



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

“Cambios en la expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* relacionados con la falla de la célula beta en pacientes mexicanas con DMG en comparación con pacientes embarazadas sin DMG”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

presenta:

Arturo González Santana

Comité de Tutores:

Director: Dr. Hugo Mendieta Zerón

Co-director: Dr. Joel Alberto Vargas Hernández

Asesor: M en C. Deisy Julieth Abril Riaño

Toluca, Estado de México

2020

Aviso de autoría

Yo, **Arturo González Santana**, autor responsable de la presente **Tesis**, la cual lleva como título “Cambios en la expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* relacionados con la falla de la célula beta en pacientes mexicanas con DMG en comparación con pacientes embarazadas sin DMG”, y en representación de los coautores:

- a) **Dr. Hugo Mendieta Zerón**,
- b) **Dr. Joel Alberto Vargas Hernández**, y
- c) **M. en C. Deisy Julieth Abril Riaño**

declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante, y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

Contenido

Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	5
Resumen	6
1. Antecedentes	8
1.1. La diabetes <i>mellitus</i> gestacional y la diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 comparten parte de su fisiopatología.....	8
1.2 Diabetes <i>mellitus</i> gestacional.....	10
1.3. Comorbilidades asociadas con DMG y las complicaciones en el neonato.....	11
1.4 Función del gen <i>GCK</i> y sus implicaciones en la DMG	13
1.5. Implicación del gen <i>PDX-1</i> en la falla de la célula beta	14
1.6. Implicación del gen <i>NGN-3</i> en la falla de la célula beta	15
1.7. Prevalencia de DMG y mortalidad materna a nivel global y en México.....	16
2. Planteamiento del problema	18
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	19
5. Justificación.....	20
6. Material y métodos	21
6.1. Diseño de estudio.....	21
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	21
6.3. Procedimientos	22
6.3.1. Exploración física.....	22
6.3.2. Laboratorio.....	22
6.3.3 Extracción de ARN	22
6.3.4. Verificación del rendimiento y calidad del ARN	23
6.3.5. Expresión de los genes <i>PDX-1</i> y <i>NGN-3</i>	23
6.3.6. Verificación de presencia de <i>NGN-3</i> en sangre periférica con PCR de punto final.....	24
6.3.7. <i>NGN-3</i> recombinante: purificación de banda, ligación en pJET 1.2 y transformación en <i>E. Coli</i> TOP10.....	31
6.4. Variables del estudio	35

6.5. Implicaciones bioéticas	39
6.6. Recolección de datos	39
6.7. Análisis estadístico	40
7. Bibliografía.	41
8. Anexos	45
8.1. Carta de envío del artículo	45
8.2. Resumen del artículo	46

Índice de figuras.

Figura 1. Análisis de especificidad de los primers.....	26
Figura 2. Vector pET 303 con NGN-3.....	28
Figura 3. Estandarización de temperaturas de PCR para NGN-3.....	29
Figura 4. Confirmación de NGN-3 con PCR.....	30
Figura 5. Vector pJET 1.2 con NGN-3.....	33
Figura 6. Confirmación de ligación NGN-3 en pJET 1.2.....	34

Índice de tablas.

Tabla 1. Primers para qRT-PCR.....	24
Tabla 2. Análisis de primers PDX-1.....	27
Tabla 3. Análisis de primers NGN-3.....	27

Resumen

La diabetes *mellitus* gestacional (DMG) es una patología caracterizada por el incremento en las concentraciones séricas de glucosa durante el embarazo. La DMG y la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) comparten parte de su fisiopatología y se han identificado factores de riesgo genéticos compartidos, como la expresión alterada de los genes *PDX-1* y *NGN-3*, que se encuentran implicados en la falla de la célula beta del páncreas asociada a un estado de insulinoresistencia, alteraciones en morfogénesis pancreática y deficiencias en la producción de insulina y en el control de la glicemia en estados de glucotoxicidad y lipotoxicidad. En México no se conocen las cifras exactas de la prevalencia de DMG, sin embargo, se ha identificado como causa indirecta de muerte materna, la cual tiene una distribución heterogénea en la República Mexicana y en ciertas regiones existe una alta tasa de mortalidad materna. A nivel mundial, la prevalencia de DMG está distribuida de forma variable entre las diferentes etnias por condiciones genéticas y epigenéticas. El presente estudio utilizó métodos moleculares para extraer ARN de muestras sanguíneas y amplificarlo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con enzima de retrotranscripción (RT-PCR) para obtener ADN complementario (cADN) que en conjunto con la técnica de *Western Blot* permitió el análisis de cuantificación de expresión de los genes de interés, en pacientes mexicanas que cursaron con DMG durante su embarazo. Se compararon los resultados con los de pacientes que cursaron un embarazo sin DMG, en el Hospital Materno Perinatal “Mónica Pretelini Sáenz” (HMPMPS) en Toluca, México. Se obtuvieron datos de 38 pacientes, de los cuales 22 pertenecían al grupo control y 16 al grupo experimental, la edad media fue de 29.00 ± 7.74 años. Usando el método $\Delta\Delta Ct$, el cambio de expresión para *PDX-1* fue de 0.458 y para *NGN-3* fue de 0.361. En el análisis de correlación hubo una correlación estadísticamente significativa entre los valores de expresión de ambos genes en ambos grupos. La regresión múltiple fue significativa tanto para la expresión de genes como para los niveles de glucosa en caso de tener un peso normal. Conclusión: la baja expresión sérica de *PDX-1* y *NGN-3* podrían ser predictores de niveles más altos de glucosa

Summary

Gestational diabetes *mellitus* (DMG) is a condition characterized by the increment of glucose concentrations in blood during pregnancy. DMG and diabetes *mellitus* type 2 (DM2) share part of their physiopathology and some shared genetic factors have been identified, such as altered expression the *PDX-1* and *NGN-3* genes that are involved in the pancreatic beta cell failure associated with an insulin resistant state, morphologic alterations in the pancreas and deficiencies with the insulin production and glucose management in glucotoxicity and lipotoxicity statuses. In Mexico the DMG prevalence rates are unknown, however DMG has been identified as a secondary cause of maternal mortality, which has a heterogeneous distribution in the Mexican Republic and in certain regions there are high maternal mortality rates. On a global scale, DMG prevalence is heterogeneously distributed and it varies among the different ethnic groups due to genetic and epigenetic factors. This study utilized molecular methods to extract RNA from blood samples and amplifying them with the polymerase chain reaction with a retrotranscriptase enzyme to obtain complementary DNA (cDNA) and along with the Western Blot technique, analyzed the expression of the genes of interest in patients with DMG during their pregnancy, as well as to compare the results with those of patients with a normal pregnancy, in the Maternal and Perinatal Hospital “Mónica Pretelini Saénz” (HMPMPS) in Toluca, Mexico. Data was obtained from 38 patients of which 22 belonged to the control group and 16 to the experimental group, the mean age was of 29.00 ± 7.74 years. Using the $\Delta\Delta C_t$ method the expression fold change for *PDX-1* was 0.458 and for *NGN-3* it was 0.361. In the correlation analysis there was a statistically significant correlation between the expression values of both genes in both groups. The multiple regression was significant for both genes expression and glucose levels in case of having normal weight. Conclusion: *PDX-1* and *NGN-3* low serum expression could be predictors of higher glucose levels.

1. Antecedentes

1.1. La diabetes *mellitus* gestacional y la diabetes *mellitus* tipo 2 comparten parte de su fisiopatología.

El monómero de insulina está conformado por una cadena de 21 aminoácidos (AA) denominada cadena "A" y otra cadena de 30 AA llamada cadena "B" unidas por puentes disulfuro, que conforman su estructura terciaria; inicialmente se sintetiza como una molécula de 110 AA conocida como preproinsulina, la cual contiene un péptido de señal que es cortado generando la proinsulina. También contiene otro fragmento conocido como péptido C, que se separa durante su maduración y finalmente se almacena como insulina en las células beta del páncreas en forma de hexámeros cristalinos. Para su secreción en estados fisiológicos normales, se requieren cambios en la concentración de glucosa plasmática y de otros nutrientes que a su vez son regulados por otros factores como hormonas y citocinas ⁽¹⁾.

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) es el resultado de la insulinoresistencia crónica que genera disminución de la cantidad de células beta por apoptosis y en el espacio que queda libre se deposita péptido amiloide en forma de placas, que reducen gradualmente la función secretora del páncreas, generando la inhabilidad de compensar la disminución de la sensibilidad a la insulina ⁽¹⁾. En mujeres embarazadas con obesidad se ha observado que la concentración de insulina se duplica y se asocia con el incremento al cuádruple del índice de insulinoresistencia medido por el índice HOMA-IR ⁽²⁾.

Entre los mecanismos que causan la insulinoresistencia, se ha identificado la glucotoxicidad por concentraciones supra fisiológicas de glucosa que genera la regulación a la baja de GLUT4 en células insulino dependientes; también se elevan las concentraciones de calcio en citosol, lo cual induce la destrucción de las células beta ⁽¹⁾. El mecanismo de la glucotoxicidad está mediado por el estrés oxidativo y diversas rutas de señalización, entre las que destacan la ruta del poliol, la ruta de las hexosaminas, dihidroxiacetona-P, la activación de PKC con dihidroxiacetona, la

formación de productos avanzados de la glicación a partir de metilgloxal y la ruta de formación del enediol; estas rutas se encuentran inactivas en estados de euglicemia y se pueden activar en situaciones con concentraciones de glucosa supra fisiológicas, generando diversas modificaciones dañinas a nivel de macromoléculas implicadas en la diabetes ⁽³⁾.

Otro mecanismo asociado a la insulinoresistencia es la lipotoxicidad que genera una amplia variedad de procesos dañinos para las células beta, como la formación de ceramidas que se introducen en tejidos no adiposos, estrés oxidativo y respuestas inflamatorias ⁽¹⁾. Las ceramidas, son intermediarios clave en la relación entre los nutrimentos y las citocinas proinflamatorias, con la regulación de la función de las células y su apoptosis. En literatura previa se ha reportado que pueden dañar al corazón, al páncreas y a la vasculatura, presentándose en enfermedades asociadas a obesidad; aunque no todos los individuos con obesidad presentan insulinoresistencia, ni todos los sujetos con insulinoresistencia padecen obesidad. Es por ello que se continúan haciendo estudios sobre estos mecanismos, con el fin de poder determinar si el incremento de tejido adiposo es la causa directa de la insulinoresistencia o señala estímulos paralelos que llevan a esta condición ⁽⁴⁾.

En México existe una gran variedad de polimorfismos asociados a DMG, DM2, obesidad y dislipidemia; para DMG se han identificado y analizado 15 polimorfismos de un nucleótido (SNP) y 94 fueron asociados con DM2 en procesos como insulinoresistencia, hiperglicemia, concentraciones elevadas de leptina y disminuidas de adiponectina. Entre los polimorfismos más estudiados se encontraron TCF7L2 (factor de transcripción 7-tipo 2) y KCNQ1 (canal de potasio dependiente de voltaje, miembro 1), que se han identificado previamente como polimorfismos comunes en pacientes mexicanos con diabetes y se detectaron diferencias significativas en la expresión de KCNQ1, que se relacionó de mayor forma con DMG ⁽⁵⁾.

1.2 Diabetes *mellitus* gestacional

La diabetes *mellitus* gestacional (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se desarrolla durante el embarazo ⁽⁶⁾ y la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (*IADPSG*, por sus siglas en inglés) indica que su diagnóstico se hace mediante una prueba de tolerancia con 75 g de glucosa oral en ayuno, lo cual fue reconocido por la Organización Mundial de la Salud (*WHO* por sus siglas en inglés) ⁽⁷⁾.

El embarazo se ha considerado como un estado diabetogénico que cursa con factores asociados a la insulinoresistencia como lo es el aumento del tejido adiposo y se ha reportado que el sobrepeso aumenta el riesgo de DMG 3.7 veces y la obesidad lo aumenta 8.8 veces en mujeres mexicanas ⁽⁸⁾. En el embarazo existe redistribución de las diversas reservas energéticas como el glucógeno y el tejido adiposo; se ha reportado que la distribución adiposa visceral predispone a tener una curva de tolerancia a la glucosa positiva a la semana 24-28 de gestación y la movilización de glucógeno fuera del hígado activa las vías anabólicas para la síntesis de glucosa que, en conjunto con la resistencia a la insulina, favorecen el aumento en las concentraciones de glucosa sérica. También se reporta que el índice de masa corporal (IMC) pregestacional tiene una asociación mayor con el desarrollo de DMG que la ganancia de peso durante el embarazo ⁽⁹⁾.

El embarazo también se ha identificado como un estado que cursa con resistencia a la leptina, la cual es secretada por el tejido adiposo y se ha comprobado que tiene funciones reguladoras de insulina *in vitro*. Sin embargo, otros hallazgos en pacientes de Cleveland en 2010 ⁽¹⁰⁾, sugieren que la placenta también secreta cantidades considerables de leptina pero su concentración disminuye de forma abrupta post-parto. Las concentraciones de leptina durante el embarazo posiblemente ocurren antes del aumento de peso durante el mismo, por lo que los cambios en la concentración de leptina pueden ser indicadores de DMG independientes del IMC.

Otra característica del embarazo es la presencia de un patrón de inflamación alterado, en la fase de implantación se promueve una respuesta pro-inflamatoria en

el útero, mientras que en la fase de post-implantación hay una respuesta “inmunosupresora”, que se cree es necesaria para evitar el rechazo del feto. Como se reportó anteriormente, la placenta también está implicada en procesos inflamatorios mediante la producción de ciertas citocinas y se ha observado que las pacientes con obesidad y DMG pudieran tener mayor tendencia a los perfiles inflamatorios mencionados, en comparación con mujeres que cursan el embarazo con obesidad y sin DMG ⁽¹⁾.

El incremento en la concentración sérica de interleucina 6 (IL-6), proteína C reactiva (*CRP* por sus siglas en inglés) y leptina se ha observado en mujeres con obesidad; también se detectaron cambios en las concentraciones de macrófagos en tejido placentario asociados con posibles procesos inflamatorios implicados en la obesidad, como la infiltración de dichas células al tejido adiposo y la producción de sus quimiocinas. El embarazo es un estado que tiende a la inflamación en diferentes fases de forma natural y en conjunto con los cambios de los factores inflamatorios, la respuesta se exagera si se presenta obesidad previa al embarazo, ya que el cuerpo está en un estado inflamatorio pre-existente y el riesgo de presentar insulinoresistencia y otros trastornos metabólicos se ve incrementado ⁽²⁾.

1.3. Comorbilidades asociadas con DMG y las complicaciones en el neonato.

Como se ha descrito, el embarazo es un estado que cursa con diversos cambios en la fisiología materna y aunado a los cambios en el metabolismo de la glucosa, se encuentran los cambios en sistema cardiovascular, que incluyen el incremento de la frecuencia cardíaca, el volumen vascular y la permeabilidad vascular. Se han realizado estudios en mujeres de Brasil en los que se midieron los cambios cardiovasculares y se detectaron remodelaciones estructurales en los ventrículos cardíacos de mujeres que cursaron con DMG; dichos cambios generaron un perfil diastólico alterado que no produjo disfunción cardíaca pero se asimilaba con patrones de deficiencia sistólica ⁽⁶⁾. En el año 2006, se reportó que el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares durante el embarazo aumenta en mujeres

con antecedentes familiares de DM2 y las complicaciones se presentan en edades más tempranas; adicionalmente se encontró que dichas pacientes tenían tendencias a desarrollar las demás complicaciones que constituyen el síndrome metabólico, que se evidenciaron cuando los valores del perfil de lípidos (colesterol total, HDL y LDL) presentaron incremento significativo y la prevalencia de hipertensión incrementó significativamente en comparación con las pacientes que no tenían dichos antecedentes familiares ⁽¹²⁾.

Los efectos de la DMG no solo dañan a la madre, también se han identificado diversos efectos adversos en los neonatos de madres con DMG a través de los 5 elementos que evalúa la escala APGAR (ritmo cardíaco, reflejos, color, tono muscular y esfuerzo respiratorio) ⁽¹³⁾. En un estudio realizado en la ciudad de Brno, República Checa, se detectaron puntuaciones APGAR más bajas en los hijos de madres con DMG y comorbilidades asociadas; también se observaron anomalías en el cordón umbilical, partos más prematuros y de forma contrastante con otros estudios en los que comúnmente se encuentran neonatos macrosómicos, se registró menor peso al nacer ⁽¹⁴⁾.

En el año 2015 se reportaron los hallazgos acerca de los efectos de la DMG en el peso de los neonatos y se concluyó que existió tendencia hacia la obesidad neonatal y el riesgo de que desarrollaran diabetes posteriormente fue significativamente elevado; adicionalmente, se mencionaron las modificaciones epigenéticas que pueden generar patologías metabólicas, con mecanismos de metilación del gen de leptina y adiponectina, que fueron significativamente diferentes entre los hijos de madres que cursaron con DMG y los de madres con embarazos normales ⁽¹⁵⁾.

Los efectos de la DMG y su severidad dependen también del tratamiento que reciben las madres. En población latinoamericana, se analizaron los efectos de los diferentes tratamientos y se encontró que los hijos de pacientes tratadas con metformina tuvieron menor riesgo de tener baja longitud al nacer; el tratamiento con insulina disminuyó el riesgo de nacimiento prematuro y ambos tratamientos en conjunto adicionalmente, resultaron en más posibilidad de nacer con longitud grande ⁽¹⁶⁾.

1.4 Función del gen *GCK* y sus implicaciones en la DMG

El gen *GCK* se localiza en el cromosoma 7p13, cuenta con 15 exones y su transcrito principal es la enzima glucocinasa ⁽¹⁷⁾. La expresión de *GCK* se ha identificado en células pancreáticas beta y alfa, células hepáticas y algunas células neuronales, cumpliendo funciones reguladoras del metabolismo tanto en estados saludables como en los diabetogénicos. En las células pancreáticas la secreción de insulina está regulada por la cantidad de glucosa y la glucocinasa actúa como un sensor de glucosa que activa dos rutas; la primera es conocida como la vía de activación (*triggering pathway*) en la cual ocurren cambios de polaridad de la membrana con los canales de K^+ y Ca^+ de la célula beta, con el propósito de liberar insulina y aumentar la concentración de Ca^+ en el citosol; derivado del aumento de Ca^+ se puede amplificar la señal para activar una ruta secundaria conocida como la vía de amplificación (*amplification pathway*), con la cual se puede continuar regulando la secreción de insulina, independientemente de las funciones de los canales de K^+ ⁽¹⁸⁾.

Como se ha comentado, la glucocinasa tiene funciones reguladoras en células pancreáticas en estados diabetogénicos, sin embargo, su eficiencia metabólica se ve disminuida debido a que estas células tienden a presentar una relación mitocondria/citosol disminuida así como niveles bajos de ATP, que causan una regulación negativa de la enzima fosfofructocinasa, la cual consume con mayor velocidad a la glucosa-6-fosfato, disminuyendo su concentración y dificultando el proceso de despolarización que eventualmente causa una falla en la liberación de insulina. Mediante una simulación con un modelo matemático, se demostró que los islotes pancreáticos pierden sus capacidades secretoras de insulina cuando hay más del 20% de células dañadas y en el mismo estudio se observó que al incrementar las concentraciones de glucocinasa, los islotes dañados pueden recuperar su función hasta el punto de la normalidad, asumiendo que los modelos representan la realidad correctamente ⁽¹⁹⁾.

La diabetes causada por una mutación del gen *GCK* es conocida como diabetes MODY 2 (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) y puede ser catalogada como DMG

si se presenta durante el embarazo, sin embargo, su comportamiento y tratamiento es diferente al de los otros subtipos; un mal diagnóstico de este subtipo puede causar el tratamiento innecesario con insulina y los riesgos que conlleva. El diagnóstico molecular ayudaría a detectar casos de diabetes MODY 2 que fueron diagnosticados como DMG o que no fueron diagnosticados, aunque estos métodos suelen ser costosos y no sería viable realizarlos en toda la población. Para tener un acercamiento más simple se ha propuesto que se realicen las pruebas moleculares a pacientes con IMC normal y glucosa en ayuno > 5.5 mmol/L, con dichos criterios se reportó que es posible identificar a 30 de 44 pacientes que presentan el subtipo MODY 2 ^(20,21).

1.5. Implicación del gen *PDX-1* en la falla de la célula beta

El gen *PDX-1* localizado en el cromosoma 13q12.2, es parte del dominio *homeobox* involucrado en la morfogénesis del páncreas y otros órganos; expresa la *pancreatic/duodenal homeobox protein 1*, también conocida como factor 1 promotor de insulina, que actúa como factor de transcripción, regulando la transcripción del gen de la insulina (*INS*), de la somatostatina (*SST*), de la glucocinasa (*GCK*), *GLUT 2* y del péptido amiloideo ⁽²²⁾.

Los factores de transcripción son esenciales para regular la expresión genética e incluso pueden cambiar o trans-diferenciar el destino de las células somáticas mediante un proceso conocido como reprogramación celular; existe la posibilidad de reprogramar otro tipo de células para que se diferencien en células beta productoras de insulina mediante la interacción de *PDX-1* con *NGN-3* y el factor de transcripción *MAFA* ⁽²³⁾.

En modelos murinos modificados (doble *knock-in* homocigotos), se cuantificó la expresión de *PDX-1* y se demostró que al reducir su expresión, disminuyó el número de células beta y la arquitectura de los islotes sufrió modificaciones; así mismo, se identificó que los genes *FOXA 1* y *2* regularon la expresión de *PDX-1*, sugiriendo que en conjunto regulan la maduración, función e identidad de las células beta ⁽²⁴⁾.

El gen *PDX-1* también participa en la regulación de la glicemia como promotor de la transcripción de la insulina en respuesta a las altas concentraciones de glucosa. En ratones con diabetes tipo 2, se observó dicho efecto y su actividad aumentaba conforme aumentaron las concentraciones de glucosa; en el mismo estudio, se evaluó la capacidad de los genes *ISL 1* y *BETA 2* para promover la transcripción de *INS*, pero sólo el gen *PDX-1* logró generar cambios significativos. En cultivos celulares se observó que su acción no es tan fuerte en concentraciones normales de glucosa (5mmol/L) y su mayor efecto se presentó a concentraciones altas (25 mg/dl), sugiriendo al mecanismo de *PDX-1* como uno de los principales activadores del gen *INS* ⁽²⁵⁾.

1.6. Implicación del gen *NGN-3* en la falla de la célula beta

El gen *NGN-3* localizado en el cromosoma 10q22.1, se ha relacionado con la organogénesis del páncreas; durante el desarrollo del páncreas se requieren precursores endocrinos que participan en la diferenciación, migración y agrupamiento de los islotes pancreáticos ⁽²⁶⁾. En 2015 se reportó que el factor de transcripción neurogenina 3, codificado por el gen *NGN-3*, es necesario para el correcto desarrollo pancreático, así como su regeneración en modelos murinos. Dichos resultados se compararon con los obtenidos en tejido humano (páncreas) entre el día 76 y 110 de gestación, reportando que al menos un alelo está asociado con diarrea congénita por anendocrinosis entérica, además de estar implicado en los cambios de forma de las células beta y su migración hacia islotes pancreáticos nacientes; sin embargo, el grado en el que afecta a la morfogénesis del páncreas humano, es menor que en el caso de los roedores ⁽²⁷⁾.

En estudios recientes se observó que, tanto en humanos como en ratones, la expresión de *NGN-3* ocurre justo antes de la formación de células endocrinas y se reporta que es posible observar expresión de *NGN-3* en la etapa adulta como mecanismo de regeneración de células beta. En humanos este proceso no se ha observado, pero se describió que la dieta del ayuno intermitente (*FMD* por sus siglas

en inglés) induce la expresión de *NGN-3* en pacientes saludables y con diabetes *mellitus* tipo 1, incrementando la concentración de insulina en los islotes pancreáticos ⁽²⁸⁾.

Otro mecanismo de estimulación de *NGN-3* que se ha estudiado, es con la utilización de citocinas pro-inflamatorias (*TNF* alfa, Interleucina 1 beta e Interferón gama); los cambios de expresión se observaron mediante la reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (qPCR) y los niveles de proteína se corroboraron con inmunofluorescencia. Estas observaciones se relacionaron con la cascada de señalizaciones entre *NGN-3* y el gen *STAT3*, el cual suele ser activado por señales inflamatorias, por lo que se puede considerar que el *NGN-3* actúa en una red reguladora y se reporta que promueve la diferenciación de células ductales a células endocrinas *in vitro* en el caso de humanos e *in vivo* en roedores ⁽²⁹⁾.

1.7. Prevalencia de DMG y mortalidad materna a nivel global y en México

La prevalencia mundial de DMG es muy variable de acuerdo a la etnicidad y se ha identificado que la menor prevalencia (5.4%) se presenta en mujeres blancas, mientras que la mayor (11.9%) se presenta en mujeres asiáticas y de las islas del pacífico; en mujeres hispanas se estimó una prevalencia de 8.4% en el mismo estudio ⁽³⁰⁾. Estos datos son consistentes con lo reportado durante el periodo de enero del 2011 a septiembre del 2013, en el que múltiples estudios internacionales concluyen que la DMG es más frecuente en mujeres asiáticas y se presenta con menor frecuencia en mujeres blancas ⁽³¹⁾. Las cifras de prevalencia de DMG en México no se conocen con exactitud, pero el Instituto Nacional de Perinatología (INPER) reporta una prevalencia de 12.9% aproximadamente y esta podría ascender a 30% si se usaran los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Diabetes (*ADA* por sus siglas en inglés) ⁽³²⁾.

La DMG ha sido identificada como un factor de riesgo y una causa indirecta de mortalidad materna. Se ha observado un incremento notable en las muertes por causa indirecta en Latinoamérica de un 9.2% en 1990 a un 11.5% en 2013 y se

propuso que estas causas continuarían incrementando su distribución al ser enfermedades cada vez más comunes ⁽³³⁾.

En la cumbre del milenio celebrada en el año 2000 se propusieron ocho “Objetivos de desarrollo del milenio” (*MDG* por sus siglas en inglés), el quinto proponía reducir la mortalidad materna entre 1990 y 2015 en un 75%. Posteriormente se realizó un estudio en el año 2015, en donde se identificó que la tasa de muerte materna (RMM) a nivel global se redujo 43.9% de 1990 a 2015. Sin embargo, la disminución fue variable y en algunos países sólo se logró una reducción de 10% o menos y no se cumplió con lo propuesto por el *MDG* 5. Posteriormente se propusieron los objetivos de desarrollo sustentable, en los que se continua lo establecido por el *MDG* 5. pero se ajustó para que existan 70 muertes por cada 100,000 nacimientos y en ningún país se deberá registrar más del doble del RMM global de 140 muertes por cada 100,000 nacimientos ⁽³⁴⁾.

En México la RMM del periodo 2005 a 2014 fue de 41.4 muertes maternas por cada 100,000 nacimientos. Se identificó un alto grado de variabilidad entre las diferentes regiones del país, las cuales se categorizaron y se encontraron 11 con RMM clasificada como “alto” (82 a 121 muertes), 2 que se clasifican en “muy alto” (121 y 160 muertes) y la región con menor RMM (16 muertes) fue Nuevo León no metropolitano, que, al ser contrastado con las regiones más afectadas, muestra el alto grado de disparidad en la distribución de la muerte materna. También se identificaron dos regiones de especial interés, el Valle de México Oeste que forma parte de la Zona Metropolitana del Valle de México en su mayor parte y aun así presentó el decimotercer RMM más alto; en caso opuesto, la región conocida como Mixteca Baja fue una de las regiones con menor RMM, a pesar de que presenta índices de marginación considerables. Tras estos hallazgos se sugirió que se realicen más estudios sobre estas áreas para caracterizarlas epidemiológicamente y así poder identificar factores de riesgo y preventivos ⁽³⁵⁾.

2. Planteamiento del problema

La prevalencia global estimada de diabetes mellitus gestacional (DMG) varía entre los diferentes grupos étnicos; en un estudio realizado de 2007 a 2009 se reportó que a nivel mundial las mujeres blancas presentaron la menor prevalencia (5.4%) y la mayor (11.9%) se presentó entre mujeres asiáticas y de las Islas del Pacífico. En México se desconocen las cifras exactas de prevalencia de DMG, sin embargo, se sabe que la DMG complica cerca del 12.9% de los embarazos.

La DMG se caracteriza por la intolerancia a la glucosa diagnosticada por primera vez durante el embarazo, lo cual es considerado como un estado diabetogénico por sus cambios metabólicos propios; comenzar con sobrepeso u obesidad se ha relacionado con resistencia a la insulina, agotando la capacidad de las células beta para secretar la cantidad de insulina requerida por el embarazo.

En estudios previos se han identificado mecanismos moleculares implicados en la DMG; la glucotoxicidad causa defectos en la producción de insulina y se ha propuesto la posibilidad de que se debe a cambios en la expresión y actividad del gen *PDX-1*, que al disminuir se asocia con una disminución en la capacidad de las células pancreáticas para diferenciarse a células beta y puede causar agenesia pancreática durante el desarrollo embrionario. De forma independiente, el gen *NGN-3* también participa en la diferenciación celular del páncreas y se ha reportado que la baja expresión de su proteína puede estar implicada en la fisiopatogenia de la DM2.

Estos factores genéticos están implicados tanto en DMG como en DM2 y los avances recientes en la tecnología molecular han subrayado la importancia de estudiarlos mediante análisis por interactomas, para conocer su comportamiento y así favorecer el desarrollo de métodos de diagnóstico oportuno para evitar las complicaciones que causa la DMG en el embarazo y en el neonato.

Pregunta de investigación: ¿Cuál es la diferencia en los niveles de expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* relacionados con la falla de la célula beta en pacientes con DMG en comparación con pacientes sin DMG?

3. Hipótesis

H1: Los niveles de expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* son diferentes en el grupo de pacientes con DMG en comparación con el grupo control.

HØ: Los niveles de expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* no se ven alterados en el grupo de pacientes con DMG en comparación con el grupo control.

4. Objetivos

General:

Cuantificar los cambios de expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* que están implicados en la falla de la célula beta basado en el análisis de interactomas.

Específicos:

- Cuantificar la expresión genética mediante PCR en tiempo real.
- Verificar la expresión genética a nivel de proteínas con técnica de *Western Blot*.
- Asociar los valores de expresión de los genes de interés con los valores del perfil bioquímico y datos antropométricos de las pacientes.
- Relacionar los valores de expresión genética entre ambos genes para identificar su posible interacción.

5. Justificación

La DMG se asocia con diversas complicaciones metabólicas que ponen en riesgo la vida de la madre y el hijo, en la cumbre del milenio se propuso reducir la mortalidad materna global en 75%, sin embargo, esto no se logró y en varios países sólo se llegó a disminuir en 10% o menos. En México, la tasa de mortalidad materna por causas secundarias continúa siendo alta y su distribución en la república es muy heterogénea, por lo que se requiere actuar de manera específica en cada región para atender sus necesidades particulares.

Existen factores genéticos implicados en la falla de la célula beta que se pueden presentar tanto en DMG como en DM2, pero se desconoce en qué grado afectan a las mujeres mexicanas, debido a la gran variedad de genes implicados, así como los polimorfismos comunes de la población mexicana y las diferencias genéticas entre cada etnia, que se hacen notar al revisar los datos epidemiológicos de DMG a nivel mundial. Así mismo, resulta indispensable continuar con el estudio del perfil genético de la DMG, para poder describir los cambios en los mecanismos de los genes que presenten patrones de expresión alterados en estos estados patológicos.

Las técnicas de análisis genéticos y moleculares han avanzado de forma considerable. Actualmente se cuenta con múltiples herramientas que se han vuelto más accesibles a los investigadores mexicanos, lo que permite analizar los problemas de salud de una forma más detallada. Dichos recursos deberían ser aprovechados para proponer más proyectos que extiendan el alcance de lo que se logre en el presente estudio, con el fin de continuar beneficiando a los pacientes al atenderles con un mayor grado de conocimiento y potencialmente identificar un parámetro diagnóstico más certero.

6. Material y métodos

6.1. Diseño de estudio

Tipo de estudio: Clínico, observacional, transversal.

Universo: Mujeres embarazadas que acudieron a consulta obstétrica en el Hospital Materno Perinatal.

Tipo de muestreo: No probabilístico a conveniencia.

Tamaño de la muestra: Se integraron dos grupos de 30 pacientes en edades de 18 a 40 años: a) pacientes con gestación normoevolutiva e IMC pregestacional normal, b) pacientes con obesidad y diagnóstico de DMG.

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión: Mujeres que acudieron a consulta obstétrica en el Hospital Materno Perinatal “Mónica Pretelini Sáenz” (HMPMP).

Criterios de exclusión: Se excluyeron todos los casos que no contaron con los análisis de laboratorio completos y que cursaban con enfermedades autoinmunes, cardiopatías, nefropatía, hepatopatía, síndromes genéticos o algún efecto secundario de tratamientos farmacológicos previos.

Criterios de eliminación: muestras sanguíneas de las cuales no se pudo obtener material genético de la calidad requerida para los análisis subsecuentes.

6.3. Procedimientos

6.3.1. Exploración física

El peso corporal fue medido por el personal del HMPMPS con una báscula digital (Tanita®) con precisión de 0.1 kg, la estatura se midió con una precisión de 0.1 cm con un estadiómetro Holtain (Holtain Ltd., Crymych, Reino Unido).

6.3.2. Laboratorio

Las muestras de sangre de las pacientes se recolectaron en tubos Vacutainer® con EDTA K2, después de un periodo de ayuno de 8 a 12 horas. Los exámenes de laboratorio incluyeron: creatinina (mg/dL), urea (mg/dL), electrolitos (K y Na) en mmol/L, glucosa (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicéridos (mg/dL), albúmina (mg/dL) y transaminasas (ALT, AST) en UI/L, los cuales se hicieron de rutina en el Laboratorio Clínico del HMPMPS.

Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC). Para el diagnóstico de DMG se tomaron en cuenta los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA), con una carga oral de glucosa de 75 g con uno o más valores arriba de los siguientes rangos: 5.1 mmol/L (92 mg/dL) en ayuno, 10.0 mmol/L (180 mg/dL) a la hora 1 h, y 8.5 mmol/L (153 mg/dL) a las 2 h ⁽¹⁶⁾.

6.3.3 Extracción de ARN

A partir de una muestra de sangre se extrajo el material genético con el kit Norgen (número de catálogo 48400) con el método de separación por microcolumnas:

1.- De la muestra conservada a -20 °C se tomaron 100 µl y se colocaron en tubos de RNA, se agregaron 360 µl de buffer RLT para lograr la disrupción celular y se

colocó por 30 segundos en el vórtex hasta que las muestras se volvieron transparentes. Al producto lisado se le agregaron 200 µl de etanol al 96-100% y se colocaron en el vórtex por 10 segundos.

2.- Del lisado resultante se transfirieron 600 µl a las columnas y se centrifugaron por 1 minuto a 6,000 RPM descartando el sobrenadante, este paso se repitió en los casos que se observó poca transferencia de la columna al tubo de colección.

3.- Posteriormente se agregaron 400 µl de solución de lavado para la membrana de la columna y se centrifugó por 1 minuto a 6,000 RPM descartando nuevamente el sobrenadante. Se hizo un segundo lavado con 400 µl y se centrifugó de la misma forma, al descartar el sobrenadante se procedió a centrifugar el producto por 2 minutos a 6,000 RPM para eliminar posibles residuos de la solución.

4.- En la última etapa se pasó el contenido de la columna a un tubo de elusión y se agregaron 50 µl de solución de elusión, centrifugando el contenido por 2 minutos a 2,000 RPM y por 1 minuto a 14,000 RPM. El material resultante se etiquetó y conservó a -20 °C para los análisis subsecuentes.

6.3.4. Verificación del rendimiento y calidad del ARN

La concentración obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro (*NanoDrop ND-100*) en rangos de 260/280 (nm).

6.3.5. Expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3*

El nivel de expresión de los genes *PDX-1* y *NGN-3* se determinó con el método de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR) con el sistema de detección de ácidos nucleicos en tiempo real Prime Q de Techne y el kit *Master Mix Sybr green 2X* (Applied Biosystems); el proceso fue complementado con el software Quansoft para el diseño y programación del método

de amplificación. Los primers utilizados se solicitaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM, con las siguientes secuencias:

Tabla 1. Primers para qRT-PCR.

Gen	Forward	Reverse
GAPDH	5'CTTGGTATCGTGGAAGGACTC 3'	3'GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT 5'
PDX-1	5' GGATGAAGTCTACCAAAGCTCACGC 3'	3' CCAGATCTTGATGTGTCTCTCGGTC 5'
NGN-3	5' CAATCGAATGCACAACCTCA 3'	3' GGGAGACTGGGGAGTAGAGG 5'
Secuencias tomadas de : Bahrebar M, Soleimani M, Karimi MH, Vahdati A, Yaghobi R. Generation of Islet-like Cell Aggregates from Human Adipose Tissue-derived Stem Cells by Lentiviral Overexpression of PDX-1 (14).		

El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C para el proceso de extensión. El grado de expresión se obtuvo con el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ ocupando el gen GAPDH como referencia para la normalización.

6.3.6. Verificación de presencia de NGN-3 en sangre periférica con PCR de punto final.

En la Universidad el Bosque, Bogotá, se diseñaron primers para NGN-3 con la intención de verificar la presencia de NGN-3, así como su tamaño en un gel de agarosa, a partir de ADN obtenido de sangre periférica con el kit *Wizzard® Genomic DNA purification kit* siguiendo el protocolo para 300 µl:

- 1.- En un tubo de 1.5 ml se colocaron 900 µl de solución de lisis y se adicionaron 300 µl de sangre bien mezclada.
- 2.- Se realizó mezclado por inversión.

- 3.- Los tubos se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se mezclaron por inversión de 2 a 3 veces durante ese tiempo para completar la lisis de células rojas. Se centrifugaron a 16,000 x g por 1 minuto.
- 4.- El sobrenadante fue descartado sin tocar el pellet blanco que se observó. Quedando aproximadamente 10 a 20 µl residuales en el tubo.
- 5.- Las células blancas se resuspendieron con el vórtex de 10 a 15 segundos.
- 6.- Se adicionaron 300 µl de solución de lisis nuclear al tubo con células resuspendidas y se pipeteó la solución de 5 a 6 veces hasta ver que el lisado se volvió viscoso, si se observaban grumos se colocó la solución en baño María a 37 °C hasta que se disolvieron y si pasaba más de una hora se colocaron de 100 a 300 µl de solución de lisis nuclear
- 7.- (Opcional). El inserto sugiere agregar 1.5 µl de solución de RNasa al lisado y mezclar 2 a 5 veces. Incubar a 37 °C por 15 minutos y llevar a temperatura ambiente, para este proyecto no se contó con dicho reactivo
- 8.- Se colocó la solución de precipitación de proteínas (100 µl) al lisado y se usó el vórtex por 10 a 20 segundos.
- 9.- Se centrifugaron a 16,000 x g durante 3 minutos, posteriormente se observó un pellet de color café oscuro.
- 10.- El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 ml con isopropanol.
- 11.- El contenido se mezcló suavemente hasta observar los filamentos de ADN que se acumularon en una masa visible.
- 12.- Se centrifugó a 16,000 x g durante 1 minuto, el ADN se observó como un pellet blanco pequeño.
- 13.- El sobrenadante se descartó y se lavó con un volumen (300 µl) de etanol 70%, mezclando suavemente y repitiendo el paso 12 al finalizar.
- 14.- El etanol fue aspirado evitando tomar el pellet que solía ser muy móvil. Utilizando el concentrador *Vacofuge*[®], se secó el pellet por 10 – 15 minutos.

15.- Se agregaron 100 µl solución de rehidratación de ADN al tubo y se dejaron a temperatura ambiente (modificación del protocolo) por 1 hora aproximadamente.

16.- El ADN con una concentración de 112 ng/µl se almaceno a 2-8°C.

Para el diseño de primers se obtuvo la secuencia de mRNA y proteína, en la página ExPasy – Translate Tool se convirtió la secuencia de nucleótidos a proteínas para identificar la región que codifica la proteína; se eliminaron las regiones restantes, tomando sólo la codificante y se seleccionaron los extremos 5' para iniciar el primer directo y 3' para el reverso (Figura 1).

Adicionalmente se planteó la posibilidad de obtener la proteína NGN-3 recombinante, para utilizar como control en la identificación de la versión nativa en sangre periférica con Western Blot, por lo que se realizó el análisis de las enzimas de restricción contenidas en las secuencias de nucleótidos con la página NEBcutter y se seleccionó un vector que contuviera enzimas de restricción que permitieran el corte de los extremos sin dañar el resto del primer, concluyendo que pET 303 era una buena opción por contener a XbaI, y NsiI que cortan NGN-3 sin dañarlo. Se agregaron las secuencias de XbaI en el extremo 5' del primer directo y NsiI en el extremo 3' del primer reverso.

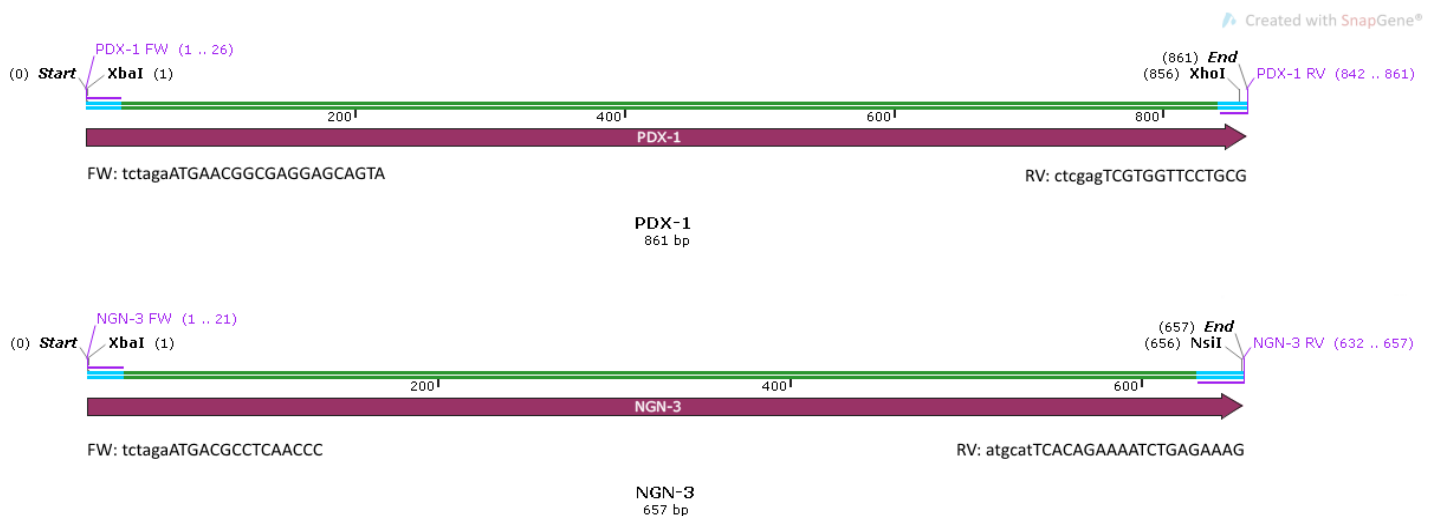


Figura 1. Análisis de especificidad de los primers.

Productos resultantes de la PCR *in silico* en donde se observa que los primers son específicos para las secuencias deseadas de ARN mensajero y contienen las secuencias de las enzimas de restricción en los bordes

Finalmente se analizaron los primers con las secuencias de con la herramienta en línea OligoAnalyzer Tool para obtener los valores de temperatura media (T_m) y se hicieron los ajustes necesarios para que hubiera una diferencia < 5 °C entre las T_m del primer directo y reverso de cada gen, para después obtener la secuencia complementaria del primer reverso mientras que el directo conservó el mismo sentido.

Tabla 2. Análisis de primers PDX-1.

	Primer	Tamaño	T_m	Amplicón
Directo	tctagaATGAACGGCGAGGAGCAGTA	26 pb	58 °C	861 pb
Reverso	CtcgagTCGTGGTTCCTGCG	20 pb	51 °C	

Tabla 3. Análisis de primers NGN-3.

	Primer	Tamaño	T_m	Amplicón
Directo	TctagaATGACGCCTCAACCC	21	58 °C	657 pb
Reverso	atgcatTCACAGAAAATCTGAGAAAG	26	56 °C	657 pb

Al haber seleccionado el vector y terminado el diseño de primers, se utilizó el programa Snap Gene para la simulación de PCR y gel de agarosa para verificar el tamaño del amplicón y también se simuló la digestión con las enzimas correspondientes; el producto amplificado se insertó en el vector pET 303 de forma exitosa para ambos genes concluyendo que el experimento era viable (Figura 2). En el caso de PDX-1 se realizó el mismo análisis, pero se identificó la presencia de exones que pudieran complicar el desarrollo de los experimentos por lo que se dejó pendiente la construcción de su proteína recombinante.

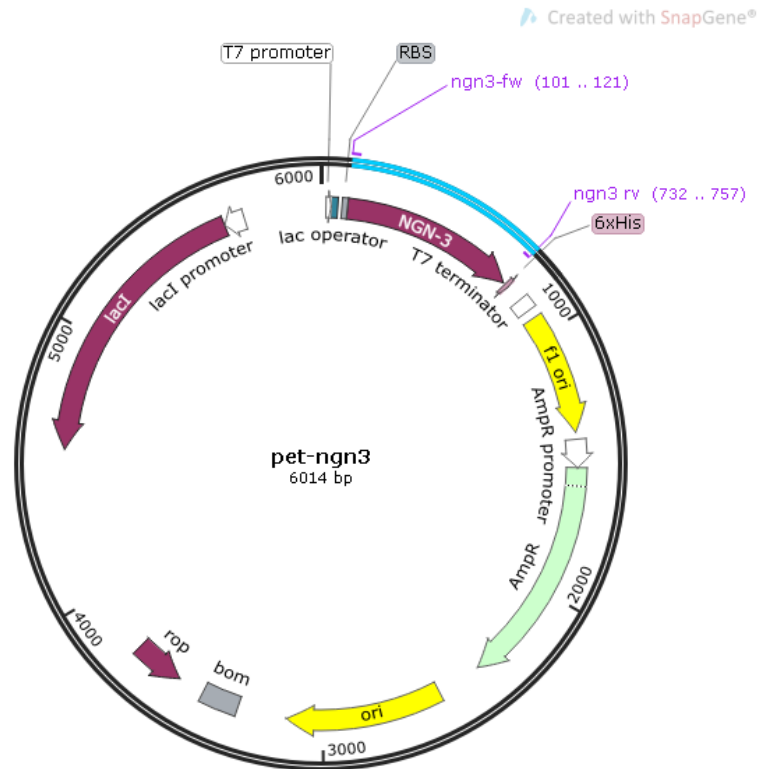


Figura 2. Vector pET 303 con NGN-3.

El vector de expresión pET 303 requiere ser activado con IPTG para remover el supresor lac y permitir que la enzima *E. Coli* RNA polimerasa transcriba la región que codifica la enzima T7 RNA polimerasa, la cual finalmente transcribirá el gen insertado, logrando que exprese su proteína posteriormente.

Posterior al diseño de los primers, se realizó la estandarización de temperaturas de PCR en 24 ciclos cuyas condiciones fueron 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización, 95 °C por 40 segundos, anillamiento en gradiente de 45 °C a 70 °C por 30 segundos y una etapa de extensión a 72 °C por 1 minuto. Tras la estandarización se observó la posible presencia de NGN-3 a 55 °C, por lo que se decidió correr un gel con dos reacciones nuevas para 55 °C y los productos anteriores se volvieron a visualizar en un gel de agarosa/TBE 1% (Figura 3).

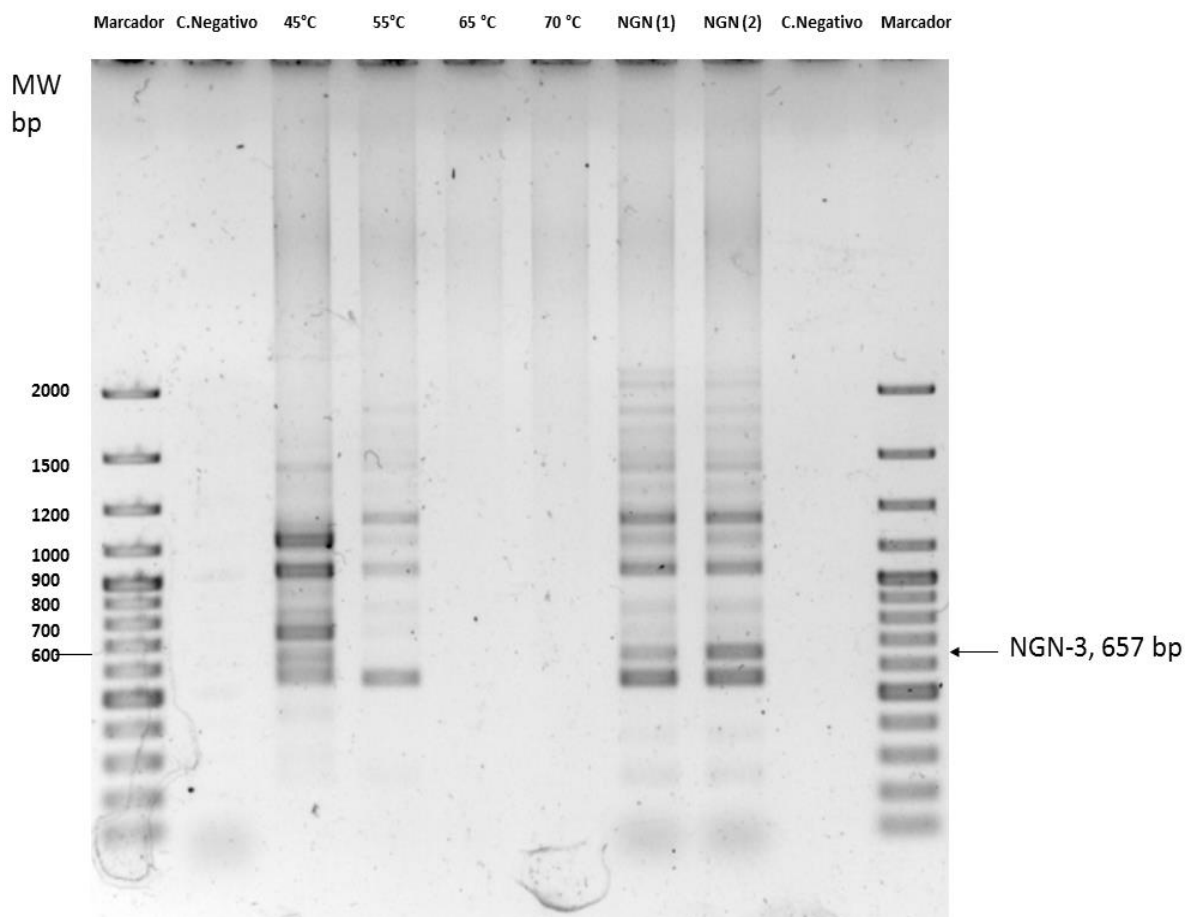


Figura 3. Estandarización de temperaturas de PCR para NGN-3.

En el cuarto pozo se observó un amplicón de tamaño similar al esperado a 55 °C, en los pozos 7 y 8 se cargó el mismo producto, pero se observaron 2 bandas cercanas a las 657 pb que corresponden a NGN-3

Tras observar el fragmento de NGN-3 en un gel de agarosa/TBE 1% se cortaron las dos bandas de gel cercanas a los 600 pares de bases (pb) y se purificaron para reamplificarlas, sin embargo, la banda que se cortó del gel no correspondía exactamente con el tamaño esperado de NGN-3, lo cual se pudo verificar tras correr la banda reamplificada en otro gel más 3 pozos cargados con ADN purificado de sangre que permitieron confirmar el amplicón de 657 pb esperado (Figura 4).

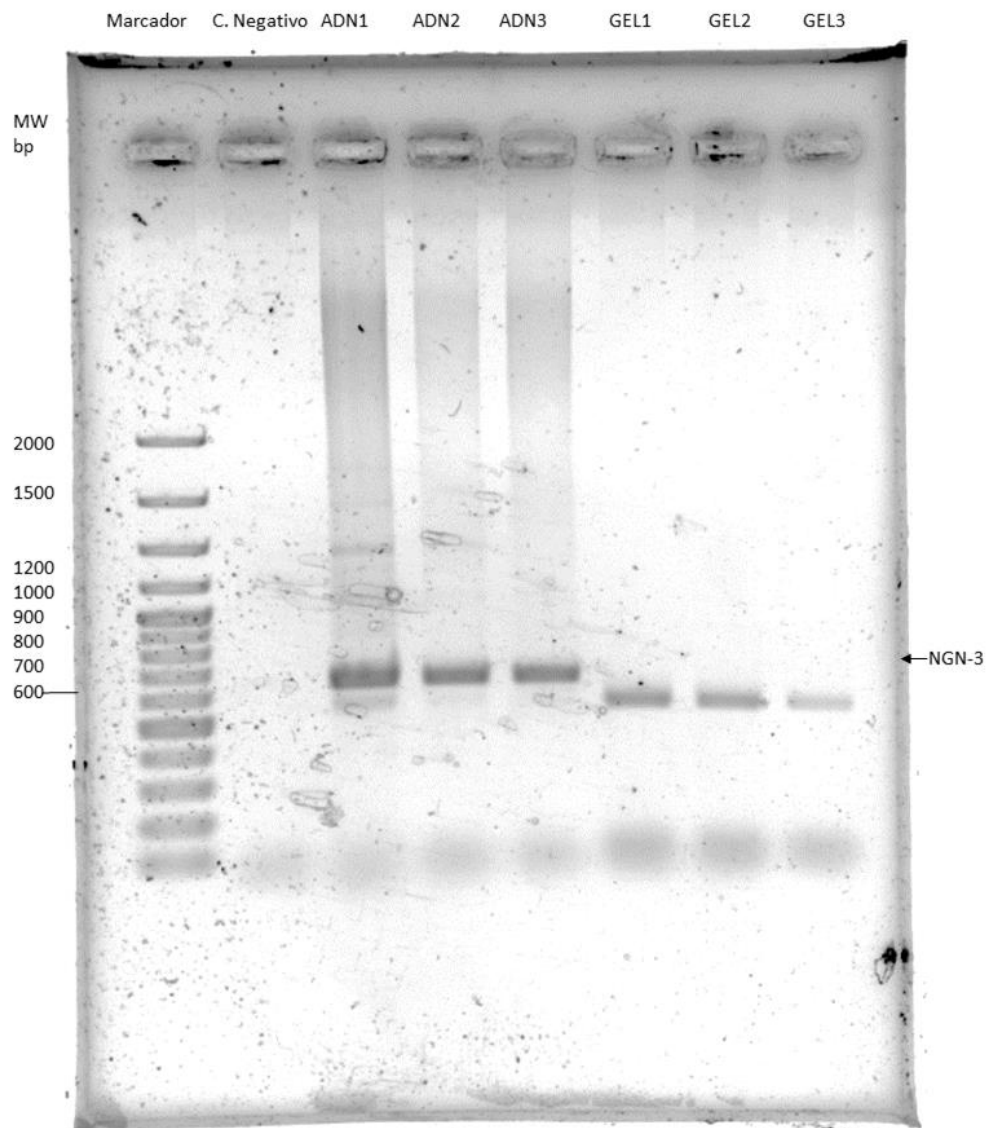


Figura 4. Confirmación de NGN-3 con PCR.

Los pozos 3, 4 y 5 contenían ADN recién purificado en los que se observó el amplicón de 657 pb correspondiente a NGN-3. El producto reamplificado del gel anterior se cargó en los pozos 6, 7 y 8 en los que se visualizó un producto de menor tamaño al esperado

6.3.7. NGN-3 recombinante: purificación de banda, ligación en pJET 1.2 y transformación en *E. Coli* TOP10.

Se cortó la banda correspondiente a NGN-3 y se inició el proceso de purificación con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* utilizando el siguiente protocolo:

- 1.- Se colocó la banda de gel en un tubo de 1.5 ml perforado y con un poco de algodón, posteriormente se colocó ese tubo en uno de 6 ml y se centrifugó a 14,000 RPM por 7 minutos
- 2.- Se adicionaron 10 µl de solución de unión a membrana por cada 10 mg de gel, tras mezclar con el vórtex, se incubó a 50-60 °C hasta disolver el gel.
- 3.- Se insertó una microcolumna en un tubo colector limpio.
- 4.- El gel disuelto fue transferido a la microcolumna ensamblada, esperando 1 minuto para el siguiente paso.
- 5.- Tras centrifugar a 16,000 RPM 1 minuto se descartó el sobrenadante.
- 6.- Se agregaron 700 µl de solución de lavado diluido con etanol al 95%, centrifugando a 16,000 RPM 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- 7.- El paso 6 se repitió con 500 µl de solución de lavado y centrifugando por 5 minutos.
- 8.- El tubo colector fue vaciado y se centrifugó el tubo con la columna por 4 minutos.
- 9.- La microcolumna se transfirió a un tubo nuevo.
- 10.- Se agregaron 50 µl de agua grado molecular, dejando incubar a 50 °C por 2 minutos, posteriormente se centrifugó a 16,000 RPM 1 minuto.
- 11.- La microcolumna se descartó y el producto fue almacenado a 4°C o -20 °C.

Tras purificar el gel se realizó la cuantificación con el equipo nanodrop y se obtuvo una concentración de 9.55 ng/µl. Se realizó el ensayo *in silico* de la ligación con en

el vector pJET 1.2 (Figura 5) y con el fragmento purificado se inició el proceso de ligación con los siguientes pasos:

- 1.- Se mezclaron 3 μ l de agua, 10 μ l de buffer de reacción 2x, 4 μ l del inserto de NGN-3 y 1 μ l de enzima *blunt end*, dejando incubar a 70°C por 5 minutos y colocándolo en hielo posteriormente.
- 2.- Para obtener el producto ligado se completó un volumen de 20 μ l con 1 μ l del vector pJET 1.2 y 1 μ l de ligasa, dejándolo incubar a 22°C por 15 minutos.

El proceso de transformación en *E. Coli* TOP10 se realizó con el siguiente protocolo:

- 1.- Se colocaron 10 μ l del producto de ligación en el tubo de TOP10 quimiocompetentes y se dejaron 30 minutos en hielo.
- 2.- El choque térmico se realizó a 22°C durante 40 segundos en baño María y 5 minutos en hielo para desestabilizar la membrana y facilitar la entrada del vector ligado en la bacteria.
- 3.- La recuperación se realizó agregando 1000 μ l de caldo LB en el tubo con TOP10 y colocando en agitación a 37°C por 30 minutos.
- 4.- El producto transformado se cultivó colocándolo en una caja de Petri con agar con ampicilina y se dejó incubando a 37°C.

La ligación se confirmó en un gel de agarosa 1% para las colonias 3, 6, 8 y 9 (Figura 6)

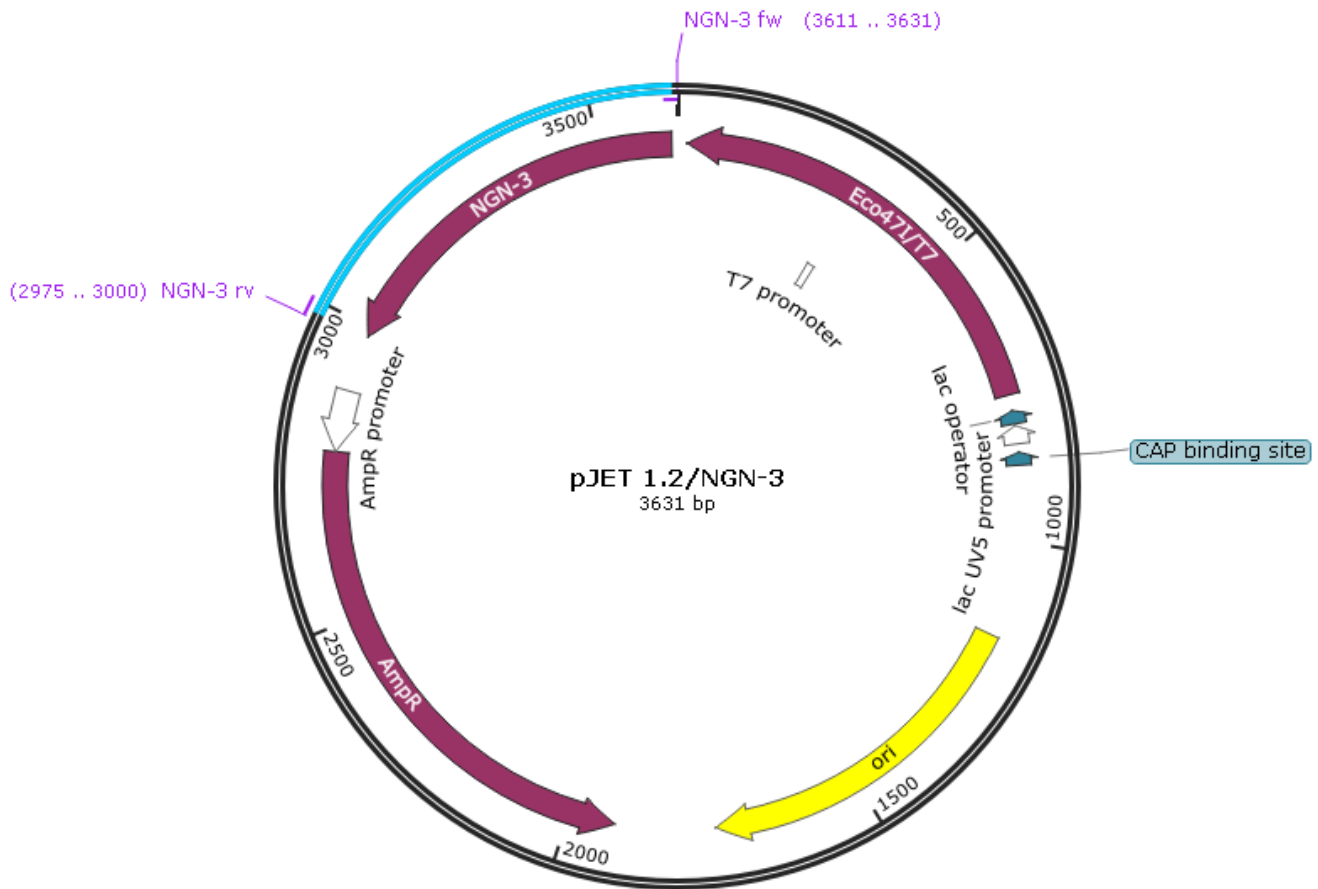


Figura 5. Vector pJET 1.2 con NGN-3.

En el ensayo *in silico* se logró insertar exitosamente NGN-3 y de forma experimental se logró el mismo resultado obteniendo el clon de *E. Coli* TOP10 con el inserto. El vector pJET 1.2 cuenta con una secuencia de resistencia a ampicilina que permite la clonación específica de las bacterias que lo contienen.

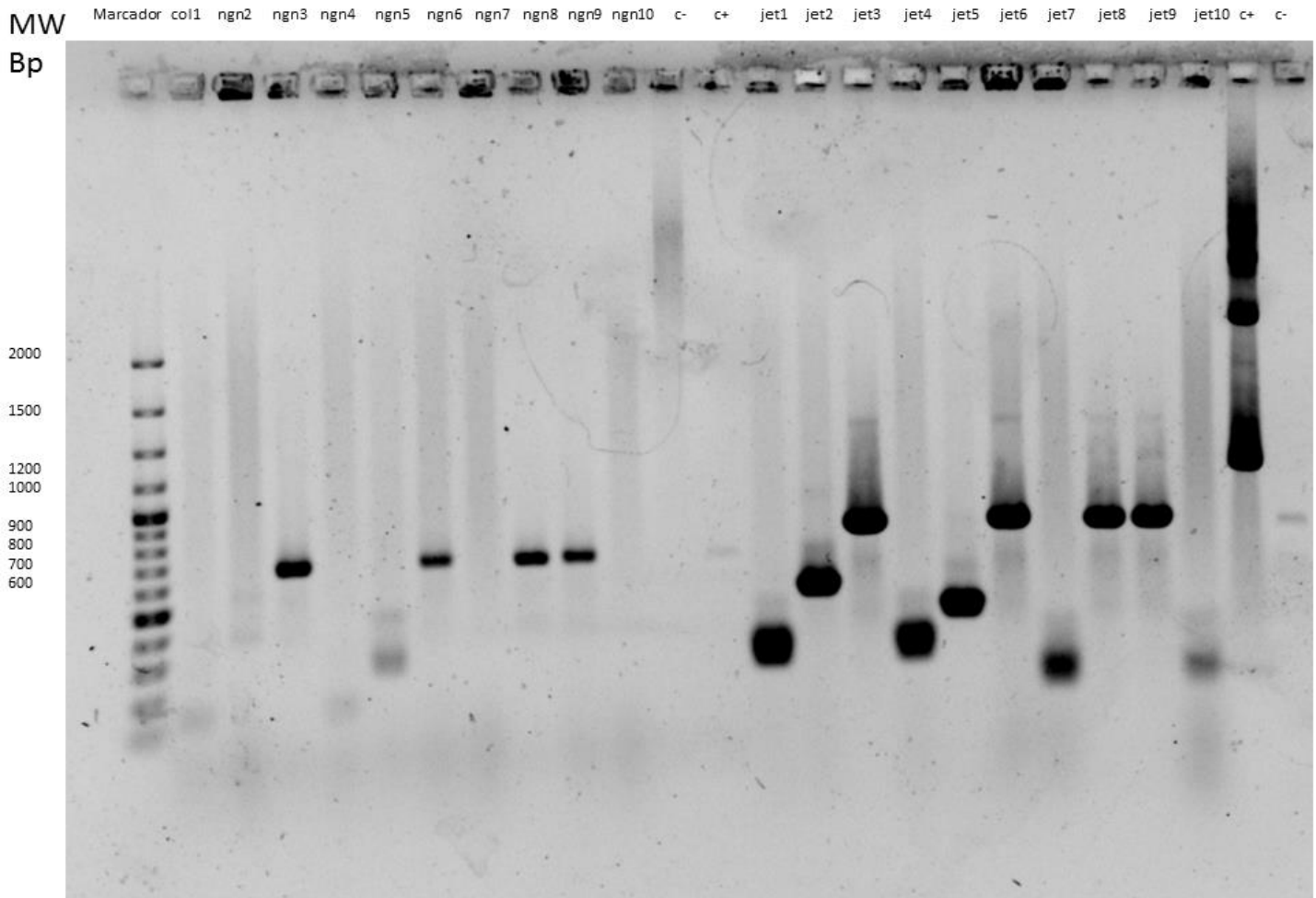


Figura 6. Confirmación de ligación NGN-3 en pJET 1.2.

Se realizó PCR a diez colonias seleccionadas al azar con primers para NGN-3 (pozos 2 a 11) y pJET 1.2 (pozos 14 a 23), las colonias 3, 6, 8 y 9 contuvieron el producto correctamente ligado.

6.4. Variables del estudio

Independientes: glucosa, colesterol total, triacilglicéridos, creatinina, urea, sodio, potasio, ALT, AST y albúmina.

Dependientes: Expresión de los genes *NGN-3* y *PDX-1*

Intervinientes: Edad, edad de gestación, edad gestacional de diagnóstico de DMG, número de gestaciones, dieta.

Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Prueba estadística
Alanina aminotransferasa (ALT)	Enzima hepática que cataliza la transferencia de un grupo amino de alanina alfa cetoglutarato resultando en la formación de piruvato y glutamato.	Concentración sérica obtenida como parte del perfil hepático. Se considera normal de: 12.00 – 78.00 U/L	Cuantitativa continua	UI/L	t-Student
Albúmina	Principal proteína de plasma.	Concentración sérica obtenida como parte del perfil hepático. Se considera normal de: 3.40 – 5.00 g/dL	Cuantitativa continua	g/Dl	t-Student
Aspartato aminotransferasa (AST)	Enzima que transfiere grupos amino de glutamato a oxaloacetato, para formar α -cetoglutarato y aspartato.	Concentración sérica obtenida como parte del perfil hepático. Se considera normal de: 15.00 – 37.00 U/L	Cuantitativa continua	UI/L	t-Student
Colesterol Total	Lípido esteroideo de 27 carbonos con funciones metabólicas y estructurales, la denominación total incluye las fracciones HDL y LDL.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Rango normal de: 0.0 – 200.00 mg/dL	Cuantitativa Continua	mg/Dl	t-Student

Creatinina	Producto final del metabolismo de la fosfocreatinina.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Se considera normal de: 0.60 – 1.00 mg/dL	Cualitativa Continua	mg/Dl	t-Student
Edad	Medida de tiempo de la existencia de una persona.	Años cumplidos, se obtendrá del expediente	Cuantitativa discreta	Años	t-Student
Expresión genética de <i>NGN-3</i>	Proceso mediante el cual un gen sintetiza su producto funcional. <i>NGN-3</i> está implicado en la diferenciación y regulación de las células beta	Cuantificación de la expresión de proteínas funcionales.	Cuantitativa continua	Unidades relativas.	t-Student
Expresión genética de <i>PDX-1</i>	Proceso mediante el cual un gen sintetiza su producto funcional. <i>PDX</i> está implicado en la morfogénesis pancreática y diferenciación de las células beta	Cuantificación de la expresión de proteínas funcionales.	Cuantitativa continua	Unidades relativas.	t-Student
Glucosa	Principal azúcar circulante en la sangre y la mayor fuente de energía en el cuerpo.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Se considera normal de: 70.00 – 110.00 mg/dL	Cuantitativa continua	mg/Dl	t-Student
Potasio (K)	Principal electrolito (catión) intracelular.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Se considera normal de: 3.20 – 5.10 mmol/L	Cuantitativa continúa.	mmol/L	t-Student

Sodio (Na ⁺)	Principal electrolito (catión) del líquido intersticial.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Se considera normal de: 136.00 – 145.00 mmol/L	Cuantitativa continua	mmo/L	t-Student
Triacilglicéridos	Grupo de lípidos con función de reserva energética.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Se considera normal de: 30.00 – 150.00 mg/dL	Cuantitativa Continua	mg/Dl	t-Student
Urea	Producto final del metabolismo de las proteínas.	Concentración sérica obtenida como parte de química clínica. Se considera normal de: 15.00 – 38.00 mg/dL	Cuantitativa continua	mg/Dl	t-Student

6.5. Implicaciones bioéticas

El presente estudio fue registrado ante el Comité de Ética e Investigación del Hospital Materno Perinatal “Mónica Pretelini Sáenz” (HMPMPS) y se apega estrictamente tanto a lo descrito en la declaración de Helsinki, como a la Ley General de Salud en el Capítulo I. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos: ARTÍCULO 17. Adicionalmente se respetó lo establecido en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos: artículo 4, párrafo cuarto, Ley General de salud (título quinto: artículos 98 a 103), Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, Reglamento de la Ley General de Salud en materia de prestación de servicios de atención médica con lo referente al Reglamento de la comisión Federal para la protección contra riesgos sanitarios (COFEPRIS): artículo 14 fracción VIII, Norma del expediente clínico (004). A todas las pacientes se les pidió firmar el consentimiento informado.

6.6. Recolección de datos

Con la autorización del Comité de Ética e Investigación del Hospital Materno Perinatal “Mónica Pretelini Sáenz” (HMPMPS), se obtuvieron las variables de los expedientes y de los análisis bioquímicos, los cuales fueron registrados en el software de hojas de cálculo Excel 2016 (*MICROSOFT, USA*), posteriormente se transfirieron al paquete estadístico SPSS v. 23 (*IBM, USA*) para su análisis.

6.7. Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (SD). Se utilizó la prueba de Kolmogorov para verificar la distribución de las variables continuas. Las variables continuas paramétricas fueron evaluadas con la prueba t de Student, y las no paramétricas con la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias en la distribución de las variables categóricas se analizaron con la prueba de Chi-cuadrada o con la prueba exacta de Fisher. Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS v. 23 (IBM, USA), considerándose una $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativa.

7. Bibliografía.

1. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. 2014;57.
2. Challier J, Basu S, Bintein T, Hotmire K, Minium J, Catalano P, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*. marzo de 2008;29(3):274–81.
3. Luo X, Wu J, Jing S, Yan L-J. Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. *Aging Dis*. el 2 de enero de 2016;7(1):90–110.
4. Summers S. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. enero de 2006;45(1):42–72.
5. Huerta-Chagoya A, Vázquez-Cárdenas P, Moreno-Macías H, Tapia-Maruri L, Rodríguez-Guillén R, López-Vite E, et al. Genetic Determinants for Gestational Diabetes Mellitus and Related Metabolic Traits in Mexican Women. *PLoS ONE* [Internet]. el 14 de mayo de 2015 [citado el 14 de agosto de 2018];10(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431878/>
6. Oliveira AP, Calderon IM, Costa RA, Roscani MG, Magalhães CG, Borges VT. Assessment of structural cardiac abnormalities and diastolic function in women with gestational diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. mayo de 2015;12(3):175–80.
7. Kleinwechter H, Demandt N, Schäfer-Graf U. [Predisposition and phenotypes of gestational diabetes]. *DMW - Dtsch Med Wochenschr*. mayo de 2014;139(21):1123–6.
8. Nava D P, Garduño A A, Pestaña M S, Santamaría F M, Vázquez DA G, Camacho B R, et al. OBESIDAD PREGESTACIONAL Y RIESGO DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA EN EL EMBARAZO Y DIABETES GESTACIONAL. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2011;76(1):10–4.
9. González-Moreno J, Juárez-López JS, Rodríguez-Sánchez JL. Obesidad y embarazo. *Rev Médica MD*. 2013;4.5(4):269–75.
10. McIntyre HD, Chang AM, Callaway LK, Cowley DM, Dyer AR, Radaelli T, et al. Hormonal and Metabolic Factors Associated With Variations in Insulin Sensitivity in Human Pregnancy. *Diabetes Care*. febrero de 2010;33(2):356–60.
11. Pantham P, Aye ILMH, Powell TL. Inflammation in Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta*. julio de 2015;36(7):709–15.
12. Carr DB, Utschneider KM, Hull RL, Tong J, Wallace TM, Kodama K, et al. Gestational Diabetes Mellitus Increases the Risk of Cardiovascular Disease in Women With a Family History of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. el 1 de septiembre de 2006;29(9):2078–83.

13. Yeagle KP, O'Brien JM, Curtin WM, Ural SH. Are gestational and type II diabetes mellitus associated with the Apgar scores of full-term neonates? *Int J Womens Health*. el 8 de octubre de 2018;10:603–7.
14. Bartáková V, Āápalová V, Wágenerová K, Janků P, Bělobrádková J, Kaňková K. [Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes: specific subgroups might require increased attention]. *Ceska Gynekol*. Winter de 2017;82(1):16–23.
15. Ma RCW, Tutino GE, Lillycrop KA, Hanson MA, Tam WH. Maternal diabetes, gestational diabetes and the role of epigenetics in their long term effects on offspring. *Prog Biophys Mol Biol*. julio de 2015;118(1–2):55–68.
16. Neonatal outcomes according to different therapies for gestational diabetes mellitus. Desfechos neonatais de acordo com diferentes terapêuticas do diabetes mellitus gestacional [Internet]. [citado el 28 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021755716300717?token=3B30E2EEE131BB8AC1A057388648B8257D4031C2019FD8545EBA9737A79572E1309754CFEFBEA08256537A64A3ED0880>
17. GCK glucokinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado el 24 de febrero de 2019]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2645?report=full_report
18. Lenzen S. A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status. *J Biol Chem*. el 2 de mayo de 2014;289(18):12189–94.
19. Pu Y, Lee S, Samuels DC, Watson LT, Cao Y. The effect of unhealthy β -cells on insulin secretion in pancreatic islets. *BMC Med Genomics*. el 11 de noviembre de 2013;6(Suppl 3):S6.
20. Murphy R. Monogenic diabetes and pregnancy. *Obstet Med*. septiembre de 2015;8(3):114–20.
21. Chakera AJ, Spyer G, Vincent N, Ellard S, Hattersley AT, Dunne FP. The 0.1% of the Population With Glucokinase Monogenic Diabetes Can Be Recognized by Clinical Characteristics in Pregnancy: The Atlantic Diabetes in Pregnancy Cohort. *Diabetes Care*. el 1 de mayo de 2014;37(5):1230–6.
22. PDX1 pancreatic and duodenal homeobox 1 - Gene - GTR - NCBI [Internet]. [citado el 28 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/genes/3651/>
23. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. el 2 de noviembre de 2017 [citado el 28 de octubre de 2018];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5667467/>

24. Bastidas-Ponce A, Roscioni SS, Burtscher I, Bader E, Sterr M, Bakhti M, et al. Foxa2 and Pdx1 cooperatively regulate postnatal maturation of pancreatic β -cells. *Mol Metab.* el 25 de marzo de 2017;6(6):524–34.
25. Wang W, Shi Q, Guo T, Yang Z, Jia Z, Chen P, et al. PDX1 and ISL1 differentially coordinate with epigenetic modifications to regulate insulin gene expression in varied glucose concentrations. *Mol Cell Endocrinol.* el 15 de junio de 2016;428:38–48.
26. NEUROG3 neurogenin 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado el 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50674>
27. Pauerstein PT, Sugiyama T, Stanley SE, McLean GW, Wang J, Martín MG, et al. Dissecting Human Gene Functions Regulating Islet Development With Targeted Gene Transduction. *Diabetes.* agosto de 2015;64(8):3037–49.
28. Cheng C-W, Villani V, Buono R, Wei M, Kumar S, Yilmaz OH, et al. Fasting-Mimicking Diet Promotes Ngn3-Driven β -Cell Regeneration to Reverse Diabetes. *Cell.* febrero de 2017;168(5):775-788.e12.
29. Valdez IA, Dirice E, Gupta MK, Shirakawa J, Teo AKK, Kulkarni RN. Proinflammatory Cytokines Induce Endocrine Differentiation in Pancreatic Ductal Cells via STAT3-Dependent NGN3 Activation. *Cell Rep.* abril de 2016;15(3):460–70.
30. Kim SY, Saraiva C, Curtis M, Wilson HG, Troyan J, Sharma AJ. Fraction of Gestational Diabetes Mellitus Attributable to Overweight and Obesity by Race/Ethnicity, California, 2007–2009. *Am J Public Health.* octubre de 2013;103(10):e65–72.
31. Jiménez Cruz A. Efecto De La Diabetes Gestacional Sobre Los Indicadores De Adiposidad. *Nutr Hosp.* el 1 de febrero de 2014;(2):397–401.
32. Ramírez-Torres MA. The importance of gestational diabetes beyond pregnancy. *Nutr Rev.* octubre de 2013;71:S37–41.
33. Kassebaum NJ, Bertozzi-Villa A, Coggeshall MS, Shackelford KA, Steiner C, Heuton KR, et al. Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* el 13 de septiembre de 2014;384(9947):980–1004.
34. Alkema L, Chou D, Hogan D, Zhang S, Moller A-B, Gemmill A, et al. National, regional, and global levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015 with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis by the United Nations Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. *Lancet Lond Engl.* el 30 de enero de 2016;387(10017):462–74.

35. Pisanty-Alatorre J. Inequidades en la mortalidad materna en México: un análisis de la desigualdad a escala subestatal. *Salud Pública México*. el 23 de octubre de 2017;59(6, nov-dic):639.
36. Bahrebar M, Soleimani M, Karimi MH, Vahdati A, Yaghobi R. Generation of Islet-like Cell Aggregates from Human Adipose Tissue-derived Stem Cells by Lentiviral Overexpression of PDX-1. *Int J Organ Transplant Med*. 2015;6(2):61–76.
37. Wang L, Fan H, Zhou L, Wu Y, Lu H, Luo J. Altered expression of PGC-1 α and PDX1 and their methylation status are associated with fetal glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 18 de 2018;501(1):300–6.
38. Gomez DL, O'Driscoll M, Sheets TP, Hruban RH, Oberholzer J, McGarrigle JJ, et al. Neurogenin 3 Expressing Cells in the Human Exocrine Pancreas Have the Capacity for Endocrine Cell Fate. *PLoS ONE* [Internet]. el 19 de agosto de 2015 [citado el 30 de septiembre de 2019];10(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4545947/>

8. Anexos

8.1. Carta de envío del artículo



Dear Hugo Mendieta Zerón,

Thank you for submitting your manuscript entitled "PDX-1 and NGN-3 serum expression in gestational diabetes" to Cyprus Journal of Medical Sciences. Your manuscript will first be evaluated by the editors and if it meets the Journal's standards, will be forwarded to referees for scientific review. You will be able to follow the stage of your manuscript in the review process through the author center to which you will have access with your user name and password. You can use the author center for revisions and new submissions.

Cyprus Journal of Medical Sciences
Editorial Board
dergi@cyprusjmedsci.org

Info: This is an automatic system message.

8.2. Resumen del artículo

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a major complication during pregnancy that can endanger the life of the mother and her baby, preventing this complication should be a priority and proper diagnostic enhanced with molecular techniques can help health professionals to provide the best experience for the whole family. In this study, from blood samples we quantified the expression of PDX-1 that under normal circumstances is a transcription factor that helps with the serum glucose regulation and we found that it is under expressed in patients with GDM when compared with patients that had a normal pregnancy. NGN-3 is an endocrine differentiation marker and when it is expressed on the pancreatic cells it leads to the β -cell fate, in GDM the number of these cells tends to be lower and we found that NGN-3 is also under expressed in patients with GDM.