en plasma que puede promover la deposición de lípidos dentro de las paredes arteriales. En cuanto al colesterol, existe una reducción de la absorción de colesterol y un aumento de la síntesis de éste en pacientes con diabetes (Vergès, 2015). Sin embargo, el colesterol total solamente presentó diferencia significativa en el primer trimestre de gestación entre los grupos de estudio.

Nuestros resultados del perfil de lípidos son similares a lo reportado por Wang et al. (2019), quienes determinaron los niveles de lípidos en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo en mujeres con embarazo normal y mujeres con DMG. Dichos autores encontraron que las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol total y c-LDL aumentaron progresivamente durante el embarazo. Asimismo, los niveles de c-HDL aumentaron del primer al segundo trimestre con

una ligera disminución en el tercer trimestre. Esto sucedió tanto en el grupo de DMG como en los controles.

Además, Wang et al. (2019) mostraron en el grupo de DMG concentraciones significativamente más altas de triglicéridos durante el embarazo, así como concentraciones significativamente más bajas de c-HDL en cada trimestre de gestación. En cuanto a los niveles séricos de colesterol total y c-LDL, no encontraron diferencias significativas entre el grupo DMG y grupo control.

Por otro lado, Ryckman et al. (2015) realizaron un metanálisis y encontraron que los niveles de triglicéridos estaban significativamente elevados en mujeres con DMG que en aquellas sin DMG en cada trimestre de gestación. Los niveles de c-HDL fueron significativamente más bajos en el grupo de DMG en el segundo y tercer trimestre de embarazo. No encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol total ni c-LDL entre los grupos de estudio.

3.4 Determinación simultánea de las proteínas de interés en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer trimestre de embarazo

La determinación simultánea de las proteínas de interés (SHBG, IGFBP-5, PAPP-A, FABP4, AFM, ADIPOQ, PAPP-A2, RBP4, RETN) se realizó en muestras de suero correspondientes al primer trimestre de embarazo (semanas 11-14 de gestación) de 19 mujeres embarazadas con DMG y 12 sin DMG. Lo anterior se efectuó utilizando un arreglo diseñado de anticuerpos que emplea un método de detección de fluorescencia semicuantitativo. La intensidad de fluorescencia, la cual es proporcional a la concentración de cada proteína en cada muestra, fue obtenida y los valores de las señales fueron utilizadas para realizar un PCA mediante el software R (Anexo D). En la Figura 24 se muestra el gráfico obtenido del PCA, donde se observa una ligera discriminación entre las mujeres embarazadas con DMG y sin DMG.

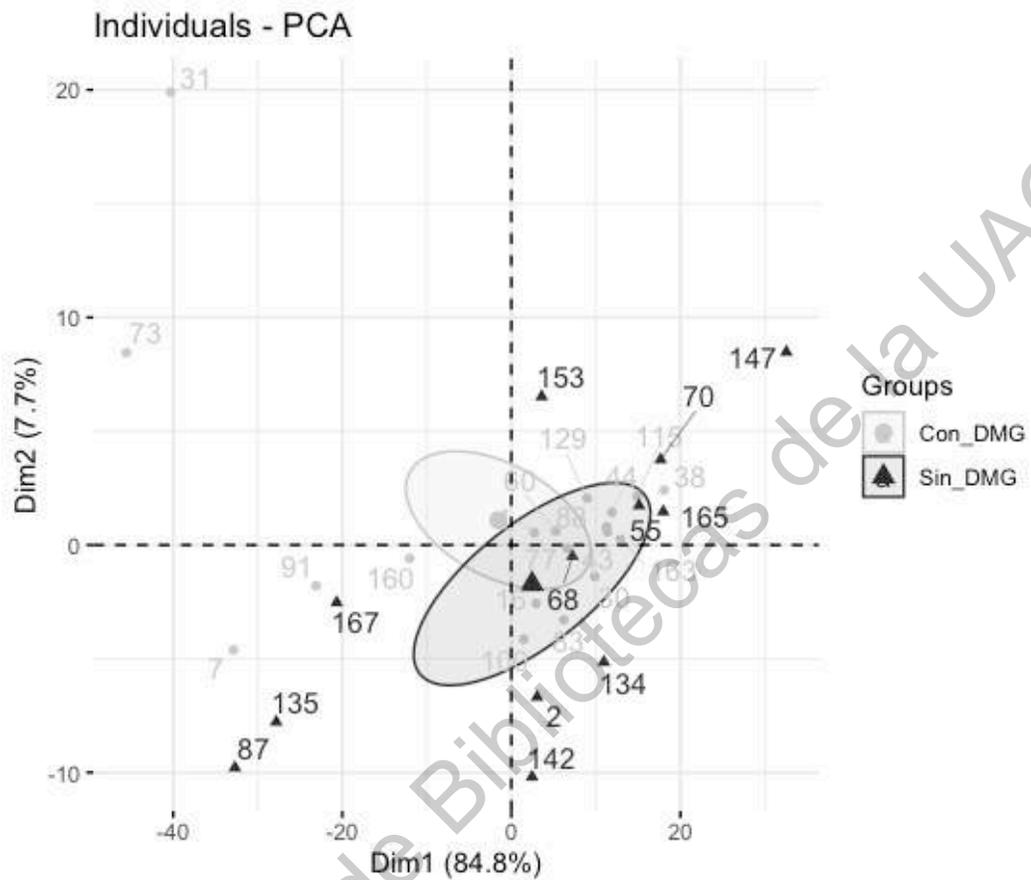


Figura 24. Gráfico de PCA que muestra el patrón de agrupamiento de los sujetos de estudio de acuerdo a las intensidades de fluorescencia de las proteínas en el primer trimestre de gestación. Los círculos grises representan el grupo de mujeres embarazadas con DMG y los triángulos de color negro el grupo de mujeres embarazadas sin DMG. Los números indican el código de identificación de cada sujeto.

En la Figura 25 se muestra el biplot del PCA que se obtuvo para identificar cuáles proteínas contribuyen a la discriminación de los grupos de estudio.

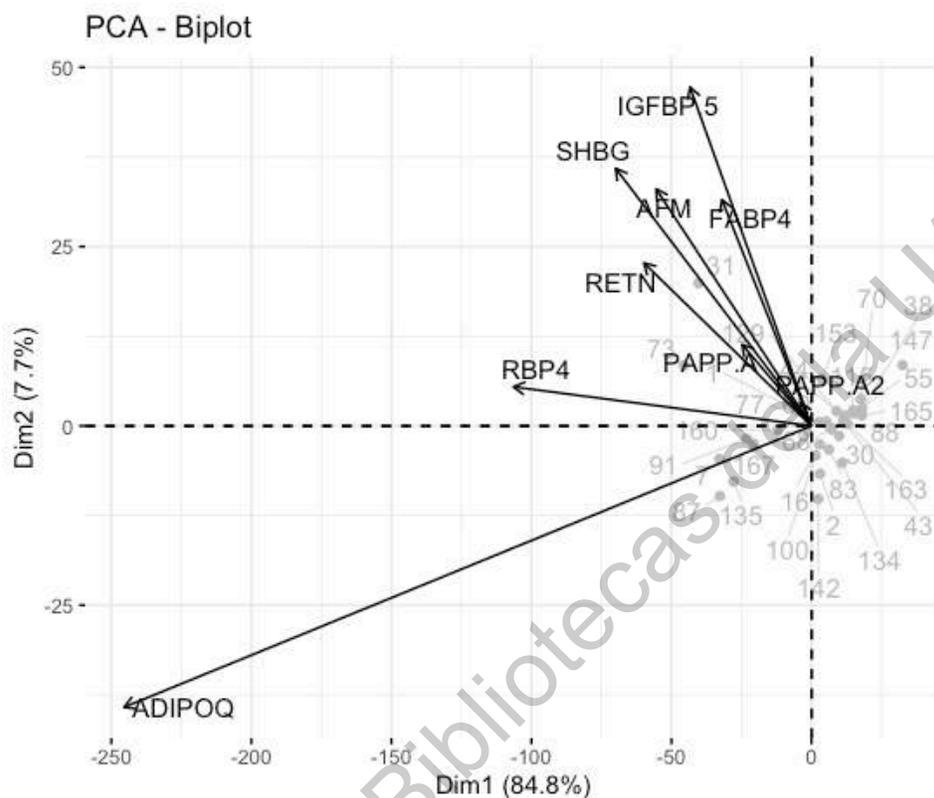


Figura 25. Biplot del PCA mostrando la contribución de cada variable en la discriminación de los grupos de estudio.

Con la finalidad de mejorar la discriminación entre los grupos de estudio se procedió a analizar los valores de las señales de fluorescencia de las 9 proteínas de interés (SHBG, IGFBP-5, PAPP-A, FABP4, AFM, ADIPOQ, PAPP-A2, RBP4 y RETN) junto con las covariables que incluyen los datos clínicos, parámetros antropométricos y bioquímicos por medio de regresión lineal.

Como resultado se obtuvo que en sólo 5 de las 9 proteínas analizadas, el diagnóstico fueron significativamente distintas entre los grupos de estudio. Dichas proteínas fueron SHBG, IGFBP-5, PAPP-A, FABP4 y RBP4. A continuación en los Cuadros 9, 10, 11, 12 y 13 se muestran los modelos de regresión lineal que se formaron junto con las covariables que fueron las más importantes.

Cuadro 9. Modelo de regresión lineal de SHBG

SHBG		
Covariables	Coefficiente estimado ± error estándar	Valor de p
Diagnóstico (sin DMG)	-233.25 ± 95.79	0.02
Triglicéridos	-1.22 ± 0.93	0.20
c-HDL	-10.49 ± 5.79	0.08
Gravidez	-97.96 ± 47.13	0.05
Cesáreas	228.24 ± 70.39	0.00
Antecedentes familiares con diabetes mellitus	-189.19 ± 87.23	0.04

Valor de p del modelo completo: 0.0121. Valor de p fue obtenido por medio de regresión lineal. SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; DMG: diabetes mellitus gestacional; c-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad.

La ecuación del modelo de SHBG es la siguiente: $SHBG = 1331.59 - 233.25(\text{diagnóstico sin DMG}) - 1.22(\text{triglicéridos}) - 10.49(\text{c-HDL}) - 97.96(\text{gravidez}) + 228.24(\text{cesáreas}) - 189.19(\text{antecedentes familiares con diabetes})$. A partir de este ajuste, se aprecia estadísticamente que los niveles de SHBG serán bajos cuando el diagnóstico sea sin DMG, los valores de triglicéridos sean bajos, c-HDL sean altos, gravidez con valor de 1, no tenga cesáreas (valor de 0) y no exista antecedentes familiares con diabetes (valor de 0).

Cuadro 10. Modelo de regresión lineal de IGFBP-5

IGFBP-5		
Covariables	Coefficiente estimado ± error estándar	Valor de p
Diagnóstico (sin DMG)	-83.29 ± 44.65	0.08
IMC	-10.61 ± 5.31	0.06
Insulina	6.14 ± 2.42	0.02
Colesterol	85.66 ± 65.29	0.21
Triglicéridos	-18.13 ± 13.23	0.19
c-HDL	-94.27 ± 66.43	0.17
c-LDL	-83.89 ± 65.16	0.21
SDG	22.96 ± 18.74	0.24
Gravidez	-54.53 ± 20.31	0.01
Cesáreas	94.68 ± 35.74	0.02
Antecedentes familiares con diabetes mellitus	-94.50 ± 35.29	0.01

Valor de p del modelo completo: 0.0373. Valor de p fue obtenido por medio de regresión lineal. IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina; DMG: diabetes mellitus gestacional; IMC: índice de masa corporal; c-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad; c-LDL: colesterol de lipoproteína de baja densidad; SDG: semanas de gestación.

La ecuación del modelo de IGFBP-5 es la siguiente: $IGFBP5 = 438.46 - 83.29(\text{diagnóstico sin DMG}) - 10.61(\text{IMC}) + 6.14(\text{insulina}) + 85.66(\text{colesterol}) - 18.13(\text{triglicéridos}) - 94.27(\text{c-HDL}) - 83.89(\text{c-LDL}) + 22.96(\text{SDG}) - 54.53(\text{gravidez}) + 94.68(\text{cesáreas}) - 94.50(\text{antecedentes familiares con diabetes})$. De este ajuste, se muestra estadísticamente que IGFBP-5 tendrá niveles bajos cuando el diagnóstico sea sin DMG, el IMC sea bajo, los valores de insulina sean bajos, el colesterol sea bajo, los triglicéridos sean bajos, c-HDL alto, c-LDL bajo, las SDG sean en promedio 13, gravidez con valor de 1, no tenga cesáreas (valor de 0) y sin antecedentes familiares con diabetes (valor de 0).

Cuadro 11. Modelo de regresión lineal de PAPP-A

PAPP-A		
Covariables	Coefficiente estimado ± error estándar	Valor de p
Diagnóstico (sin DMG)	-31.82 ± 17.01	0.07
Glucosa	-1.19 ± 0.65	0.08
c-HDL	-1.57 ± 0.73	0.04
Gravidez	-13.69 ± 6.38	0.04

Valor de p del modelo completo: 0.0629. Valor de p fue obtenido por medio de regresión lineal. PAPP-A: proteína A plasmática asociada al embarazo; DMG: diabetes mellitus gestacional; c-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad.

La ecuación del modelo de PAPP-A es la siguiente: $PAPP-A = 239.41 - 31.82(\text{diagnóstico sin DMG}) - 1.19(\text{glucosa}) - 1.57(\text{c-HDL}) - 13.69(\text{gravidez})$. En este ajuste, se observa estadísticamente que los niveles de PAPP-A serán bajos cuando el diagnóstico sea sin DMG, la glucosa tenga valores bajos, valores altos de c-HDL y gravidez con valor de 1.

Cuadro 12. Modelo de regresión lineal de RBP4

RBP4		
Covariables	Coefficiente estimado ± error estándar	Valor de p
Diagnóstico (sin DMG)	535.15 ± 267.90	0.06
IMC	62.43 ± 21.34	0.01
c-HDL	-35.93 ± 12.92	0.01
SDG	-214.96 ± 108.83	0.06
Gravidez	-1038.23 ± 286.71	0.00
Partos	793.08 ± 265.09	0.01
Cesáreas	1127.08 ± 290.38	0.00
Antecedentes familiares con diabetes mellitus	-304.94 ± 200.48	0.14

Valor de p del modelo completo: 0.0110. Valor de p fue obtenido por medio de regresión lineal. RBP4: proteína de unión a retinol-4; DMG: diabetes mellitus gestacional; IMC: índice de masa corporal; c-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad; SDG: semanas de gestación.

La ecuación del modelo de RBP4 es la siguiente: $RBP4 = 5289.03 + 535.15(\text{diagnóstico sin DMG}) + 62.43(\text{IMC}) - 35.93(\text{c-HDL}) - 214.96(\text{SDG}) - 1038.23(\text{gravidez}) + 793.08(\text{partos}) + 1127.08(\text{cesáreas}) - 304.94(\text{antecedentes familiares con diabetes})$. En este ajuste, se muestra estadísticamente que RBP4 tendrá valores altos cuando el diagnóstico sea sin DMG, el IMC sea bajo, los valores de c-HDL sean altos, las SDG sean en promedio 13, gravidez con valor de 1, no tenga partos (valor de 0), sin cesáreas (valor de 0) y sin antecedentes familiares con diabetes (valor de 0).

Cuadro 13. Modelo de regresión lineal de FABP4

FABP4		
Covariables	Coefficiente estimado \pm error estándar	Valor de p
Diagnóstico (sin DMG)	-43.72 \pm 21.36	0.05
IMC	-5.57 \pm 2.54	0.04
Insulina	3.46 \pm 1.16	0.01
Colesterol	44.06 \pm 31.23	0.17
Triglicéridos	-9.37 \pm 6.33	0.16
c-HDL	-48.70 \pm 31.78	0.14
c-LDL	-43.05 \pm 31.17	0.18
SDG	10.28 \pm 8.96	0.27
Gravidez	-28.87 \pm 9.71	0.01
Cesáreas	52.47 \pm 17.10	0.01
Antecedentes familiares con diabetes mellitus	-51.75 \pm 16.88	0.01

Valor de p del modelo completo: 0.0105. Valor de p fue obtenido por medio de regresión lineal. FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; DMG: diabetes mellitus gestacional; IMC: índice de masa corporal; c-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad; c-LDL: colesterol de lipoproteína de baja densidad; SDG: semanas de gestación.

La ecuación del modelo de FABP4 es la siguiente: $FABP4 = 256.50 - 43.72(\text{diagnóstico sin DMG}) - 5.57(\text{IMC}) + 3.46(\text{insulina}) + 44.06(\text{colesterol}) - 9.37(\text{triglicéridos}) - 48.70(\text{c-HDL}) - 43.05(\text{c-LDL}) + 10.28(\text{SDG}) - 28.87(\text{gravidez}) + 52.47(\text{cesáreas}) - 51.75(\text{antecedentes familiares con diabetes})$. A partir de este ajuste, se observa estadísticamente que FABP4 tendrá niveles bajos cuando el diagnóstico sea sin DMG, el IMC sea bajo, los valores de insulina sean bajos, el colesterol sea bajo, los triglicéridos sean bajos, c-HDL alto, c-LDL bajo, las SDG sean en promedio 13, gravidez con valor de 1, no tenga cesáreas (valor de 0) y sin antecedentes familiares con diabetes (valor de 0).

Las 4 proteínas restantes (AFM, ADIPOQ, PAPP-A2 y RETN) que no mostraron significancia en cuanto al diagnóstico en los modelos de regresión lineal, fueron analizadas estadísticamente mediante la prueba U de Mann Whitney. Además, se tomó en cuenta que cualquier aumento de ≥ 1.5 veces o disminución de ≤ -1.5 (≤ 0.65) veces en la intensidad de la señal puede considerarse significativamente diferente (Raybiotech, 2018). En el Cuadro 14 se muestran los resultados del análisis estadístico de las 9 proteínas de interés en el primer trimestre de embarazo.

Cuadro 14. Análisis estadístico de las 9 proteínas de interés en el primer trimestre de gestación

Proteína	Con DMG (n=19)	Sin DMG (n=12)	Fold-change	Valor de p
SHBG	404.4 ± 64.42	276.5 ± 43.26	1.5 [‡]	0.0121 [*]
IGFBP-5	40.63 ± 26.56	6.73 ± 4.96	6.0 [‡]	0.0373 [*]
PAPP-A	27.84 ± 9.00	22.70 ± 4.61	1.2	0.0629 [*]
FABP4	26.22 ± 13.82	5.39 ± 1.81	4.9 [‡]	0.0105 [*]
AFM	166.3 ± 37.11	115.3 ± 22.63	1.4	0.1905 ⁺
ADIPOQ	4888 ± 539.3	4652 ± 742.6	1.1	0.7342 ⁺
PAPP-A2	1.22 ± 0.25	1.89 ± 0.92	-1.6	0.7268 ⁺
RBP4	1224 ± 133.8	1241 ± 181.9	-1.0	0.0110 [*]
RETN	386.5 ± 53.65	273.2 ± 29.33	1.4	0.1642 ⁺

Los resultados son mostrados como media ± error estándar de la media. [‡]Fold-change ≥1.5 o ≤-1.5. Los valores de p=0.0121, p=0.0373 y p=0.0105 son considerados con significancia estadística. ^{*}Valor de p fue obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney. ⁺Valor de p del modelo completo obtenido por regresión lineal. DMG: diabetes mellitus gestacional; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina; PAPP-A: proteína A plasmática asociada al embarazo; FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; AFM: afamina; ADIPOQ: adiponectina; PAPP-A2: proteína A2 plasmática asociada al embarazo; RBP4: proteína de unión a retinol-4; RETN: resistina.

Con base en los resultados mostrados anteriormente, se encontraron diferencias significativas para SHBG (p=0.0121), el valor de p fue ajustado con las covariables de triglicéridos, c-HDL, gravidez, cesáreas y antecedentes familiares con diabetes; IGFBP-5 (p=0.0373) y FABP4 (p=0.0105) ajustado con las covariables de IMC,

insulina, colesterol total, triglicéridos, c-HDL, c-LDL, SDG, gravidez, cesáreas, antecedentes familiares con diabetes.

SHBG se encuentra significativamente aumentada en las mujeres embarazadas con DMG en comparación de las mujeres embarazadas sin DMG. Cabe mencionar que este resultado es contradictorio a lo que se ha reportado en investigaciones previas, en las que se han observado niveles disminuidos de esta proteína en mujeres embarazadas con DMG. La secreción de SHBG se suprime por la insulina, por lo tanto, los niveles bajos de SHBG se observan con frecuencia en los estados de resistencia a la insulina (Corcoran et al., 2018).

En cuanto a IGFBP-5, las mujeres con DMG presentaron niveles significativamente elevados de esta proteína. IGFBP-5 tiene la función de secuestrar a IGF-1 por lo que inhibe su señalización. Este factor de crecimiento es similar en estructura a la insulina que activa al receptor insulínico, lo que permite incrementar la sensibilidad a la insulina y mejorar el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, el aumento de los niveles séricos de IGFBP-5 resultaría en una disminución en la actividad de IGF-1, por lo que al estar inactivo contribuye la resistencia a la insulina (Anderlová et al., 2019; Rojas-Rodríguez et al., 2015).

Las mujeres con DMG presentaron niveles significativamente elevados de FABP4. Esta proteína es responsable del tráfico de ácidos grasos para que puedan ingresar a diversas rutas metabólicas tales como beta oxidación, reesterificación para formar fosfolípidos y triglicéridos (Herrera & Desoye, 2016). Por lo tanto, el aumento de FABP4 contribuye a la acumulación de ácidos grasos libres y suprime la actividad de proteínas en la vía de señalización de PI3K-AKT. En consecuencia, se inhibe la señalización de insulina conllevando a niveles altos de glucosa (Trojnar et al., 2019). Estos mecanismos se ven reflejados en la hiperglicemia e hipertrigliceridemia que se observan desde el primer trimestre de embarazo en las mujeres que desarrollaron DMG.

3.5 Red metabólica de mujeres embarazadas con DMG

Los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos en el análisis de los arreglos de anticuerpos fueron utilizados para calcular el fold-change de las 9 proteínas de interés (SHBG, IGFBP-5, PAPP-A, FABP4, AFM, ADIPOQ, PAPP-A2, RBP4, RETN). Dichos datos se utilizaron para contruir la red metabólica de mujeres embarazadas con DMG mediante el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Esto se realizó con la finalidad de conocer de que manera se encuentran conectadas las 9 proteínas.

En la Figura 26 se muestra la red metabólica obtenida, en la cual han sido mapeadas 8 de las 9 proteínas analizadas. La proteína AFM no fue mapeada por el software IPA, cabe mencionar que el mecanismo de acción de esta proteína aún se desconoce. En esta red metabólica se aprecia que las proteínas SHBG, IGFBP-5, PAPP-A, FABP4, ADIPOQ, PAPP-A2, RBP4 y RETN se conectan de manera indirecta a través de otras proteínas que no fueron evaluadas en este estudio.

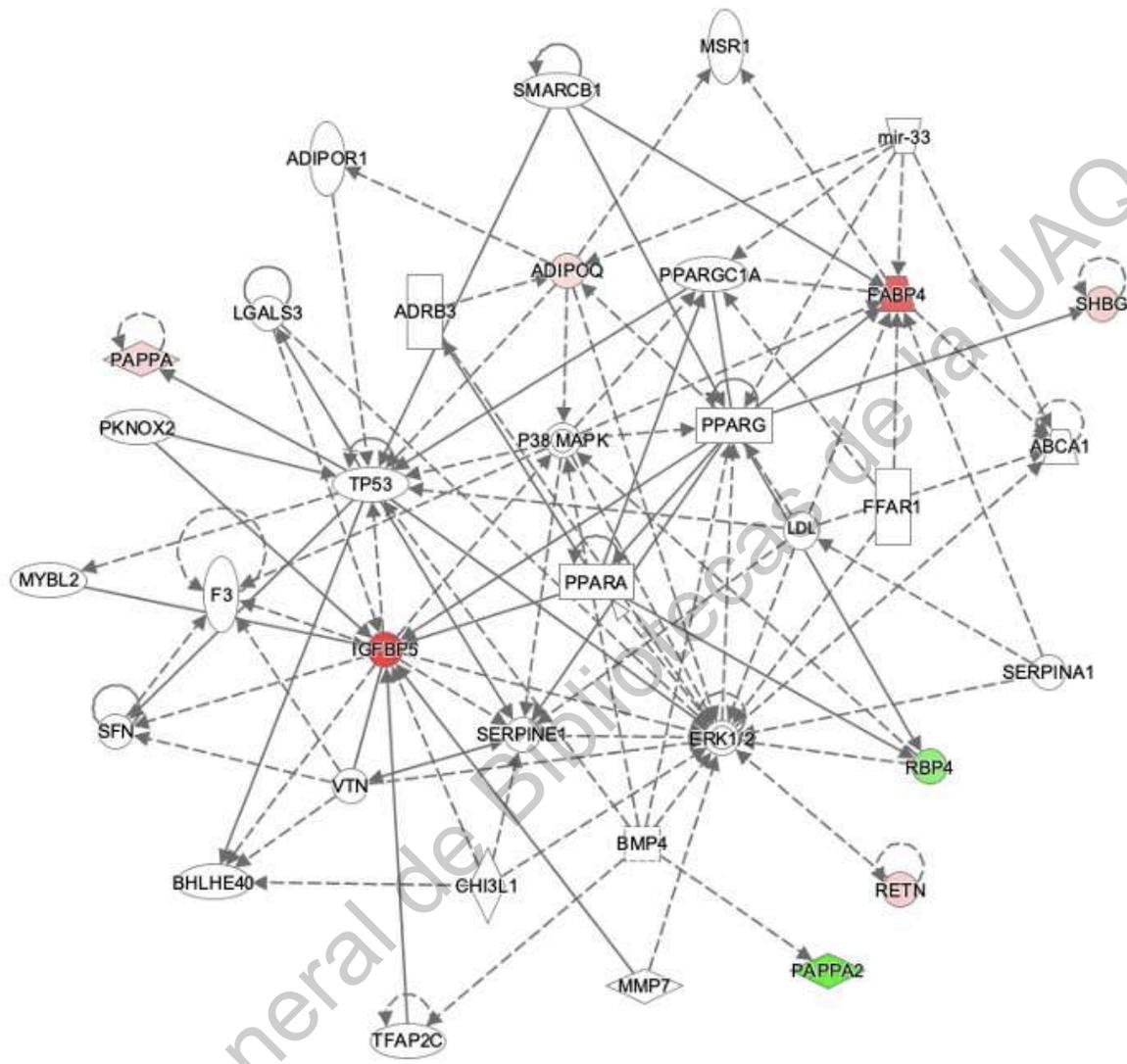


Figura 26. Red metabólica de mujeres embarazadas con DMG. Las proteínas de color rojo indican que se encuentran elevadas y de color verde disminuidas en mujeres embarazadas con DMG. Las proteínas de color blanco corresponden a las que no fueron evaluadas.

En la Figura 27 se muestra resaltado de color morado las proteínas que se encuentran involucradas en desórdenes del metabolismo de glucosa y en la Figura 28 en el desarrollo de resistencia a la insulina.

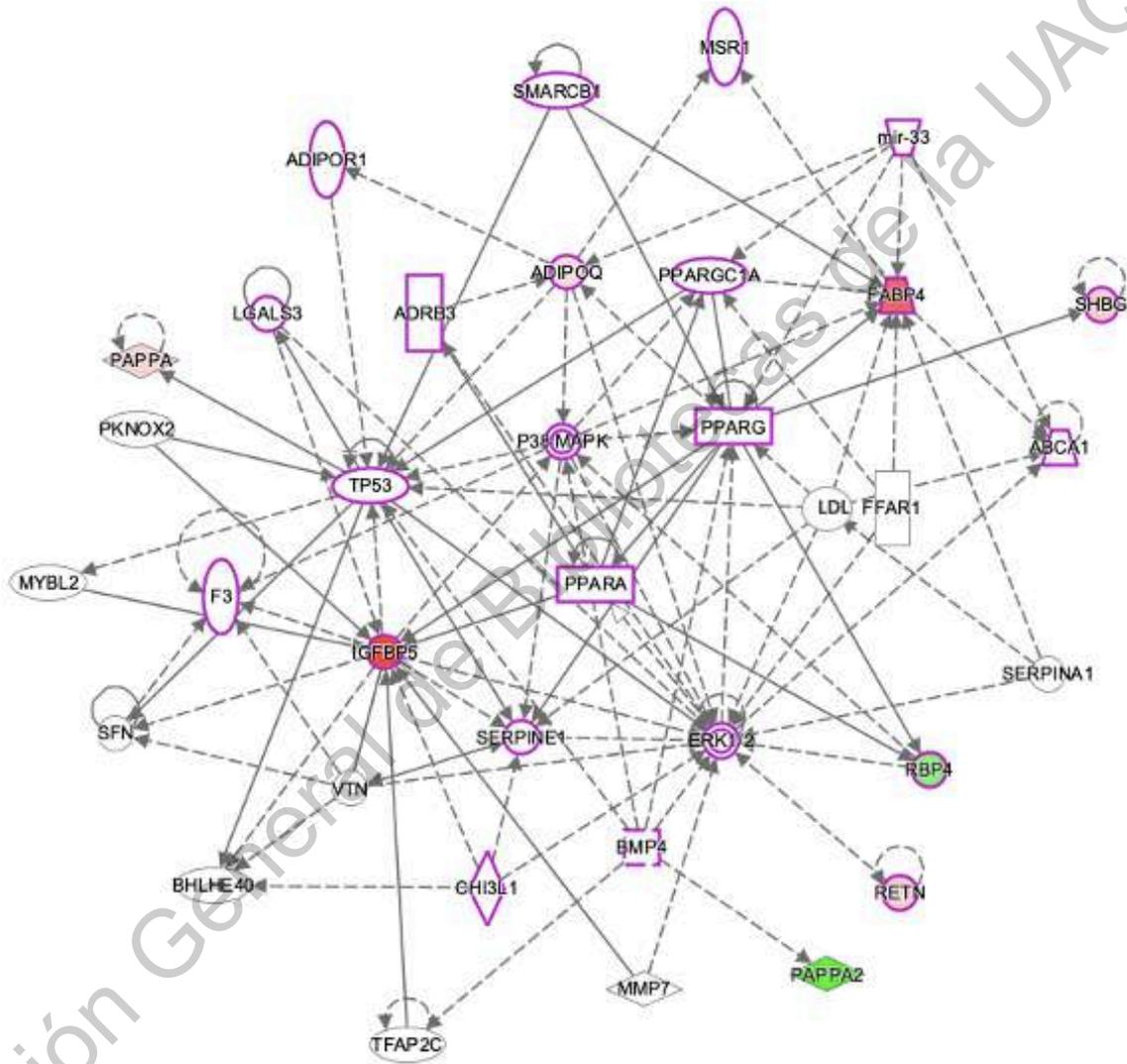


Figura 27. Implicación de las proteínas de interés en desórdenes del metabolismo de glucosa. Las proteínas de color rojo indican que se encuentran elevadas y de color verde disminuidas en mujeres embarazadas con DMG. Las proteínas de color blanco corresponden a las que no fueron evaluadas.

medio de kits de ELISA en muestras de suero correspondientes al primer (11-14 semanas de gestación), segundo (24-28 semanas de gestación) y tercer trimestre (30-33 semanas de gestación) de embarazo de 19 mujeres embarazadas con DMG y 15 sin DMG. Lo anterior se realizó con la finalidad de evaluar el potencial de dichas proteínas como biomarcadores de progresión de la enfermedad; ya que una vez que se diagnostica la DMG, es importante darle seguimiento a la progresión de la enfermedad conforme avanza el embarazo.

3.6.1 Globulina fijadora de hormonas sexuales

En la Figura 29 se observa que los niveles séricos de SHBG tienen una tendencia en aumento conforme avanza el embarazo en ambos grupos de estudio. La SHBG se une a los andrógenos y estrógenos para transportarlos en el plasma, regular su biodisponibilidad y acceso a los órganos diana (Xargay-Torrent et al., 2018). Durante el embarazo se producen cambios en el organismo de la madre para permitir el desarrollo del feto como es el aumento en los niveles de estrógenos, lo que conlleva al aumento de SHBG y cuyo nivel se eleva desde el inicio del embarazo (Kaňová & Bičíková, 2011). Los niveles de SHBG varían durante el periodo de gestación, siendo más altos entre las 16 y 27 semanas de embarazo (Xargay-Torrent et al., 2018).

La insulina inhibe la síntesis hepática de SHBG, por lo que se han asociado concentraciones bajas de esta proteína con hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, el cual es un rasgo característico de la DMG (Tawfeek et al., 2017; Wallace et al., 2013). Otro mecanismo por el cual puede estar implicado las bajas concentraciones de SHBG en la DMG, se debe a que dicha patología y la obesidad presentan un estado inflamatorio como consecuencia del incremento en la masa del tejido adiposo que lleva a un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$. Dichas citocinas al unirse con sus respectivos receptores, activan vías de señalización que llevan a la inhibición del factor nuclear 4 alfa de hepatocito, el cual es un factor de transcripción que controla la expresión del gen

SHBG, por lo que se disminuye la expresión del gen SHBG y por consiguiente se presentan niveles bajos de esta proteína (Simó et al., 2015).

En este estudio las mujeres embarazadas con DMG presentaron niveles bajos de SHBG en comparación del grupo de mujeres sin DMG en cada trimestre de embarazo. Solamente en el primer ($p=0.0050$) y tercer ($p=0.0153$) trimestre se presentaron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Las concentraciones obtenidas de SHBG en cada trimestre de embarazo fueron las siguientes: primer trimestre (664.9 ± 156.9 nmol/L con DMG vs 1269 ± 269.9 nmol/L sin DMG; $p=0.0050$); segundo trimestre (1591 ± 222.9 nmol/L con DMG vs 1919 ± 170.4 nmol/L sin DMG; $p=0.0829$) y tercer trimestre (1934 ± 313 nmol/L con DMG vs 2625 ± 296.8 nmol/L sin DMG; $p=0.0153$)

El resultado obtenido en el primer trimestre de embarazo coincide a lo reportado por Zhang et al. (2018), quienes encontraron concentraciones disminuidas significativamente en mujeres con DMG en comparación del grupo de mujeres sin DMG (93.9 ± 34.4 nmol/L vs 128.1 ± 60.3 nmol/L; $p=0.001$). Dichos autores concluyeron que los niveles bajos de dicha proteína durante el primer trimestre de gestación puede predecir el desarrollo de DMG.

Tawfeek et al. (2017) reportaron niveles significativamente bajos de SHBG en un grupo de mujeres con DMG en comparación de las mujeres sin DMG (23 nmol/L vs 78 nmol/L; $p=0.001$) en el segundo trimestre de embarazo. Por lo que concluyeron que SHBG es un biomarcador potencialmente útil para identificar a mujeres con DMG.

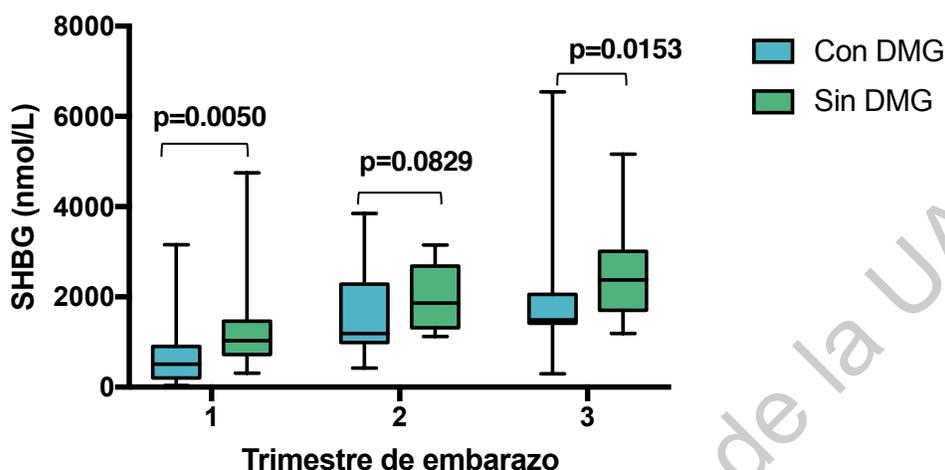


Figura 29. Concentraciones de SHBG en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo. Los valores de $p=0.0050$ y $p=0.0153$ son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba U de Mann Whitney.

3.6.2 Proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina

Con respecto a las concentraciones séricas de IGFBP-5 no se observa una tendencia clara conforme avanza el embarazo en el grupo de mujeres con DMG y sin DMG. La concentración media de IGFBP-5 de las participantes con DMG fue mayor que la del grupo sin DMG en cada trimestre de embarazo: primer trimestre (311.3 ± 98.52 ng/mL con DMG vs 181.3 ± 86.71 ng/mL sin DMG; $p=0.2137$), segundo trimestre (499.9 ± 167.9 ng/mL con DMG vs 204.3 ± 89.79 ng/mL sin DMG; $p=0.1802$) y tercer trimestre (547.2 ± 289.9 ng/mL con DMG vs 234.4 ± 101.8 ng/mL sin DMG; $p=0.3918$). Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre los grupos de estudio. En la Figura 30 se muestra la tendencia de los niveles séricos de IGFBP-5 en cada grupo de estudio.

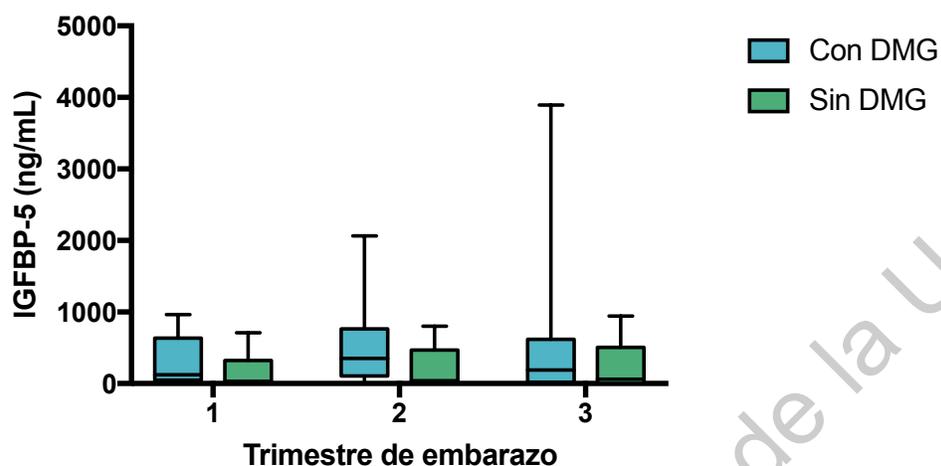


Figura 30. Concentraciones séricas de IGFBP-5 en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo. Los valores de $p < 0.05$ son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba U de Mann Whitney.

La IGFBP-5 tiene afinidad de unión a IGF-1, lo que evita la activación de su receptor (IGF-1R) (Bach, 2015). Como se mencionó anteriormente, IGF-1 es una hormona similar en estructura a la insulina, por lo que también puede activar al receptor insulínico. La activación de IGF-1R y del receptor de insulina comparten algunas vías de señalización, como la de PI3K y Akt dando como resultado la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática para la captación de glucosa (Haywood et al., 2019). Por lo tanto, un incremento de IGFBP-5 daría como consecuencia en reducir la activación de IGF-1 y por ende la disminución de la sensibilidad a la insulina.

Zhao et al. (2017) mostraron en un análisis proteómico de primer trimestre en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG que IGFBP-5 era una de las cuatro proteínas expresadas diferencialmente, encontrándose significativamente concentraciones más altas en mujeres que desarrollaron posteriormente DMG.

3.6.3 Proteína de unión a ácidos grasos 4

Los resultados obtenidos de las concentraciones séricas de FABP4 indican que las mujeres embarazadas con DMG presentan niveles altos de dicha proteína en comparación del grupo de mujeres sin DMG en cada trimestre: primer (11.23 ± 1.71 $\mu\text{g/L}$ con DMG vs 4.21 ± 0.58 $\mu\text{g/L}$ sin DMG), segundo (6.29 ± 0.73 $\mu\text{g/L}$ con DMG vs 3.25 ± 0.64 $\mu\text{g/L}$ sin DMG) y tercer trimestre (7.16 ± 0.90 $\mu\text{g/L}$ con DMG vs 4.55 ± 0.82 sin DMG). Las diferencias significativas entre los grupos de estudio se presentaron en el primer ($p < 0.0001$), segundo ($p = 0.0006$) y tercer ($p = 0.0100$) trimestre de embarazo. En la Figura 31 se muestra los niveles séricos de FABP4 de los grupos de estudio en cada trimestre de embarazo.

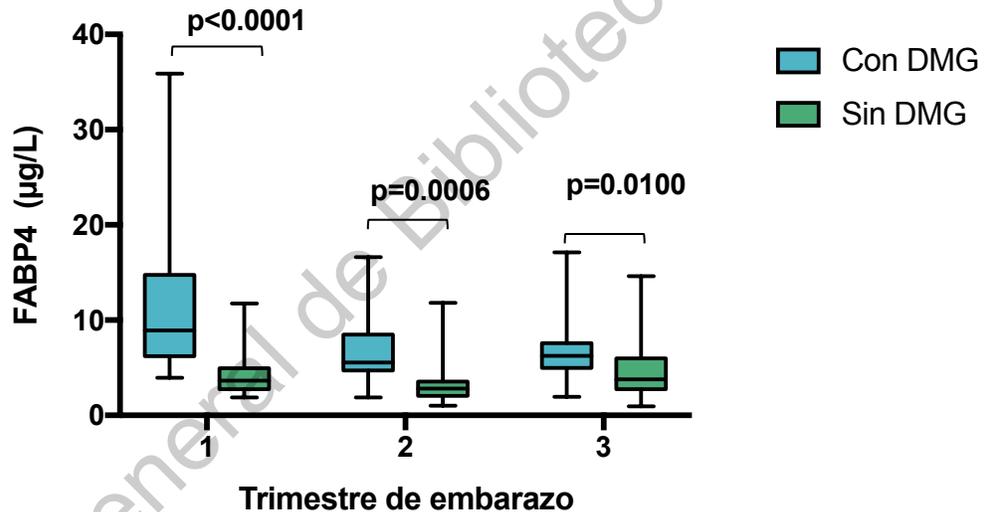


Figura 31. Concentraciones séricas de FABP4 en mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo. Los valores de $p < 0.0001$, $p = 0.0006$ y $p = 0.0100$ son considerados como significativos. El valor de p fue obtenido por medio de la prueba U de Mann Whitney.

La FABP4 es una chaperona lipídica que transporta los ácidos grasos generados por la lipólisis desde las gotas lipídicas hasta la utilización extracelular y/o intracelular (Furuhashi et al., 2014). Una elevación en los niveles de FABP4 podría conllevar a la acumulación de ácidos grasos libres de cadena corta y en

consecuencia suprimir la activación de proteínas en la vía de señalización de PI3K-Akt. Por lo tanto, se inhibe glucólisis, disminuye la captación y utilización de glucosa en músculos e hígado (Trojnar et al., 2019).

En estudios previos, Tu et al. (2017) reportaron concentraciones elevadas significativamente de FABP4 en el primer trimestre de embarazo en mujeres que desarrollaron DMG con respecto a las mujeres que no presentaron dicha patología (23.9 ng/mL con DMG vs 16.8 ng/mL sin DMG; $p < 0.001$). Concluyendo que las concentraciones altas de FABP4 en el primer trimestre se asocian con un mayor riesgo de desarrollar DMG.

Por otro lado, Ning et al. (2016) analizaron las concentraciones de FABP4 entre las semanas 23-30 de gestación, encontrando significativamente niveles séricos elevados de esta proteína en el grupo DMG en comparación del grupo sin DMG ($4,79 \pm 2,11$ ng/mL DMG vs $1,13 \pm 0,62$ ng / mL sin DMG, $p < 0,01$). Dicho autores concluyeron que FABP4 puede servir como un nuevo biomarcador para DMG.

En nuestro estudio, la trayectoria longitudinal de los niveles de FABP4 en el grupo con DMG, muestran que las concentraciones de dicha proteína disminuyeron del primer al segundo trimestre, aumentando ligeramente del segundo al tercer trimestre de embarazo. En cuanto al grupo sin DMG, los niveles de FABP4 permanecieron sin cambios notables a lo largo del embarazo.

Zhang et al. (2016) realizaron la medición sérica de FABP4 en el segundo trimestre, 24-28 semanas, (32.35 ± 3.06 $\mu\text{g/L}$ DMG vs 22.01 ± 2.00 $\mu\text{g/L}$ sin DMG; $p < 0.001$) y tercer trimestre, ≥ 37 semanas-1 semana antes del parto, (36.47 ± 4.00 $\mu\text{g/L}$ DMG vs 21.79 ± 1.32 $\mu\text{g/L}$ sin DMG; $p < 0.01$) obteniendo concentraciones elevadas significativamente en el grupo de DMG tanto en el segundo como en el tercer trimestre de embarazo. Al igual como en nuestro estudio, las mujeres con DMG tuvieron un aumento de FABP4 del segundo al tercer trimestre, mientras que el grupo sin DMG no presentaron cambios en los niveles de dicha proteína durante

el embarazo. Los autores concluyeron que FABP4 puede estar involucrada en el desarrollo de DMG.

3.7 Curvas ROC de SHBG, IGFBP-5 y FABP4 en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo

Las curvas ROC es una herramienta que se utiliza con frecuencia para evaluar la eficiencia diagnóstica o precisión de una prueba de diagnóstico, con el objetivo de diferenciar a los pacientes con enfermedad de los pacientes sin enfermedad (Carter et al., 2016). Las concentraciones obtenidas de SHBG, IGFBP-5 y FABP5 fueron utilizadas para construir sus respectivas curvas ROC en cada trimestre de embarazo, con la finalidad de estimar el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) para comparar la capacidad discriminativa de distinguir pacientes con DMG y sin DMG de cada proteína y determinar el punto de corte en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta (Cerdeira & Cifuentes, 2012).

El AUC es una forma eficaz de resumir la precisión diagnóstica de la prueba para discriminar pacientes con y sin la enfermedad a lo largo de todo el rango de puntos de corte posibles. Toma valores de 0 a 1, donde un valor 0 indica una prueba inexacta y un valor de 1 refleja una prueba perfectamente precisa. En general, un AUC de 0.5 sugiere que no hay discriminación, 0.51-0.69 se considera una prueba deficiente, 0.7-0.79 una prueba aceptable, 0.8-0.89 nos indica una prueba buena y 0.9-0.99 una prueba excelente (Carter et al., 2016; Mandrekar, 2010).

Los diferentes puntos de la curva corresponden a los diferentes puntos de corte utilizados para determinar si los resultados de la prueba son positivos (Mandrekar, 2010). Gráficamente, el punto de corte de una escala continua que determina la sensibilidad y especificidad más alta corresponde al punto de la curva ROC más cercano al ángulo superior-izquierdo del gráfico (punto 0,100), es decir, más cercano al punto del gráfico cuya sensibilidad=100% y especificidad=100%. Además, al conocer los valores de sensibilidad y especificidad determinados por los diferentes puntos de corte, se puede optar por aquel que determine la mayor

sensibilidad o la mayor especificidad, según sea el objetivo (Cerdeira & Cifuentes, 2012).

3.7.1 Curvas ROC en el primer trimestre de embarazo

En la Figura 32 se muestra las curvas ROC de las tres proteínas analizadas en el primer trimestre de embarazo, donde se observa que la proteína FABP4 presenta, de manera general, una mejor curva ROC en comparación con las otras dos proteínas.

En el Cuadro 15 se muestran los resultados obtenidos del AUC de cada curva ROC. De las tres proteínas, solamente el AUC de FABP4 y SHBG presentaron significancia estadística ($p < 0.0001$ y $p = 0.0055$, respectivamente). Al comparar el AUC, estos valores sugieren que FABP4 discrimina de mejor manera que SHBG e IGFBP-5 al grupo de mujeres embarazadas con DMG y sin DMG en el primer trimestre de embarazo, debido a que el AUC de esta proteína es mayor que el AUC de las dos proteínas restantes.

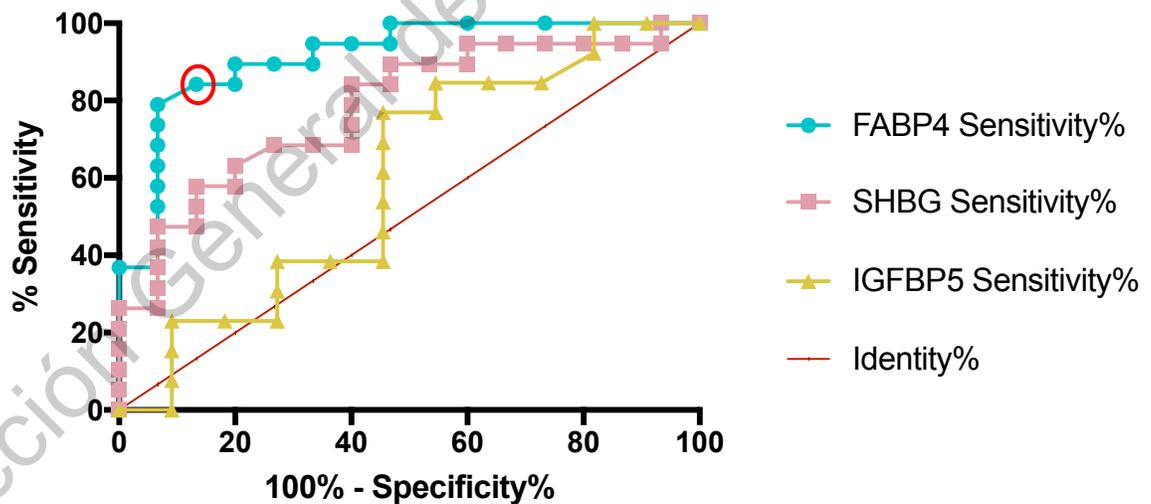


Figura 32. Curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el primer trimestre de embarazo. Círculo rojo representa el punto de corte óptimo de FABP4. FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

Cuadro 15. AUC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el primer trimestre de embarazo

Primer trimestre				
Proteína	AUC	Error estándar	95% IC	Valor p
FABP4	0.914	0.0506	0.8148-1.013	<0.0001
SHBG	0.7807	0.0797	0.6244-0.937	0.0055
IGFBP5	0.5979	0.1226	0.3577-0.8381	0.4173

AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

Con base a los resultados obtenidos de la curva ROC, el punto de corte óptimo de FABP4 en el primer trimestre de embarazo fue de >5.994 µg/L con una sensibilidad de 84.21% y especificidad de 86.67%.

Tu et al. (2017) estimaron un punto de corte para FABP4 en el primer trimestre de gestación de >18.5 ng/mL, el cual arrojó una sensibilidad y especificidad de 81.8% y 71.2%, respectivamente, en mujeres chinas. Por lo tanto, los resultados de este estudio indican que la proteína FABP4 podría ser considerada como un candidato a biomarcador sérico para el diagnóstico oportuno de DMG con alta sensibilidad y especificidad en distintas poblaciones; sin embargo, el punto de corte deberá ser ajustado para cada etnia.

3.7.2 Curvas ROC en el segundo trimestre de embarazo

Las curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 del segundo trimestre de embarazo se muestran en la Figura 33. FABP4 fue la más sobresaliente con p=0.0009 y mayor AUC que el resto de las proteínas en el segundo trimestre de gestación. SHBG estaría en una posibilidad de también explorarse con p=0.0798. Por lo tanto, FABP4 es la proteína que mejor discrimina a las pacientes con DMG y sin DMG. En el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos del AUC de las tres proteínas analizadas.

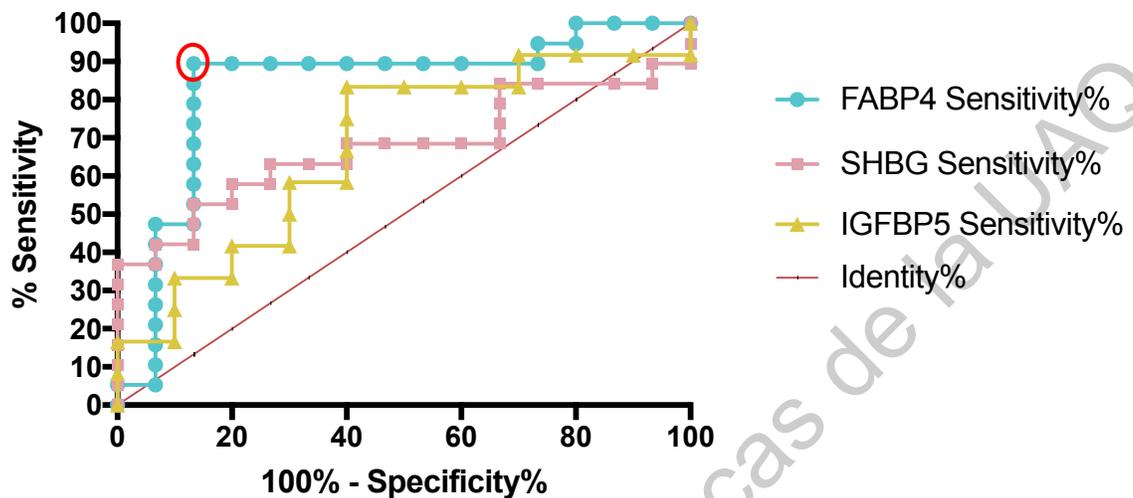


Figura 33. Curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el segundo trimestre de embarazo. Círculo rojo representa el punto de corte óptimo de FABP4. FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

Cuadro 16. AUC de FABP4, SHBG e IGFBP5 en el segundo trimestre de embarazo

Segundo trimestre				
Proteína	AUC	Error estándar	95% IC	Valor p
FABP4	0.8351	0.0794	0.6794-0.9908	0.0009
SHBG	0.6772	0.0938	0.4932-0.8612	0.0798
IGFBP5	0.675	0.1189	0.4419-0.9081	0.1661

AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

Respecto a los resultados obtenidos de la curva ROC, el punto de corte estimado de FABP4 en el segundo trimestre de embarazo (24-28 semanas de gestación) para

discriminar a las mujeres embarazadas con DMG fue $>3.634 \mu\text{g/L}$ con una sensibilidad y especificidad de 89.47% y 86.67%, respectivamente. En estudios previos, Ning et al. (2016) reportaron que el punto de corte óptimo de FABP4 para distinguir a las pacientes con DMG entre las semanas 23-30 de gestación fue de 1.96 ng/mL, con una sensibilidad de 86.96% y especificidad de 89.09%.

3.7.3 Curvas ROC en el tercer trimestre de embarazo

Las proteínas FABP4, SHBG e IGFBP5 se analizaron en el tercer trimestre con la finalidad de evaluar la progresión de DMG conforme avanza el embarazo, una vez que ha sido diagnósticada dicha enfermedad.

En la Figura 34 se muestra las curva ROC de las proteínas analizadas en el tercer trimestre de gestación. Las proteínas FABP4 y SHBG presentaron significancia respecto a su AUC ($p=0.0108$ y $p=0.0159$, respectivamente), siendo FABP4 la que mejor discrimina al grupo de pacientes con DMG en el tercer trimestre de gestación al ser la proteína con mayor AUC. En el Cuadro 17 se muestran los resultados obtenido del AUC de FABP4, SHBG e IGFBP-5.

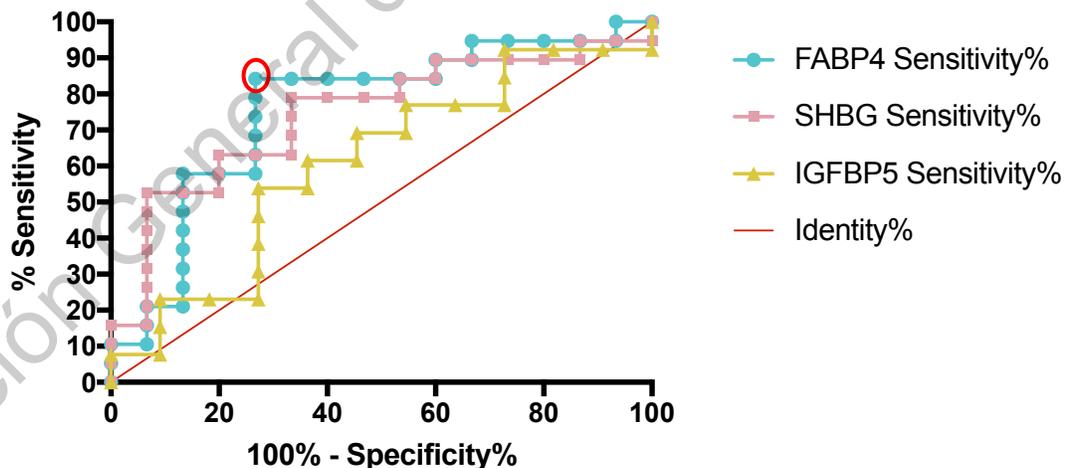


Figura 34. Curva ROC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el tercer trimestre de embarazo. Círculo rojo representa punto de corte óptimo de FABP4. FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

Cuadro 17. AUC de FABP4, SHBG e IGFBP-5 en el tercer trimestre de embarazo

Tercer trimestre				
Proteína	AUC	Error estándar	95% IC	Valor p
FABP4	0.7579	0.0881	0.5852-0.9306	0.0108
SHBG	0.7439	0.0868	0.5737-0.914	0.0159
IGFBP5	0.6084	0.1192	0.3748-0.842	0.3692

AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; IGFBP-5: proteína de unión al factor de crecimiento 5 similar a la insulina.

Con base en los resultados obtenidos de la curva ROC, el mejor punto de corte de FABP4 que distingue al grupo de mujeres con DMG en el tercer trimestre de embarazo fue $>4.81 \mu\text{g/L}$, proporcionando una sensibilidad de 84.21% y una especificidad de 73.33%.

Por lo tanto, al interpretar los valores de AUC nos sugiere que FABP4 es la proteína que mejor discrimina las pacientes con DMG y sin DMG en cada trimestre de embarazo, catalogando FABP4 como un potencial candidato para el diagnóstico oportuno en el primer trimestre del embarazo (AUC: 0.914), una prueba buena en el segundo trimestre (AUC: 0.8351) y prueba aceptable en el tercer trimestre de gestación (AUC: 0.7579). La disminución del AUC y, como consecuente, de la sensibilidad y especificidad, de FABPP4 conforme avanza el embarazo podría estar relacionado a las alteraciones hormonales y metabólicas que se presentan en los últimos trimestres de la gestación.

3.8 Limitaciones del estudio

Las siguientes limitaciones del estudio deben ser consideradas. (1) Los análisis estadísticos fueron ajustados por factores de riesgo conocidos de DMG; sin embargo, no se excluye la posibilidad de otras variables confusoras, como la dieta, actividad física, microbióta colónica y comorbilidades relacionadas a la diabetes mellitus. Estas variables que pudieran inducir confusión deben eventualmente cuantificarse en estudios futuros de verse inmersas en relaciones causales presuntas. (2) Los participantes incluidos en el estudio fueron mujeres adultas mexicanas, quienes pudieran tener una alta susceptibilidad de desarrollar DMG y sus complicaciones debido a predisposiciones genéticas, ya que dicha patología es más frecuente en mujeres mexicanas que en otras mujeres latinas; por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio deben ser cuidadosamente trasladados a otros grupos étnicos. (3) El diseño de este estudio es considerado exploratorio debido al relativamente bajo tamaño de muestra. Sin embargo, es importante destacar que este es el primer estudio que lleva a cabo la evaluación de proteínas séricas como posibles biomarcadores para el diagnóstico oportuno de DMG en mujeres mexicanas.

4. CONCLUSIONES

De los resultados presentados y analizados en este estudio se concluye que las mujeres embarazadas con DMG presentan niveles elevados de glucosa en comparación con las mujeres sin DMG desde el primer trimestre de gestación, lo que nos indica que estas pacientes comienzan a presentar alteraciones metabólicas de los carbohidratos en etapas tempranas del embarazo. Sin embargo, debido a la presencia de resistencia a la insulina; las mujeres embarazadas pueden presentar normoglucesmia, lo que dificulta el diagnóstico de DMG en el primer trimestre de embarazo. El presente estudio muestra que la proteína FABP4 presenta una alta sensibilidad y especificidad para discriminar entre mujeres sin DMG y con DMG en el primer trimestre de gestación, por lo que esta proteína podría ser propuesta como un biomarcador sérico para el diagnóstico temprano de DMG. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de la proteína FABP4 disminuye conforme avanza el embarazo; por lo que no puede ser propuesta como biomarcador de progresión de la DMG.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, M. M. (2016). Gestational diabetes mellitus: Screening with fasting plasma glucose. *World Journal of Diabetes*, 7(14), 279-289.

Aleman L., & Guerrero J. (2018). Hiperglicemia por sepsis: del mecanismo a la clínica. *Revista Médica de Chile*, 146(4), 502-510.

American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020; 43(Suppl. 1): S14–S31.

Anderlová, K., Cinkajzlová, A., Šimják, P., Kloučková, J., Kratochvílová, H., Lacinová, Z., Kaválková, P., Krejčí, H., Mráz, M., Pařízek, A., Haluzík, M., & Kršek, M. (2019). Insulin-Like Growth Factor Axis in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *Physiological Research*, 68(9), 807–816.

Arunkumar, A., & Sushil, J. (2017). Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1321-1338.

Bach, L. A. (2015). Insulin-like growth factor binding proteins 4-6. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(5), 713–722.

Baranda-Nájera, N., Patiño-Rodríguez, D. M., Ramírez-Montiel, M. L., & Rosales-Lucio, J. (2014). Edad materna avanzada y morbilidad obstétrica. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 7(3), 110-113.

Barros, R. P. D. A., Morani, A., Moriscot, A., & Machado, U. F. (2008). Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 295(1–2), 24–31.

Bawah, A. T., Seini, M. M., Abaka-Yawason, A., Alidu, H., & Nanga, S. (2019). Leptin, resistin and visfatin as useful predictors of gestational diabetes mellitus. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 221-228.

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–R51.

Benasach, F. G. (2012). *Diabetes gestacional: Análisis de la influencia de parámetros clínicos y ecográficos en los resultados perinatales (tesis doctoral)*. Universidad Autónoma de Madrid (España).

Bougherara, L., Hanssens, S., Subtil, D., Vambergue, A., & Deruelle, P. (2018). Diabetes gestacional. *EMC - Ginecología-Obstetricia*, 54(1), 1–11.

Carter, J. V., Pan, J., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2016). ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. *Surgery*, 159(6), 1638–1645.

Cerda, J., & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 138–141.

Chen, P., Wang, S., Ji, J., Ge, A., Chen, C., Zhu, Y., Xie, N., & Wang, Y. (2015). Risk Factors and Management of Gestational Diabetes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71(2), 689–694.

Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D., & Brunetti, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(9), 899–909.

Coakley, J. C. (2018). Lipids in Children and Links to Adult Vascular Disease. *The Clinical Biochemist Reviews*, 39(3), 65-76.

Corcoran, S. M., Achamallah, N., Loughlin, J. O., Stafford, P., Dicker, P., Malone, F. D., & Breathnach, F. (2018). First trimester serum biomarkers to predict gestational diabetes in a high-risk cohort: Striving for clinically useful thresholds. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 222(8), 7–

12.

Coustan, D. R. (2013). Gestational diabetes mellitus. *Clinical Chemistry*, 59(9), 1310–1321.

Cuevas M., A., & Alonso K, R. (2016). DISLIPIDEMIA DIABÉTICA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(2), 152–159.

Cunningham, F., Leveno, K., Bloom, S., Casey, B., Dashe, J., Spong, C., Hoffman, B. (2018). *Williams Obstetrics*. Mc Graw Hill Education. 25th Edition.

Denney, J. M., & Quinn, K. H. (2018). Gestational Diabetes. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 45(2), 299–314.

Dereke, J., Nilsson, C., Strevens, H., Landin-Olsson, M., & Hillman, M. (2020). Pregnancy-associated plasma protein-A2 levels are increased in early-pregnancy gestational diabetes: A novel biomarker for early risk estimation. *Diabetic Medicine*, 37(1), 131–137.

Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 03/11/2016. Recuperado de <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/320GER.pdf>

Donovan, B. M., Nidey, N. L., Jasper, E. A., Robinson, J. G., Bao, W., Saftlas, A. F., & Ryckman, K. K. (2018). First trimester prenatal screening biomarkers and gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 13(7), e0201319-e0201336.

Du, M., Wang, B., Liang, Z., Dong, M., & Chen, D. (2015). The Relationship between Retinol-Binding Protein 4 Concentrations and Gestational Diabetes Mellitus in Chinese Women. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 81(2), 174-180.

Farahvar, S., Walfisch, A., & Sheiner, E. (2019). Gestational diabetes risk factors and long-term consequences for both mother and offspring: A literature review. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 14(1), 63–74.

Farina, A., Eklund, E., Bernabini, D., Paladino, M., Righetti, F., Monti, G., & Lambert-Messerlian, G. (2017). A First-Trimester Biomarker Panel for Predicting the Development of Gestational Diabetes. *Reproductive Sciences*, 24(6), 954–959.

Fasshauer, M., Blüher, M., & Stumvoll, M. (2014). Adipokines in gestational diabetes. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2(6), 488–499.

Federación Internacional de Diabetes. *Atlas de la Diabetes de la FID, 9ª edición*. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes, 2019. <https://www.diabetesatlas.org>

Frías-Ordoñez, J. S., Perez-Gualdrón, C. E., & Saavedra-Ortega, D. R. (2016). Diabetes mellitus gestacional: una aproximación a los conceptos actuales sobre estrategias diagnósticas. *Revista de La Facultad de Medicina*, 64(4), 769-775.

Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Miura, T. (2014). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 8(S3), 23-33.

Graham, T., & Kahn, B. (2007). Tissue-specific Alterations of Glucose Transport and Molecular Mechanisms of Intertissue Communication in Obesity and Type 2 Diabetes. *Hormone and Metabolic Research*, 39(10), 717-721.

Haywood, N. J., Slater, T. A., Matthews, C. J., & Wheatcroft, S. B. (2019). The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes. *Molecular Metabolism*, 19(9), 86–96.

Herrera, E., & Desoye, G. (2016). Maternal and fetal lipid metabolism under normal and gestational diabetic conditions. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 26(2), 109-127.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 8th ed*. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. <http://www.diabetesatlas.org>

Jin, C., Lin, L., Han, N., Zhao, Z., Liu, Z., Luo, S., Xu, X., Liu, J., & Wang, H. (2020). Plasma retinol-binding protein 4 in the first and second trimester and risk of gestational diabetes mellitus in Chinese women: A nested case-control study. *Nutrition & Metabolism*, 17(1), 1-7.

Johns, E. C., Denison, F. C., Norman, J. E., & Reynolds, R. M. (2018). Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(11), 743–754.

Kahn, S. (2002). Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *Journal of Endocrinology*, 175(1), 113-120.

Kahveci, B., Melekoglu, R., Evruke, I. C., & Cetin, C. (2018). The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1), 1–7.

Kaňová, N., & Bičíková, M. (2011). Hyperandrogenic States in Pregnancy. *Physiological Research*, 60(1), 243–252.

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.

Maiz, N., & Plasencia, W. (2014). Cribado precoz de diabetes gestacional y macrosomía. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 57(10), 472–480.

Mandrekar, J. N. (2010). Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(9), 1315–1316.

Martin, K. E., Grivell, R. M., Yelland, L. N., & Dodd, J. M. (2015). The influence of maternal BMI and gestational diabetes on pregnancy outcome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 108(3), 508–513.

McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 47-

66.

Monget, P., & Oxvig, C. (2016). PAPP-A and the IGF system. *Annales d'Endocrinologie*, 77(2), 90-96.

Moosazadeh, M., Asemi, Z., Lankarani, K. B., Tabrizi, R., Maharlouei, N., Naghibzadeh-Tahami, A., Yousefzadeh, G., Sadeghi, R., Khatibi, S. R., Afshari, M., Khodadost, M., & Akbari, M. (2017). Family history of diabetes and the risk of gestational diabetes mellitus in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 11, S99–S104.

Nava D, P., Garduño A, A., Pestaña M, S., Santamaría F, M., Vázquez DA, G., Camacho B, R., & Herrera V, J. (2011). Obesidad pregestacional y riesgo de intolerancia a la glucosa en el embarazo y diabetes gestacional. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 76(1), 10-14.

Ning, H., Tao, H., Weng, Z., & Zhao, X. (2016). Plasma fatty acid-binding protein 4 (FABP4) as a novel biomarker to predict gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 53(6), 891–898.

Overgaard, M. T., Boldt, H. B., Laursen, L. S., Sottrup-Jensen, L., Conover, C. A., & Oxvig, C. (2001). Pregnancy-associated Plasma Protein-A2 (PAPP-A2), a Novel Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5 Proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21849-21853.

Phillips, M. C. (2014). Apolipoprotein e isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*, 66(9), 616–623.

Piper, L. K., Stewart, Z., & Murphy, H. R. (2017). Gestational diabetes. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 27(6), 171–176.

Plows, J., Stanley, J., Baker, P., Reynolds, C., & Vickers, M. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular*

Sciences, 19(11), 3342-3363.

Powe, C. E. (2017). Early Pregnancy Biochemical Predictors of Gestational Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*, 17(2), 12-22.

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-015-SSA2-2018, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus; DOF: 03/05/2018. Recuperado de http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5521405&fecha=03/05/2018

Qazi, Dr. A., Fahim, Dr. A., Qureshi, Dr. A., & ul-Haque, Dr. M. (2016). GESTATIONAL DIABETES MELLITUS; STILL A GREAT PROBLEM. *The Professional Medical Journal*, 23(01), 15–19.

Rallapalli, P. M., Orengo, C. A., Studer, R. A., & Perkins, S. J. (2014). Positive Selection during the Evolution of the Blood Coagulation Factors in the Context of Their Disease-Causing Mutations. *Molecular Biology and Evolution*, 31(11), 3040-3056.

Raybiotech, Inc. (2014) RayBio G-Series Human Obesity Antibody Array 1. Recuperado de <https://www.raybiotech.com/files/manual/Antibody-Array/AAH-ADI-G1.pdf>

Raybiotech, Inc. (2016) RayBio Custom ELISA kit. Recuperado de <https://www.raybiotech.com/files/manual/ELISA/EL-PRELIM.pdf>

RayBiotech, Inc. (2018) RayBio Custom G-Series Antibody Array. Manual del fabricante.

Ríos-Martínez, W., García-Salazar, A. M., Ruano-Herrera, L., Espinosa-Velasco, M. D. J., Zárate, A., & Hernández-Valencia, M. (2013). Complicaciones obstétricas de la diabetes gestacional: Criterios de la IADPSG y HAPO. *Perinatología y Reproducción Humana*, 28(1), 27–32.

Rodrigo, N., & Glastras, S. (2018). The Emerging Role of Biomarkers in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, 7(6), 120-136.

Rojas-Rodriguez, R., Lifshitz, L. M., Bellve, K. D., Min, S. Y., Pires, J., Leung, K., Boeras, C., Sert, A., Draper, J. T., Corvera, S., & Moore Simas, T. A. (2015). Human adipose tissue expansion in pregnancy is impaired in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*, 58(9), 2106–2114.

Ryckman, K., Spracklen, C., Smith, C., Robinson, J., & Saftlas, A. (2015). Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*, 122(5), 643–651.

Sert, U. Y., & Ozgu-Erdinc, A. S. (2020). Gestational Diabetes Mellitus Screening and Diagnosis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY.

Sibai, B. M. (2015). Preeclampsia. *Protocols for High-Risk Pregnancies: An Evidence-Based Approach: Sixth Edition*, 9(2), 329–339.

Siddiqui, K., & George, T. P. (2017). Resistin role in development of gestational diabetes mellitus. *Biomarkers in Medicine*, 11(7), 579-586.

Simó, R., Sáez-López, C., Barbosa-Desongles, A., Hernández, C., & Selva, D. M. (2015). Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(7), 376–383.

Tawfeek, M. A., Alfadhli, E. M., Alayoubi, A. M., El-Beshbishy, H. A., & Habib, F. A. (2017). Sex hormone binding globulin as a valuable biochemical marker in predicting gestational diabetes mellitus. *BMC Women's Health*, 17(1), 3–7.

Toulis, K. A., Goulis, D. G., Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Tarlatzis, B. C., & Papadimas, I. (2009). Risk of gestational diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 92(2), 667-677.

Trojnar, M., Patro-Małysza, J., Kimber-Trojnar, Ż., Leszczyńska-Gorzela, B., & Mosiewicz, J. (2019). Associations between Fatty Acid-Binding Protein 4–A

Proinflammatory Adipokine and Insulin Resistance, Gestational and Type 2 Diabetes Mellitus. *Cells*, 8(3), 227-242.

Tu, W.-J., Guo, M., Shi, X.-D., Cai, Y., Liu, Q., & Fu, C.-W. (2017). First-Trimester Serum Fatty Acid-Binding Protein 4 and Subsequent Gestational Diabetes Mellitus: *Obstetrics & Gynecology*, 130(5), 1011–1016.

Vergès, B. (2015). Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: Where are we? *Diabetologia*, 58(5), 886–899.

Vitoratos, N., Deliveliotou, A., Dimitrakaki, A., Hassiakos, D., Panoulis, C., Deligeoroglou, E., & Creatsas, G. K. (2011). Maternal serum resistin concentrations in gestational diabetes mellitus and normal pregnancies: Resistin levels and gestational diabetes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 37(2), 112-118.

Wada, T., Hori, S., Sugiyama, M., Fujisawa, E., Nakano, T., Tsuneki, H., Nagira, K., Saito, S., & Sasaoka, T. (2010). Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(4), E881–E888.

Wallace, I. R., McKinley, M. C., Bell, P. M., & Hunter, S. J. (2013). Sex hormone binding globulin and insulin resistance. *Clinical Endocrinology*, 78(3), 321–329.

Wang, J., Li, Z., & Lin, L. (2019). Maternal lipid profiles in women with and without gestational diabetes mellitus: *Medicine*, 98(16), e15320-e15325.

Weissgerber, T. L., & Mudd, L. M. (2015). Preeclampsia and Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 15(3), 579-595.

Xargay-Torrent, S., Carreras-Badosa, G., Borrat-Padrosa, S., Prats-Puig, A., Soriano, P., Álvarez-Castaño, E., Ferri, M. J., De Zegher, F., Ibáñez, L., López-Bermejo, A., & Bassols, J. (2018). Circulating sex hormone binding globulin: An integrating biomarker for an adverse cardio-metabolic profile in obese pregnant women. *PLOS ONE*, 13(10), e0205592-e0205604.

Zhang, T., Du, T., Li, W., Yang, S., & Liang, W. (2018). Sex hormone-binding globulin levels during the first trimester may predict gestational diabetes mellitus development. *Biomarkers in Medicine*, 12(3), 239–244.

Zhang, Y., Zhang, H., Lu, J., zheng, S., Long, T., Li, Y., Wu, W., & Wang, F. (2016). Changes in serum adipocyte fatty acid-binding protein in women with gestational diabetes mellitus and normal pregnant women during mid- and late pregnancy. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(5), 797–804.

Zhao, D., Shen, L., Wei, Y., Xie, J., Chen, S., Liang, Y., Chen, Y., & Wu, H. (2017). Identification of candidate biomarkers for the prediction of gestational diabetes mellitus in the early stages of pregnancy using iTRAQ quantitative proteomics. *Proteomics - Clinical Applications*, 11(7–8), 1600152–1600164.

Zonana-Nacach, A., Baldenebro-Preciado, R., & Ruiz-Dorado, M. A. (2010). Efecto de la ganancia de peso gestacional en la madre y el neonato. *Salud Pública de México*, 52(3), 220-225.

Anexo A. Carta de aprobación del Comité de Bioética



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.U., Querétaro, 23 de Agosto de 2018
No. de oficio. CBQ18/087

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Facultad de Química
Presente

Nos permitimos hacer de su conocimiento que, en reunión del Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, con objeto de llevar a cabo la revisión de propuesta de investigación, el protocolo titulado "Identificación de un panel de biomarcadores para el diagnóstico temprano y la progresión de la diabetes gestacional" del cual usted es responsable fue evaluado, con la resolución de: **aprobado** con base en la resolución de la evaluación del proyecto, aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Química CBQ17/095.

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

Dra. Laura Cristina Berumen
Presidente

Dra. Minerva Ramos Gómez
Secretaría

Ccp archivo



C. U. Cerro de las Campanas S/N Santiago de Querétaro, Qro., México. A.P. 184 C.P. 76010
Tels. 01 (442) 192 13 04 y 192 13 07

Anexo B. Carta de consentimiento informado para participar en 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 ésta 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 bebé 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 relativamente alarmante.

La Q.F.B. Samantha Arias Covarrubias 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 múltiples biomarcadores de 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 académicos 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 médico 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 ó 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 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 de 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 de 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: _____

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Anexo C. Datos clínicos y personales

Nombre: _____

Edad: _____ Semanas de gestación: _____

Teléfono: _____

Antecedentes

familiares de diabetes: Sí _____ No _____

DMG en previo embarazo:	Sí _____	No _____
-------------------------	----------	----------

No. de embarazos:

Abortos:	
----------	--

Césareas:

Presión:	Normal ___ Baja ___ Alta ___
----------	------------------------------

Peso actual: _____ Kg

Talla:	_____ m
--------	---------

Peso pregestacional _____ Kg

IMC actual:	_____ Kg/m ²
-------------	-------------------------

IMC pregestacional _____ Kg/m²

Anexo D. Códigos R para PCA y Biplot del PCA

```
setwd("/users/samantha_arias/Desktop/PCA/")

library("factoextra")

library("missForest")

library("FactoMineR")

library("Hmisc")

library("vcd")

library("gridGraphics")

library("gridExtra")

library("cowplot")

data<-read.csv("Proteinas1ertrim.csv", header=TRUE, sep=",", row.names="ID",
na.strings=" ")

data

##Normalizacion de los datos

#Normalización raíz cuadrada

data_normp<-(sqrt(data[,2:10]))

#Normalización

data_norm<-((data[,2:10]))

#Normalización logaritmo

data_normpp<-(log(data[,2:10]))#logaritmo
```

```
##Extraer la informacion de los grupos para diferenciarlos en el grafico
```

```
#PCA con datos normalizados
```

```
pcaall.comp<-prcomp(data_normp)
```

```
pcaall.comp<-prcomp(data_normp[,2:10])
```

```
pcaall.comp
```

```
summary(pcaall.comp)
```

```
#PCA sin normalizacion de los datos
```

```
pcaall.comp<-prcomp(data)
```

```
pcaall.comp<-prcomp(data[,2:10])
```

```
pcaall.comp
```

```
summary(pcaall.comp)
```

```
#Gráficos de PCA
```

```
a<-fviz_pca_ind(pcaall.comp,
```

```
  col.ind = groups, # color by groups
```

```
  palette = "grey",
```

```
  addEllipses = TRUE, # Concentration ellipses
```

```
  ellipse.type = "confidence", ellipse.level=0.95,
```

```
  legend.title = "Groups",
```

```
  repel = TRUE,
```

```
        ggtheme= theme_minimal()
    )
    b<-fviz_pca_biplot(pcaall.comp, axes=c(1,2), repel = TRUE,
        #habillage= groups,

        palette = "grey",

        col.var = "black", # Variables color

        col.ind = "grey", # Individuals color

        #addEllipses=TRUE, # ellipse.level=0.75,

        ggtheme = theme_minimal()
    )
    groups <- as.factor(data$Diagnostico)
```