



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA.

**“Niveles de ghrelina en embarazo y posparto de mujeres con diabetes mellitus gestacional y embarazo con tolerancia normal a la glucosa”**

**T E S I S**  
**Que para obtener el título de**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.**

PRESENTA:  
**Claudia Teresa Gutiérrez Escobar.**

DIRECTORA DE TESIS:  
**Dra. Renata Patricia Saucedo García.**

*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades  
Endocrinas, Diabetes y Metabolismo, Hospital de  
Especialidades, CMN siglo XXI, IMSS.*

*Ciudad de México, 2016.*





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Nunca tengas miedo del día que no has visto”

Torcuato Tasso

## **Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Diabetes y Metabolismo, Hospital de Especialidades, CMN siglo XXI, IMSS y al Dr. Arturo Zarate Treviño Jefe de esta Unidad.

Al Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del CMN “La Raza”, IMSS.

A la Dra. Renata Patricia Saucedo García directora de tesis.

M. en C. Rosa Elba Galván Duarte asesora de tesis.

Dr. Edgardo Puello, Dr. Gregorio Cruz Duran y a los médicos del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 por su apoyo con el diagnóstico y atención a las mujeres del estudio.

A la Química Sandra Leticia Campos León por su trabajo en el laboratorio de RIA así como sus enseñanzas.

A las doctoras Dra. Guadalupe Rico, Dra. Gloria Vega y al cDr. Jorge Valencia Ortega por su colaboración en la realización de este proyecto.

También agradecer a la revisora de tesis: Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez y a los sinodales: Dra. Mirna Ruiz Ramos y M. en C. Ivan Monsalvo Montiel.

## **DEDICADA A:**

Agradezco a Dios por los maestros de vida que ha colocado en mi camino.

A mis padres Rafael y Teresa quienes han dedicado gran parte de su tiempo, amor, dedicación y esfuerzo para guiarme en la vida con el valor y criterio que requiere un profesionista, también confiaron en que podría lograr llegar a la meta pese a los momentos de duda, a mis hermanas Tania y Gabriela quienes me han acompañado en este largo trayecto, así como a mis primos a los que considero mis hermanos Geovani, Annie Luz, Diego, Fatima, Karla, Narcizo, Alberto, los gemelos Antonio y Jesus.

A mis tíos María de la Luz Gutiérrez y Rubén Retana que han sido parte importante de este proyecto de vida.

A mis abuelos José Gutiérrez Soto y Luz María Ortiz Cid quienes me enseñaron a ver el mundo de manera diferente.

A mi mamá Esther por enseñarme a tener fuerza y que no importa que suceda, debo seguir adelante y luchar hasta el final como una guerrera, también me diste esperanza y mucho cariño.

A mi gran y grandiosa familia (Gutiérrez y Escobar) por todo lo que me han enseñado y el apoyo que me han brindado.

También la dedico a la Dra. Renata Saucedo y la Maestra Rosa Elba Galván quienes me han guiado y enseñado con mucha paciencia, dedicación y cariño.

A todos mis profesores por las enseñanzas académicas y para mejorar mi persona.

Al profesor Reynaldo Baltazar Díaz, por sembrar la semilla de la curiosidad y el deseo de ser una científica.

A Jorge Valencia por la amistad y los consejos que me ha brindado.

A Mario Bernache gracias por ser mi compañero en los momentos difíciles y mi pareja.

A mis amigos quienes más de una vez me han escuchado y ayudado: Nayeli Romero, Lorena, Hugo Benavides, Eduardo, Marcelo, Juan Flores, Misael, Daniela, Aldo, Alejandro, Sandra, Alma, Vero, Salvador, Barinia, Tania, Ivan y Manuel y a los chicos del laboratorio 9 de la UMIEZ.

A Jorge Valencia, a la Dra Sarita, a la Dra Lourdes Basurto, al Dr. Marcelino Hernandez, a Irma y los demás miembros de la Unidad de Investigación por enseñarme y guiarme en mi formación final y más aún en el inicio de la que espero sea la siguiente etapa de mi vida profesional, la investigación.

Con una especial dedicatoria a todos aquellos que dudaron de mis capacidades y a los que quisieron verme caer pese a su negatividad logre llegar a una de mis metas.

## **Abreviaturas.**

Aa	Aminoácidos
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AgRP	Péptido similar a Agouti
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas
CGRP	Receptor del neuropéptido sensorial
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GH	Hormona de crecimiento
GHRPs	Péptidos liberadores de GH
GHS	Secretagogos de GH
GHS-R	Receptor de los secretagogos de GH
GOAT	Enzima ghrelina O-aciltransferasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMA-RI	Modelo homeostático de resistencia a insulina
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INPER	Instituto Nacional de Perinatología

IRS-1	Sustrato de receptor de insulina
MC3R	Receptor de melanocortina
NDDG	National Diabetes Data Group
NF $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear $\kappa$ $\beta$
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPH	Protamina neutra de Hagedorn
NPY	Neuropéptido Y
OGTT	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGH	Hormona de crecimiento placentaria
PL	Lactógeno placentario
POMC	Neuronas productoras de proopiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
PPAR $\gamma$	Receptor de peroxisoma proliferador activado $\gamma$
PRL	Prolactina
PYY	Péptido YY
RI	Resistencia a la insulina
RIA	Radioinmunoanálisis
SNS	Sistema nervioso simpático
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNG	Tolerancia normal a la glucosa



## INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	5
3.1. Cambios fisiológicos en el embarazo	5
3.2. Diabetes mellitus gestacional	7
3.2.1. Epidemiología	9
3.2.2. Fisiopatología	10
3.2.3. Detección y diagnóstico	11
3.2.4. Tratamiento	13
3.3. Ghrelina	15
3.3.1. Regulación de la secreción de ghrelina	23
3.3.2. Acción de ghrelina en el equilibrio energético	25
3.3.3. Ghrelina en embarazo	26
3.3.4. Ghrelina en DMG	27

4. Planteamiento del problema	29
5. Hipótesis del trabajo	30
6. Objetivos	31
7. Material y métodos	32
7.1. Población	32
7.2. Variables	32
7.3. Técnicas	33
7.3.1. Glucosa método enzimatico (GOD-POD)	34
7.3.2. Colesterol método enzimatico (CHOD-POD)	35
7.3.3. Trigliceridos método enzimatico (GPO-POD)	37
7.3.4. . Ghrelina por técnica de RIA	39
7.3.5. Insulina por técnica de RIA	42
7.3.6. Resistencia a la insulina.	45
7.3.7. Medidas antropométricas	45
7.4. Diseño estadístico	46

8. Resultados	47
8.1. Seguimiento de grupos de estudio	47
8.2. Características antropométricas y obstétricas de las mujeres previas al embarazo.	48
8.3. Características antropométricas y bioquímicas en el tercer trimestre de embarazo y seis semanas posparto.	50
8.4. Asociación de ghrelina con otras variables	53
9. Discusión	55
10. Conclusión	59
11. Perspectivas	60
12. Referencias	61
13. Anexos	72

### **Antecedentes.**

La frecuencia de la diabetes mellitus gestacional (DMG) se ha incrementado en los últimos años y por ello se ha buscado comprender mejor su etiopatogenia a través del estudio de la resistencia a la insulina (RI) y la interacción de la insulina con otras hormonas como la ghrelina. La ghrelina es secretada en el estómago y actúa principalmente en la hipófisis donde tiene una función orexigénica. Estudios previos muestran que el nivel de ghrelina se modifica durante el embarazo debido al aumento de RI, insulina, leptina, prolactina (PRL), lactógeno placentario (PL) y diversas citocinas. Asimismo, la ghrelina se modifica con la hiperglucemia e hiperinsulinismo, estados característicos de la DMG motivo por el cual se realizó este estudio.

### **Objetivos.**

Medir los niveles de ghrelina en el embarazo y 6 semanas después del parto en mujeres con DMG y en mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa (TNG).

Identificar la asociación entre la concentración de ghrelina y la resistencia a la insulina en los dos grupos de estudio.

### **Método.**

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, comparativo, longitudinal en el cual se incluyeron 49 mujeres embarazadas, 23 con DMG y 26 con TNG. Se les tomó muestra de sangre venosa en el tercer trimestre de embarazo y seis semanas posparto y se midió el nivel de ghrelina e insulina por radioinmunoanálisis (RIA) y el nivel de

glucosa, triglicéridos y colesterol por espectrofotometría. La resistencia a la insulina se evaluó por el modelo homeostático HOMA RI. El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics versión 21.

### **Resultados.**

En el tercer trimestre de embarazo no se encontraron diferencias en los niveles de ghrelina entre las mujeres con DMG y las mujeres con TNG [mediana y rangos intercuartílicos 626.1 pg/mL (512.9-769.6) y 595.3 pg/mL (536.1-698.8) respectivamente]. A las seis semanas posparto se incrementaron los niveles de ghrelina en ambos grupos y no se encontró diferencia entre ellos [DMG 663.6 pg/mL (564.4-806.0) y TNG 763.1 pg/mL (586.6-1008.2)]. Además, no se encontró asociación entre ghrelina y RI en el embarazo y a las seis semanas posparto.

### **Conclusión.**

Los niveles de ghrelina son menores en el embarazo que en el posparto, no hay una diferencia en los niveles de ghrelina entre las mujeres con DMG y las de TNG en el embarazo y a las seis semanas posparto. Tampoco se obtuvo una asociación entre los niveles de ghrelina y la RI. Al parecer la ghrelina no se ve afectada en la población de estudio con DMG, la cual no presentó mayor RI en comparación a las mujeres con TNG.

## 2. INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha señalado un incremento en la frecuencia de DMG en paralelo al aumento de la obesidad en mujeres en edad reproductiva, por lo cual ha sido de interés el conocimiento de su etiopatogenia y la relación entre ambas enfermedades.

La DMG se define como la intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo.<sup>1-4</sup>

Durante el embarazo debido a los efectos bloqueadores de otras hormonas en la acción de la insulina, condición denominada RI, que se presenta regularmente después de la semana 20 de gestación. La respuesta normal ante esto es un aumento en la secreción de la insulina, sin embargo cuando esta secreción es incapaz de compensar la RI se presenta la DMG.<sup>5</sup>

En el proceso fisiopatológico de la DMG también se han involucrado citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e IL-18 y diversas adipocinas como leptina y adiponectina. Estas citocinas regulan la secreción de la insulina y su actividad contribuyendo a la RI. Se ha descrito una correlación entre los niveles de IL-6 con la adiposidad y con la RI. En pacientes con DMG se han identificado niveles incrementados de leptina, IL-6, TNF- $\alpha$  y niveles disminuidos de adiponectina comparados con los de mujeres embarazadas sin DMG, estas biomoléculas son inhibitorias de la secreción de ghrelina por lo que se espera que estas mujeres también presenten menores niveles.<sup>5-6</sup>

En el periodo del embarazo se han visto modificados los niveles de ghrelina.<sup>7-12</sup> Esta hormona es producida principalmente en el estómago y es transportada a través del torrente sanguíneo unida a lipoproteínas

de alta densidad (HDL) y a otras proteínas como la albumina. Su principal acción biológica es la liberación de la hormona de crecimiento (GH) y la regulación del apetito a través del incremento en el núcleo arcuato de la expresión del neuropéptido Y (NPY) y del péptido similar a Agouti (AgRP), potentes estimuladores de la ingesta e inhibe a neuronas productoras de proopiomelanocortina (POMC) y del transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART), los cuales son neuropéptidos anorexigénicos.<sup>13-14</sup>

La ghrelina además ejerce numerosas acciones en los ejes lactotrofo, corticotrofo y gonadotrofo, modulando también la actividad cardíaca, el ciclo sueño vigilia y el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Además es importante en la regulación de la homeostasis energética a largo plazo, ya que induce un incremento del peso corporal estimulando la deposición de grasas. Asimismo se ha encontrado que la ghrelina promueve la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos.<sup>7,14</sup>

En estudios de hiperglicemia e hiperinsulinismo se han observado niveles disminuidos de ghrelina, sin embargo existe controversia en los niveles obtenidos en la DMG. Se desconoce cómo se encuentran los niveles en la población mexicana, por lo cual se determinaron los niveles de ghrelina y su relación con insulina y RI en el tercer trimestre de embarazo (cuando se presenta una mayor RI) y a las seis semanas posparto, ya que la DMG es un factor de riesgo para desarrollar DM2 y niveles bajos de ghrelina se han asociado a la aparición de DM2.<sup>7-8,10-12</sup>

#### 3.1. Cambios fisiológicos en el embarazo

El embarazo se define como el periodo comprendido desde la concepción hasta la expulsión o extracción del feto y sus anexos. Es considerado un modelo tricompartmental en el que interactúan la madre, la placenta y el feto para garantizar el crecimiento y desarrollo fetales.<sup>15-16</sup>

El adecuado crecimiento fetal se da mediante una interacción armonizada entre la madre, la placenta y el feto. Este equilibrio puede ser alterado por factores ambientales o maternos (dieta, composición corporal, situación endocrina y metabolismo). Los nutrientes de la madre pasan a través de la placenta por las arterias uterinas y estos a su vez acceden al feto por la vena umbilical (Fig. 1).<sup>16-17</sup>

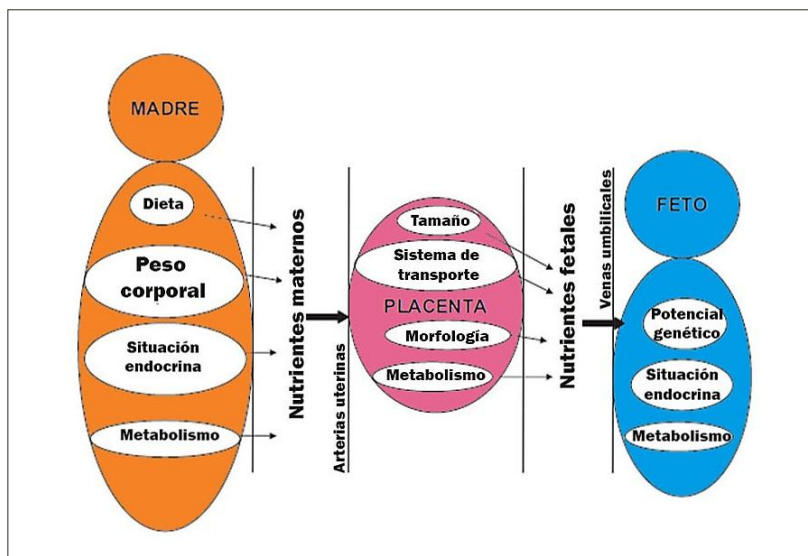


Figura 1. Modelo tricompartmental del embarazo.<sup>16</sup>



El embarazo da lugar a un incremento en la necesidad energética respecto al estado no gestacional de 90, 287 y 466 Kcal/día en el primer, segundo y tercer trimestre respectivamente. Estas calorías se obtienen de una dieta equilibrada con la ingesta sugerida de 40 a 50% de carbohidratos, 15 a 20% de proteínas y 20 a 35% de grasas.<sup>16-18</sup>

El metabolismo materno experimenta una serie de cambios para adaptarse a las necesidades fetales y placentarias. Durante el primer y segundo trimestre estas necesidades son dirigidas al desarrollo de órganos y el crecimiento fetal está limitado. Se presenta hiperfagia y aumento de sensibilidad a la insulina, permitiendo que la madre aumente el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, incrementando el índice de masa magra y por ende el peso corporal. Se produce además un incremento en los niveles de leptina e insulina séricas, la madre se encuentra predispuesta a la hipoglucemia de ayuno debido al consumo de glucosa por la placenta y al crecimiento fetal.<sup>18</sup> En el tercer trimestre de embarazo el crecimiento fetal llega a ser exponencial, aumentan las demandas nutricionales y se incrementan las concentraciones hormonales séricas de PRL, PL, hormona de crecimiento placentaria humana (PGH), cortisol materno y progesterona, quienes participan en una reducción de la sensibilidad a la insulina en más del 50% en el tejido adiposo y músculo esquelético.<sup>7, 16-18</sup>

La RI estimula la replicación de células  $\beta$ , la transcripción del gen de la insulina, la secreción de insulina dependiente de glucosa en los islotes pancreáticos, promueve la lipólisis, la cetonemia de ayuno y la hiperglucemia posprandial para incrementar la oferta de nutrientes al feto. Por lo anterior, el periodo entre la semana 26 a 32 de gestación es de gran trascendencia desde el punto de vista metabólico.<sup>7,16-18</sup>

### **3.2. Diabetes mellitus gestacional**

La DMG se define como la intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Se presenta cuando la célula beta es incapaz de secretar la insulina necesaria para compensar la resistencia a la insulina del embarazo.<sup>1-4</sup>

Existen varios factores de riesgo para la aparición de la enfermedad entre los que se encuentran DMG previa, historia familiar de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sobrepeso, obesidad e incremento de la edad materna.<sup>4-5,15,19-21</sup>

En México, las mujeres embarazadas se clasifican en tres grupos de acuerdo a los factores de riesgo para desarrollar DMG:

- Bajo riesgo: peso normal al nacer, edad  $\leq 25$  años, sin antecedentes de diabetes en familiares de primer grado, con peso normal [índice de masa corporal (IMC)  $< 25 \text{ Kg/m}^2$ ] antes del embarazo, sin antecedentes obstétricos.

- Riesgo moderado: no cumplen criterios de bajo ni de alto riesgo.
- Alto riesgo: obesidad central, IMC >30, edad mayor a 30 años, historia familiar en primer grado de DM2, embarazo previo con DMG o intolerancia a la glucosa, enfermedad hipertensiva específica del embarazo, abortos de repetición, macrosomía de productos previos (percentil >90)<sup>22</sup>, malformaciones fetales, hipertensión sistémica, antecedentes de óbito y polihidramnios.<sup>4-5,21-22</sup>

Las complicaciones de la DMG afectan a la madre y al feto. Las complicaciones maternas son: enfermedad hipertensiva del embarazo, infecciones de vías urinarias recurrentes, candidiasis vaginal, cesárea o parto pretérmino.<sup>23</sup> En relación al feto las principales complicaciones son: aborto espontáneo, malformaciones congénitas, macrosomía, organomegalia y óbito.<sup>23-25</sup> En el neonato son: hipoglucemia, hiperinsulinemia, ictericia, hipocalcemia, policitemia y síndrome de dificultad respiratoria.<sup>22-25</sup> Además durante su desarrollo tienen mayor riesgo de desarrollar obesidad, DM2 y enfermedad cardiovascular.<sup>5,23,25-26</sup>

En la mayoría de las mujeres los niveles de glucosa retornan a la normalidad una vez concluida la gestación. Sin embargo la DMG es un factor de riesgo para desarrollar DM2 en el futuro. Se ha señalado que dos terceras partes tendrán DMG en el siguiente embarazo, 20% intolerancia a la glucosa en el periodo posparto y 50% desarrollarán DM 2.<sup>11,20,26</sup>

### 3.2.1. Epidemiología

En el año 2013 la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) estimó una incidencia global de hiperglucemia durante el embarazo de 16.9%, de la cual el 90% correspondió a DMG. La IDF también mostró una diferencia en este porcentaje en relación a las distintas regiones del mundo (Fig. 2). La prevalencia de DMG fue mayor en Norteamérica, India, Australia y América Latina.<sup>27-28</sup>

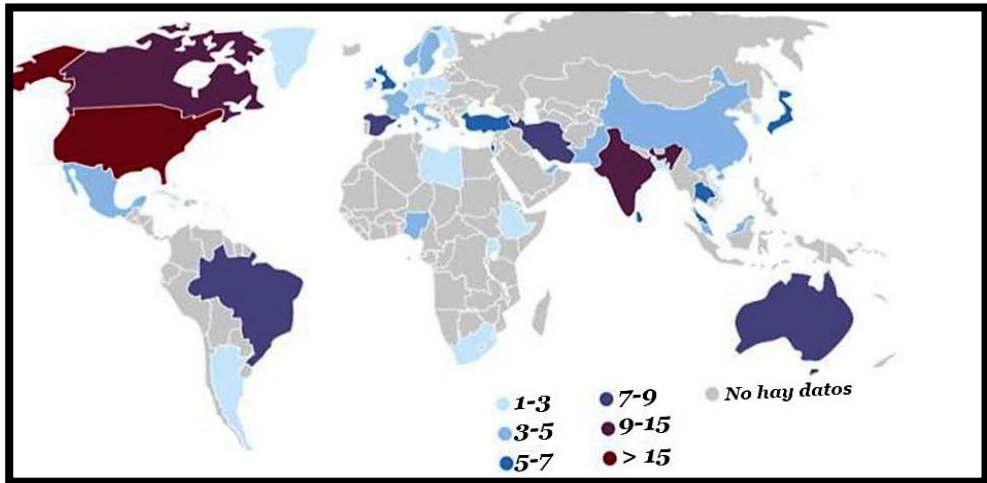


Figura 2. Distribución mundial de DMG (datos de la IDF).<sup>27</sup>

En México, se ha estimado una prevalencia entre 3 y 19.6% con un promedio de 7%.<sup>26</sup> De manera particular en un estudio realizado en el Hospital Juárez de México se indicó una prevalencia de 13% en el 2010. En otro estudio realizado en el Instituto Nacional de Perinatología (INPER) se encontró una prevalencia de 8.4% en 2005,

mientras que en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se señaló una prevalencia del 17.7% en 2003.<sup>4,6,14,26</sup>

En años recientes, se ha señalado un incremento en la frecuencia de DMG en paralelo al aumento de la obesidad en mujeres en edad reproductiva.<sup>20</sup>

### **3.2.2. Fisiopatología**

Estudios prospectivos han mostrado que la DMG se asocia con una disminución de adiponectina y citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10) y con el incremento de leptina y citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ ).<sup>29</sup> Esta alteración en la secreción de adipocinas afecta la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina modificando el metabolismo de glucosa. De esta manera, se ha señalado una disminución en la función de la célula  $\beta$  del 41% durante el embarazo y 50% después del embarazo<sup>30</sup> acompañada de una mayor RI.<sup>31</sup> En el desarrollo de la RI se han implicado defectos post-receptor en la señalización de insulina como la disminución en la actividad del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) lo que contribuye a la disminución en la utilización de glucosa por el músculo.<sup>32</sup>

### **3.2.3. Detección y diagnóstico**

Existen varios criterios para la detección y diagnóstico de la DMG. Entre los más utilizados se encuentran los de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los de la Asociación Americana de Diabetes (ADA).<sup>1-2</sup> Los criterios de la OMS son concentración de glucosa plasmática en ayunas  $\geq 126$  mg/dL o glucosa plasmática ocasional  $\geq 200$  mg/dL confirmada al día siguiente, realizadas entre las semanas 24 y 28 de gestación. La OMS también sugiere realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) ya sea con la prueba de un paso o la de dos pasos. La OGTT de un paso consiste en una carga de 75g de glucosa en 300 o 400mL de agua y la OGTT de dos pasos consta de un primer paso con una carga de 50g de glucosa y si después de una hora la glucosa es  $\geq 140$  mg/dL se realiza una segunda carga de 75 g de glucosa. Tanto en la prueba de un paso como en la de dos pasos si la glucosa es mayor o igual a 140 mg/dL a las dos horas postcarga se considera DMG<sup>1</sup>.

Los criterios diagnóstico de la DMG recomendados por la ADA son realizar la prueba de OGTT de un paso o de dos pasos entre las semanas 24 y 28 de gestación. La prueba de un paso se realiza con una carga de glucosa de 75g y se mide la glucosa plasmática antes de la carga, 1 hora y 2 horas postcarga. Si uno o más valores están por arriba del valor umbral se considera DMG. En la prueba de dos pasos primero se realiza una carga de 50 g de glucosa y una hora después

se mide la glucosa plasmática. Si ésta es mayor a 140 mg/dL se realiza el segundo paso con una carga de 100g y se mide la glucosa una, dos y tres horas después. Si dos o más valores están por arriba de los señalados en el cuadro 1 se considera DMG.<sup>2</sup>

Cuadro 1. Puntos de corte para el diagnóstico de DMG propuestos por la ADA<sup>2</sup>.

	<b>OGTT un paso</b>	<b>OGTT dos pasos</b>	
		Carpenter/ Cousant	*NDDG
<b>Ayunas</b>	≥ 92 mg/dL	≥ 95 mg/dL	≥ 105 mg/dL
<b>Carga de 50g</b>		≥140 mg/dL	≥140 mg/dL
<b>1 hora</b>	≥ 180 mg/dL	≥ 180 mg/dL	≥ 190 mg/dL
<b>2 horas</b>	≥ 153 mg/dL	≥ 155 mg/dL	≥ 165 mg/dL
<b>3 horas</b>		≥ 140 mg/dL	≥ 145 mg/dL

\*NDDG: National Diabetes Data Group.

Los criterios utilizados en México para el diagnóstico de DMG son los de la NOM-015-SSA2-2010 que se basan en la medición de glucosa de ayuno o casual y en la realización de una prueba tamiz con carga de 50g de glucosa y posteriormente una OGTT con carga de 100g o de 75g, utilizando los puntos de corte del cuadro 2. Si dos o más puntos están elevados se diagnostica DMG.<sup>3-4,25</sup>

Cuadro 2. Puntos de corte para el diagnóstico de DMG en México<sup>4,25</sup>

	Dos ocasiones	Prueba tamiz 50g	OGTT 100g	OGTT 75g
Ayunas	≥126 mg/dL	≥ 95 mg/dL	≥ 95 mg/dL	≥ 95 mg/dL
Casual	≥200 mg/dL			
1 hora		≥ 180 mg/dL o ≥170 mg/dL*	≥ 180 mg/dL	≥ 180 mg/dL
2 horas			≥ 155 mg/dL	≥ 155 mg/dL
3 horas			≥ 140 mg/dL	

\* mujeres mayores de 30 años

### 3.2.4. Tratamiento

Se ha propuesto que el tratamiento en DMG sea una terapia integral que consista en: educación en diabetes a la paciente y familiares cercanos, plan alimenticio, actividad física y en caso necesario la administración de insulina.<sup>4,20,25</sup>

La educación en diabetes es muy importante para el tratamiento ya que de sus resultados depende la comprensión y aceptación por parte de la paciente. Consiste en instruir a la paciente acerca de los riesgos y complicaciones que la DMG implican para ella y el neonato a corto y largo plazo, el plan de alimentación y la modificación de los hábitos alimentarios, los objetivos del control metabólico, la utilización de glucoméetro y tiras reactivas para la medición de glucosa y la utilización de insulina.<sup>5,20</sup>



El plan alimenticio consiste en una ingesta de 28 a 32 cal/kg de peso por día en el primer trimestre y de 36 a 38 cal/kg por día en el segundo y tercer trimestre del embarazo, de los cuales 40 a 45% corresponde a carbohidratos, de 20 a 25% a proteínas y de 30 a 40% a lípidos. Las grasas saturadas no deben exceder el 10% del total de lípidos y se debe evitar la ingesta de carbohidratos simples y alimentos con alto índice glucémico. Para pacientes con IMC >30 previo al embarazo se recomienda una restricción calórica del 30%, la cual reduce el índice de macrosomía sin riesgos para el feto. La dieta restrictiva no debe ser menor a 1600 kcal/día.<sup>3-5,20</sup>

La programación de actividad física se hace con previa valoración médica y se recomienda que las pacientes se inscriban a un programa de actividad física supervisado o que realicen una caminata leve de 20 a 45 minutos tres veces por semana.<sup>5</sup>

Cuando con la dieta y el ejercicio no se logra obtener una glucosa en sangre menor de 95 mg/dL en ayuno y 140 mg/dL una hora postprandial en un periodo de dos semanas, se recurre al tratamiento farmacológico con insulina. El esquema terapéutico de la insulina consiste en una combinación de insulina de acción rápida con insulina de acción intermedia (NPH) administrada 30 minutos antes del desayuno y de la cena. Los requerimientos varían desde 0.3 UI a 1.5 UI por kilogramo de peso en relación a diversos factores como el descontrol metabólico de las pacientes, a la presencia de sobrepeso u

obesidad, a la edad gestacional y a enfermedades concomitantes que modifiquen la glucemia como la hiperémesis gravídica. La dosis total calculada se divide en 2/3 antes del desayuno y 1/3 antes de la cena. La razón NPH/rápida es 2/1 antes del desayuno y 1/1 antes de la cena.<sup>4,25</sup>

Se recomienda iniciar con la mínima dosis de insulina y gradualmente incrementarla de acuerdo al automonitoreo con glucemias capilares pre y postprandiales por lo menos tres veces por semana.<sup>25</sup>

### **3.3. Ghrelina**

A finales de los años 70 Bowers y colaboradores descubrieron los primeros agonistas sintéticos con actividad similar a ghrelina, los péptidos liberadores de GH (GHRPs) y los secretagogos de GH (GHSs).<sup>33</sup> En 1996, Smith y colaboradores clonaron el receptor de los GHS (GHS-R) y descubrieron que estos secretagogos al unirse a su receptor incrementaban la concentración intracelular de calcio estimulando la síntesis de GH (Fig. 3).<sup>34</sup> Este receptor es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G, tiene siete dominios transmembrana y está integrado por 366 aminoácidos.<sup>35</sup> Posteriormente, en 1999 los estudios de Kojima y colaboradores<sup>36</sup> llevaron a la identificación de un péptido de 28 aminoácidos que se unía al receptor secretagogo de la hormona de crecimiento subtipo 1a (GHSR1a) y lo denominaron “ghrelina” (de la raíz protoindoeuropea

“ghre” que significa crecimiento y del sufijo relin que significa secreción).<sup>37</sup>

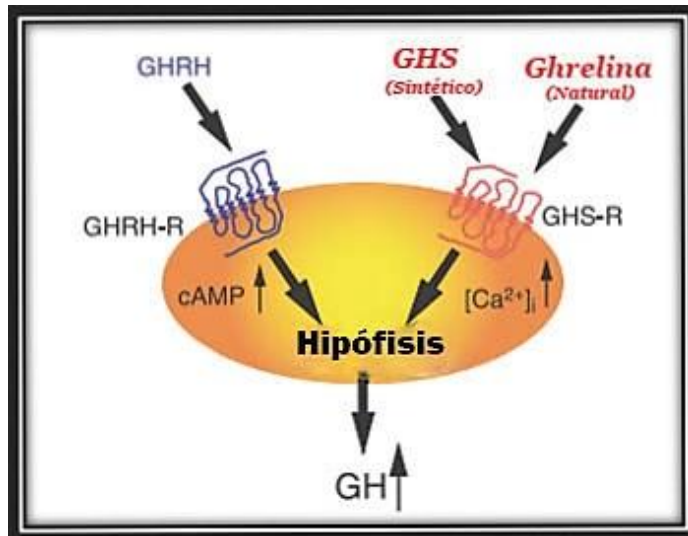


Figura 3. Regulación de la liberación de GH en la hipófisis por estimulación de los receptores de péptidos liberadores (GHRH) y de los receptores de los secretagogos de GH (GHS-R).<sup>37</sup>

El gen que codifica a la ghrelina se localiza en el cromosoma 3p25-26 y está compuesto de 5 exones. El RNAm traduce un péptido de 117 aminoácidos conocido como preproghrelina. Los primeros 25 aminoácidos corresponden al péptido señal, los aminoácidos 24 al 51 dan lugar a la ghrelina y del 76 al 96 dan lugar a la obestatina (Fig. 4).<sup>35, 37-39</sup>

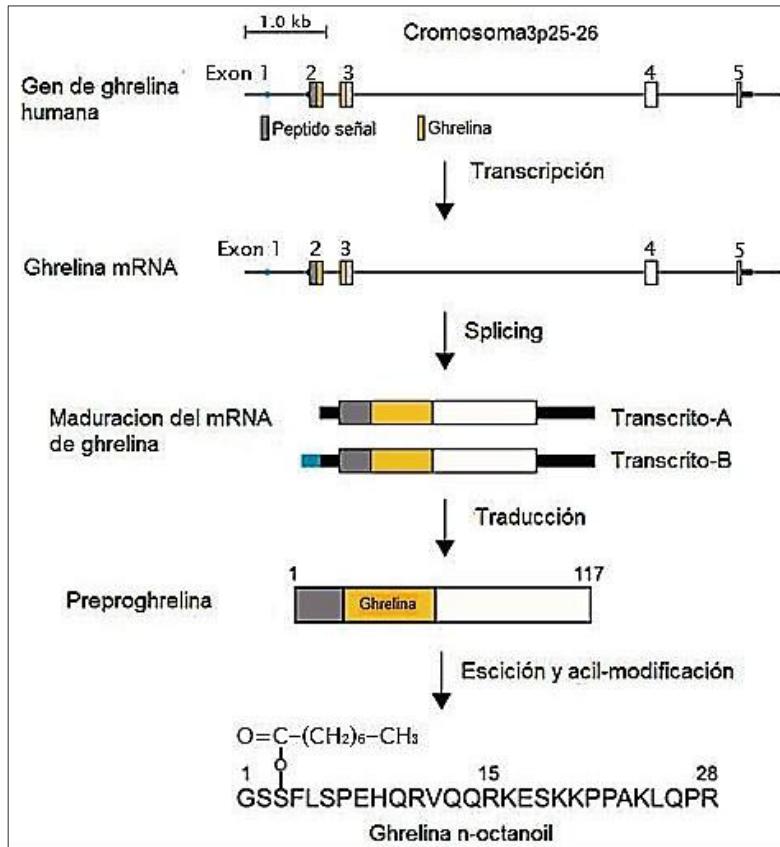


Figura 4. Síntesis de la ghrelina en la célula P/D del estómago.<sup>37</sup>

La ghrelina es producida principalmente en el estómago por las células X/A *like* en ratas y por las células P/D en humanos, contribuyendo con el 65% de la ghrelina circulante ya que también se sintetiza en el tracto gastrointestinal, tiroides, páncreas, riñones, pulmón, placenta, testículos, ovario, endometrio, miometrio, hipotálamo e hipófisis. La ghrelina es transportada a través del torrente sanguíneo unida a HDL y probablemente a albúmina.<sup>33-35,37-40</sup>

La ghrelina fue la primera hormona proteica en la que se identificó una modificación postraduccional a través de la unión de un ácido graso (proceso de acilación). El ácido graso (C8 o C10) se agrega al grupo hidroxilo de la serina de la posición tres por acción de la enzima ghrelina O-aciltransferasa (GOAT) (Fig. 5). Esta modificación permite la traslocación de la ghrelina hacia la barrera hematoencefálica, facilitando la interacción con su receptor hipotalámico para ejercer su acción biológica.<sup>40-43</sup>

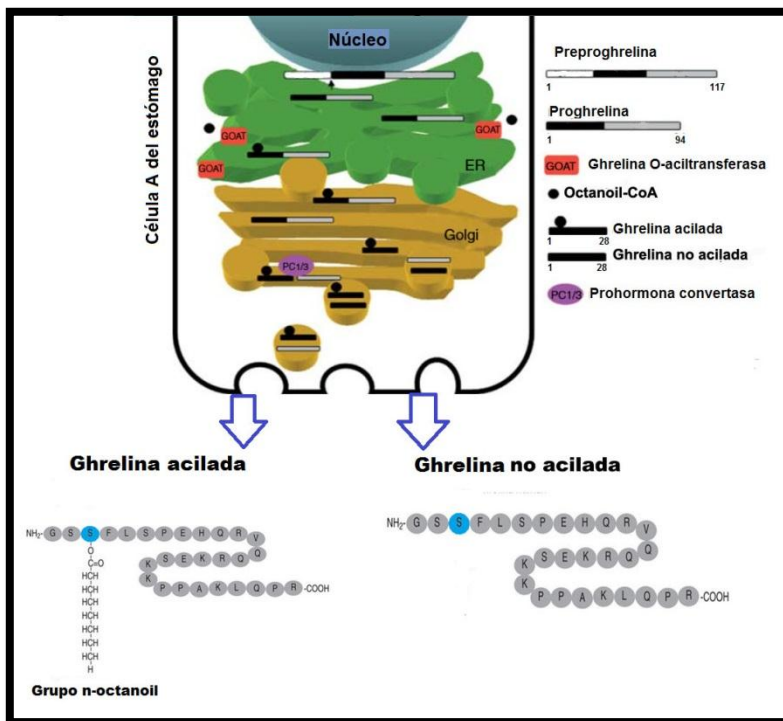


Figura 5. Proceso postraduccional en el que el péptido de ghrelina es acilado.<sup>43</sup>

La ghrelina acilada presenta algunas isoformas dependiendo del tipo de acilación, se le ha clasificado en cuatro tipos distintos: ghrelina 27aa octanoilada, ghrelina decanoilada, ghrelina 27aa decanoilada y ghrelina octanoilada. Todas estas formas están presentes tanto en estómago como en plasma de humanos. Si no se da el proceso de acilación se denomina ghrelina desacilada. Aproximadamente el 80-90% de la ghrelina en circulación se encuentra en forma desacilada. La vida media en plasma de la ghrelina acilada es de 9 a 13 minutos y la de la desacilada es de 27 a 31 minutos.<sup>37-40,44-45</sup>

La ghrelina se secreta de manera pulsátil y varía notablemente durante el día, con niveles más elevados antes de la ingesta de alimentos y disminuyendo después de la ingesta de manera proporcional a la carga de calorías ingeridas (Fig. 6).<sup>46</sup>

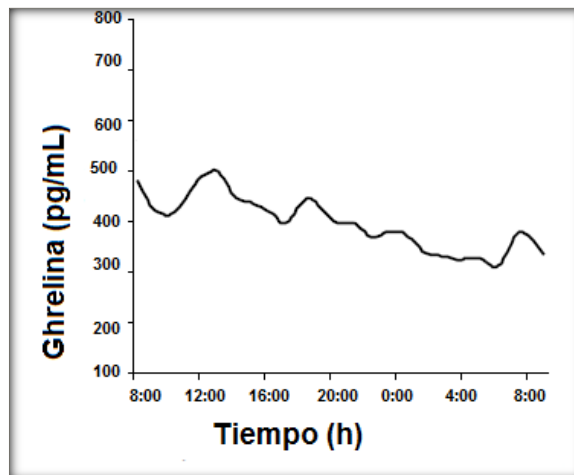


Figura 6. Ritmo circadiano de la ghrelina en humanos metabólicamente sanos.<sup>46</sup>

La principal función biológica de la ghrelina acilada es la liberación de la GH y la regulación del apetito a través del incremento en el núcleo arcuato de la expresión del neuropéptido Y (NPY) y del péptido similar a Agouti (AgRP)- potentes estimuladores de la ingesta- e inhibe neuronas productoras de proopiomelanocortina (POMC) y del transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART), los cuales son neuropéptidos anorexigénicos<sup>47</sup>. Se ha demostrado la existencia de una interacción antagónica de la ghrelina respecto a la leptina, la ghrelina tiene acción orexigénica mientras que la leptina tiene acción anorexigénica, por lo que ambas regulan de manera opuesta la expresión de NPY/ AgRP. La leptina se libera principalmente en el tejido adiposo y una de sus principales funciones es informar al hipotálamo de las reservas energéticas del tejido adiposo (Fig. 7).<sup>12-</sup>

14,48-50

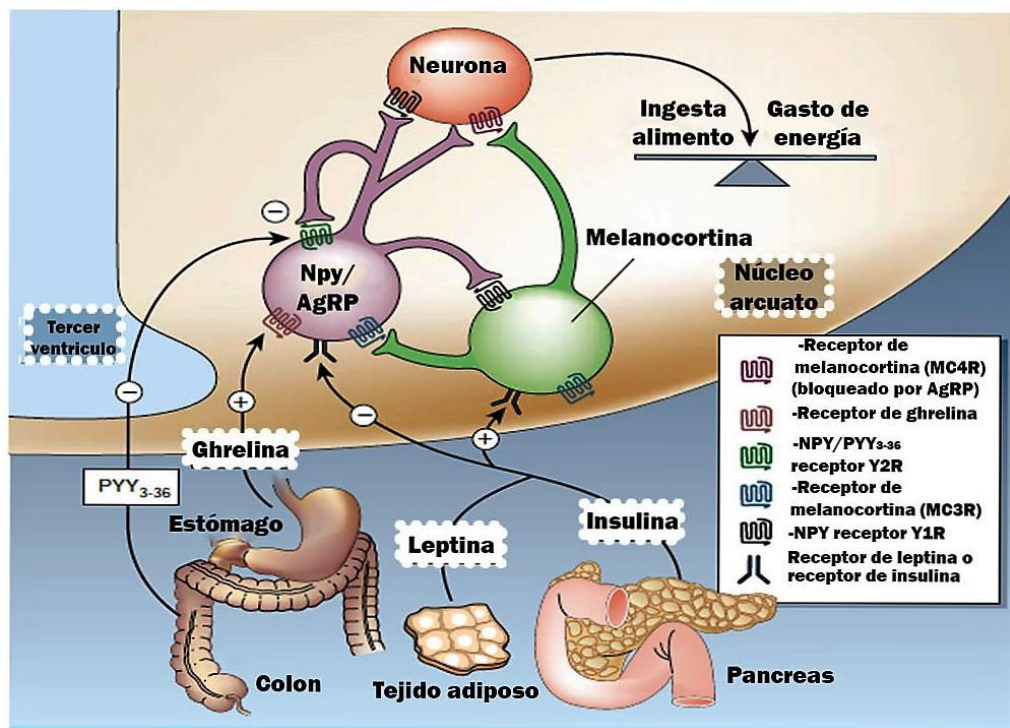


Figura 7. Acción del péptido YY (PYY), ghrelina, leptina e insulina sobre el hipotálamo para el control del apetito.<sup>49</sup>

La ghrelina además ejerce numerosas acciones en los ejes lactotrofo, corticotrofo, gonadotrofo y modula diversas acciones como motilidad gástrica, secreción de ácido gástrico, ciclo sueño vigilia, aprendizaje especial, memoria, estrés, ansiedad, metabolismo de lípidos y carbohidratos, suprime la termogénesis del tejido adiposo marrón, y mejora la función cardiovascular a través de la vasodilatación y la contractilidad cardíaca (Fig. 8).<sup>13-14,46-51</sup>



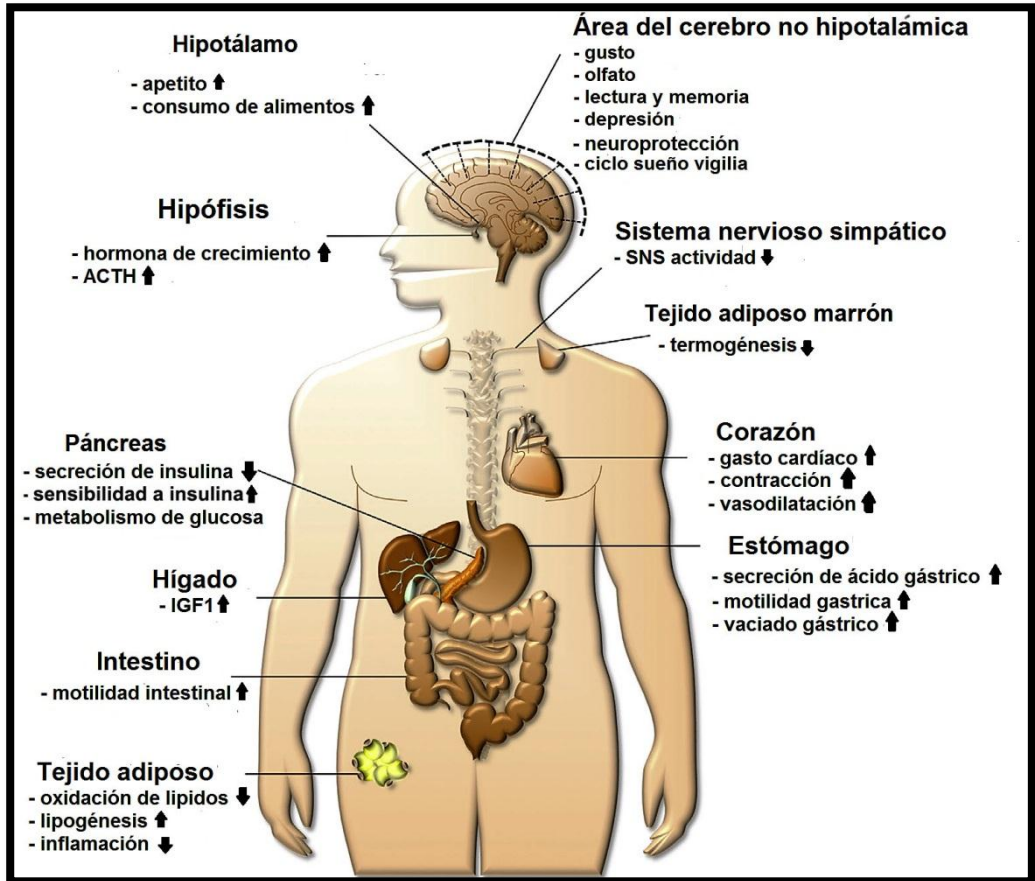


Figura 8. Acción de la ghrelina en diferentes órganos del cuerpo.<sup>51</sup>

Recientemente se ha propuesto que la ghrelina también ejerce un efecto apoptótico en carcinomas de mama, carcinoides y adenocarcinomas de pulmón y en neoplasias de tiroides.<sup>43</sup> Además, se le ha relacionado con aspectos inmunológicos ya que se expresa en linfocitos T y monocitos e inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y el TNF- $\alpha$ , posiblemente a través del bloqueo de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ .<sup>38,49-51</sup>

### **3.3.1. Regulación de la secreción de ghrelina**

Hasta este momento se desconoce el mecanismo que regula la secreción de ghrelina, sin embargo se ha propuesto que los nutrientes absorbidos, las hormonas gastrointestinales, los impulsos nerviosos y las hormonas pancreáticas determinan su expresión.<sup>42,44,52-53</sup>

#### **-Nutrientes:**

La glucosa por vía oral o intravenosa suprime los niveles de ghrelina y se ha sugerido que los metabolitos de la glucosa están implicados en la regulación de liberación de ghrelina.<sup>43</sup>

Los efectos de los aminoácidos (aa) en la secreción de ghrelina no han sido consistentes. Knerr y colaboradores encontraron que una mezcla de aa esenciales incrementaba los niveles de ghrelina, mientras que Overduin y Shrestha observaron que una mezcla de aa suprimía los niveles de ghrelina.<sup>54-56</sup>

La ingesta oral o la infusión intravenosa de lípidos, principalmente ácidos grasos de cadena larga suprimen los niveles de ghrelina plasmáticos. Los ácidos grasos de cadena media tienen el efecto contrario, incrementando los niveles de ghrelina acilada.<sup>57-58</sup>

#### **-Hormonas gastrointestinales:**

La somatostatina, el glucagón, la colecistoquinina, el PYY y el polipéptido pancreático (PP) suprimen la secreción de ghrelina,

mientras que el polipéptido inhibidor gástrico (GIP), la secretina y la gastrina estimulan su secreción.<sup>57-59</sup>

**-Sistema nervioso:**

La activación del sistema nervioso simpático a través de la epinefrina, norepinefrina y endotelina o a través del receptor del neuropéptido sensorial (CGRP) incrementa la secreción de ghrelina (Fig. 9).<sup>51</sup>

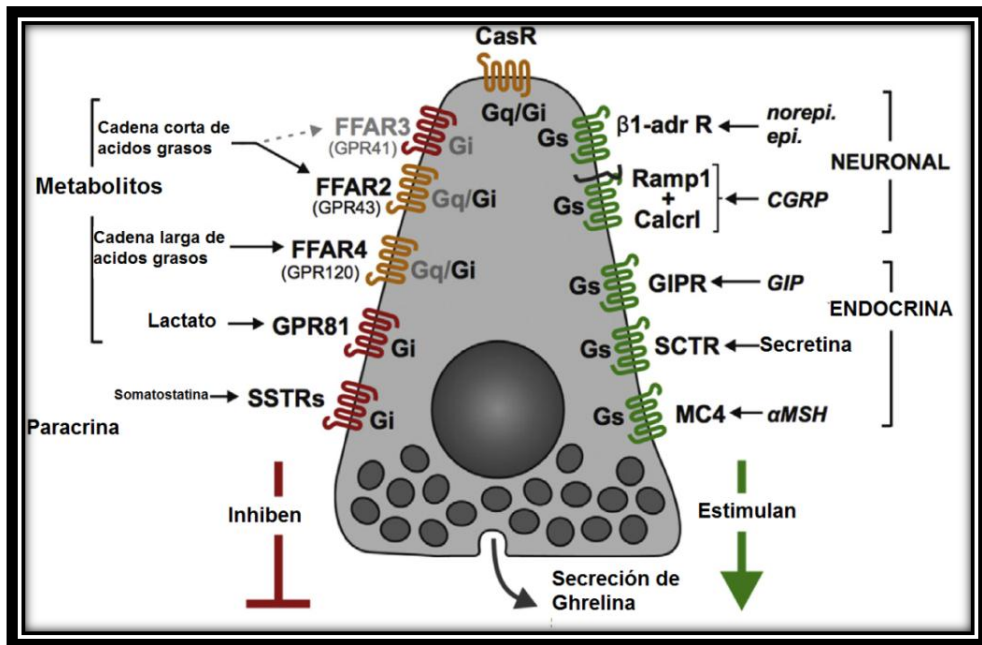


Figura 9. Vista esquemática de los receptores de la célula X/A del estómago que estimulan (en verde a la derecha) o inhiben (rojo o naranja a la izquierda y arriba) la secreción de ghrelina. La vía de señalización principal (Gas o Gai) para cada uno de los receptores se muestra en el interior de la célula<sup>51</sup>

### **-Hormonas pancreáticas:**

La insulina es considerada uno de los principales determinantes de la regulación de los niveles de ghrelina circulantes. Los cambios circadianos de los niveles de ghrelina se relacionan inversamente a los cambios de insulina, los cuales están disminuidos en el ayuno y se incrementan después de la ingesta de alimentos. Algunos autores sugieren que esta relación es causal: cuando se administra insulina a humanos o roedores la ghrelina disminuye, y animales deficientes de insulina tienen niveles elevados de ghrelina. Asimismo diversos estudios que utilizan la técnica de clamp (estándar de oro para el estudio de insulinoresistencia) han mostrado que la hiperinsulinemia suprime los niveles de ghrelina de manera independiente a los niveles de glucosa. Recientemente Gagnon y colaboradores mostraron que la insulina suprime directamente la secreción de ghrelina al activar la ruta PI3K- AKT y suprimir el AMPc intracelular.<sup>51</sup>

#### ***3.3.2. Acción de ghrelina en el equilibrio energético***

La ghrelina también es importante en la regulación de la homeostasis energética a largo plazo ya que induce un incremento del peso corporal estimulando la deposición de grasas. También se ha encontrado que la ghrelina promueve la adipogénesis. El efecto adipogénico de la ghrelina es realizado a través de la activación del receptor de peroxisoma proliferador activado  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), un receptor

nuclear cuya actividad se incrementa por componentes clave de la señalización de insulina, principalmente Akt/PKB y mTORC1.<sup>51, 58-59</sup>

Cuando la ingesta de nutrientes es abundante, los niveles de ghrelina disminuyen para prevenir la acumulación excesiva de sustratos energéticos, por lo que los niveles plasmáticos de ghrelina están disminuidos en personas obesas comparados con personas no obesas y hay una correlación inversa con el IMC. Se ha sugerido que la obesidad inducida por la dieta causa resistencia a la ghrelina mediante la reducción de la respuesta del NPY/ AgRP a la ghrelina y también suprime el eje neuroendocrino de la ghrelina como intento de limitar la ingestión de alimentos. Otros factores de la obesidad como la resistencia a la insulina y mayores niveles de leptina se han correlacionado negativamente con los niveles plasmáticos de ghrelina.<sup>60</sup>

### ***3.3.3. Ghrelina en embarazo***

Se ha descrito un incremento en los niveles de ghrelina en los primeros meses de embarazo y una disminución al final de la gestación. Palik y colaboradores<sup>7</sup> encontraron una elevación de ghrelina acilada en el segundo trimestre de embarazo y una disminución en el tercer trimestre, sugiriendo que el incremento de la ghrelina contribuía a un mayor apetito y a la ganancia de peso de la mujer embarazada. Fuglsang también describió un incremento de

ghrelina hasta la semana 18 de embarazo y posteriormente una disminución del 30% hasta el momento del parto.<sup>61</sup> Asimismo Makino<sup>62</sup> y Riedl<sup>12</sup> observaron menores concentraciones de ghrelina total durante las últimas semanas de embarazo al igual que Tham E<sup>9</sup>, quien encontró menor concentración de ghrelina acilada en el tercer trimestre de embarazo. Riedl observó además un incremento en los niveles de ghrelina del 300% en el posparto<sup>12</sup>. Estudios in vitro han mostrado que la ghrelina inhibe la secreción de insulina y estimula la utilización de glucosa en los adipocitos, por lo que se ha sugerido que la supresión de ghrelina durante el embarazo es necesaria para asegurar la RI de la gestación.<sup>10</sup> Además, se ha propuesto que la principal hormona de crecimiento durante la gestación, la hormona de crecimiento producida por la placenta (PGH) y su mediador, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) tienen un efecto negativo sobre la secreción de ghrelina.<sup>61-62</sup>

#### **3.3.4. Ghrelina en DMG**

La mayoría de los estudios han identificado niveles disminuidos de ghrelina en DMG comparados a los que se encuentran en el embarazo normal como consecuencia de la mayor RI<sup>7,11</sup>. La hiperinsulinemia se ha señalado como un factor inhibitor de la producción de ghrelina, así como las citocinas del tejido adiposo que están incrementadas en la DMG como TNF- $\alpha$  y resistina. Sin embargo en el estudio de Tham E,

se describieron niveles incrementados de ghrelina total y desacilada en DMG comparados con mujeres en embarazo normal, atribuyéndolo a que las pacientes evaluadas presentaban DMG moderada, es decir RI sin hiperinsulinemia.<sup>9</sup>

En el periodo posparto temprano, también se han encontrado menores niveles de ghrelina acilada y desacilada en mujeres con DMG previa<sup>8</sup> y recientemente a la ghrelina total se le propuso como un predictor de DM2. Lappas M y col. mostraron que niveles de ghrelina  $\leq 400$  pg/mL evaluados a las 12 semanas posparto se asociaban con un riesgo incrementado a desarrollar DM2 en el transcurso de 9 años de concluida la gestación.<sup>63</sup>

En estudios de hiperglicemia e hiperinsulinismo se han observado niveles disminuidos de ghrelina, sin embargo existe controversia en los niveles obtenidos en la DMG. Se desconoce cómo se encuentran los niveles en la población mexicana, por lo cual se determinaron los niveles de ghrelina y su relación con insulina y RI en el tercer trimestre de embarazo (cuando se presenta una mayor RI) y a las seis semanas posparto, ya que la DMG es un factor de riesgo para desarrollar DM2 y niveles bajos de ghrelina se han asociado a la aparición de DM2.<sup>7-8,10-</sup>

12

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La población de México presenta una mayor susceptibilidad genética a desarrollar DM2. Aunado a esto se ha observado un incremento en la frecuencia de obesidad en mujeres en edad reproductiva, lo cual les confiere un elevado riesgo para presentar DMG.

En la DMG hay una mayor resistencia a la insulina que en embarazo normal. Se ha sugerido que este incremento se asocia con la hormona lactógeno placentaria, el cortisol y diversas adipocinas como TNF- $\alpha$ , leptina y adiponectina. Recientemente se propuso que la ghrelina se asocia con secreción de insulina y con RI, sin embargo los estudios realizados en DMG son discordantes, por lo que se plantean las siguientes preguntas:

¿Cuáles serán los niveles de ghrelina en el embarazo y a las 6 semanas después del parto en mujeres con DMG y en mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa?

¿Existe una asociación entre los niveles de ghrelina y la resistencia a la insulina?



## 5. HIPOTESIS

- ❖ De acuerdo a lo reportado sobre los niveles de ghrelina en el embarazo y posparto suponemos que los niveles de ghrelina serán menores tanto en el embarazo como el posparto en mujeres con DMG comparadas con mujeres con TNG.
- ❖ De acuerdo a lo reportado en la literatura sobre la relación de la ghrelina con la RI, suponemos que su asociación será inversa.

## 6. OBJETIVOS

- Medir los niveles de ghrelina en el embarazo y 6 semanas después del parto en mujeres con DMG y en mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa.
- Identificar si existe asociación entre concentración de ghrelina y resistencia a la insulina en los dos grupos de estudio.

### 7.1. Población

Diseño: Estudio observacional, longitudinal, prospectivo, comparativo.

Universo: 49 mujeres embarazadas del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del CMN “La Raza”, IMSS divididas en dos grupos, integrados por 23 mujeres embarazadas con DMG y 26 mujeres embarazadas con TNG.

Criterios de selección:

- Criterios de inclusión: Mujeres con DMG diagnosticadas por una prueba de tolerancia oral a la glucosa de 2 h con carga de 75 g de glucosa a las 24-36 semanas de gestación y mujeres con embarazo normotenso y euglucémico.

- Criterios de exclusión: Las participantes con alguna enfermedad concomitante como hipertensión crónica, preeclampsia, trastornos tiroideos y enfermedad renal.

-Criterios de eliminación: Todas aquellas pacientes que no asistieran a sus evaluaciones programadas.

### 7.2. Variables

Variables independientes: estado glucémico DMG, TNG.

Variables dependientes: niveles de ghrelina, resistencia a la insulina.

### **7.3. Técnicas**

A todas las mujeres embarazadas que cumplían con los criterios de selección se les invito a participar en el proyecto y aquellas que aceptaron se les solicito firmar una carta de consentimiento informado, siguiendo la declaración de Helsinki (Edimburgo, 2000) (Anexo 1).

A las participantes se les aplicó un cuestionario semiestructurado para registrar sus medidas antropométricas, antecedentes familiares, obstétricos y médicos (Anexo 2). El índice de masa corporal se calculó como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros.

Se realizaron dos tomas de muestra de sangre venosa; la primera en el periodo de 24 a 36 semanas de gestación y la segunda a las seis semanas posparto y fueron tomadas por la mañana entre las 7:30 y 8:30 am después de un ayuno de 10 horas, de la vena ante-cubital en tubos vacutainer con anticoagulante de citrato de sodio y sin anticoagulante. La toma de las muestras se realizó en la Unidad de Alta Especialidad Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 La Raza del IMSS y se procesaron en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Diabetes y Metabolismo, CMN Siglo XXI IMSS.

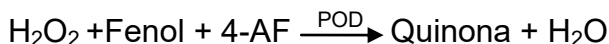
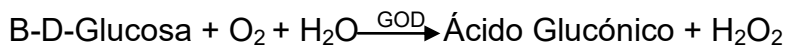
La sangre se centrifugó a 400g por quince minutos y se separó el suero que se utilizó para las pruebas de glucosa, colesterol total y

triglicéridos, los cuales se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos. Del plasma se realizaron alícuotas y se conservaron a -70°C hasta la medición de los niveles de ghrelina e insulina por técnica de RIA (Anexo 3) .

### **7.3.1. Glucosa método enzimático (GOD-POD)**

Principio del método.

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido, se detecta mediante un receptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra analizada (suero).<sup>64</sup>

Reactivos.

Todos los reactivos estaban listos para su uso, de la marca SPINREACT.

**R** (TRIS pH 7.4 92mmol/L, Fenol 0.3mmol/L, Glucosa oxidasa 15000 U/L, Peroxidasa 1000 U/IL, 4-Aminofenazona (4-AF) 2.6 mmol/L).

**GLUCOSA CAL** Patrón primario acuoso de glucosa 100mg/dl

Procedimiento.

1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda..... 505nm (490-550)

Cubeta..... 1cm de paso de luz

Temperatura..... 37°C/15-25°C

2. Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3. En tres cubetas se pipeteó 1mL de R, a una se le agregaron 10 µL de patrón, a otra 10µL de muestra, la última se leyó como blanco de reactivo.

4. Se mezcló e incubo 10 min a 25°C

5. Se leyó la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo.

6. Se calculó la concentración.

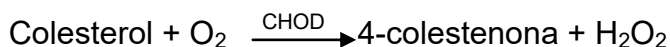
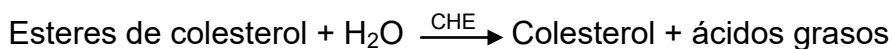
Valores de referencia:

60 – 110 mg/dL

### **7.3.2. Colesterol método enzimático (CHOD-POD)**

Principio del método.

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra analizada (suero).<sup>65</sup>

## Reactivos.

Todos los reactivos estaban listos para su uso, de la marca SPINREACT.

**R** (PIPES pH 6.9 90mmol/L, Fenol 26mmol/L, Colesterol estearasa (CHE) 1000 U/L, Colesterol oxidasa (CHOD) 300 U/L, Peroxidasa (POD) 650 U/L, 4-Aminofenazona (4-AF) 0.4mmol/L).

**CHOLESTEROL CAL** (Patrón primario acuoso de Colesterol 200 mg/dL).

## Procedimiento.

### 1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda..... 505nm (500-550)

Cubeta..... 1cm de paso de luz

Temperatura..... 37°C/15-25°C

2. Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. En tres cubetas se pipeteó 1mL de R, a una se le agregaron 10 µL de patrón, a otra 10µL de muestra, la última se leyó como blanco de reactivo.
4. Se mezcló e incubó 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C
5. Se leyó la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo.
6. Se calculó la concentración.

Valores de referencia para evaluación de riesgo:

Menos de 200 mg/dL normal

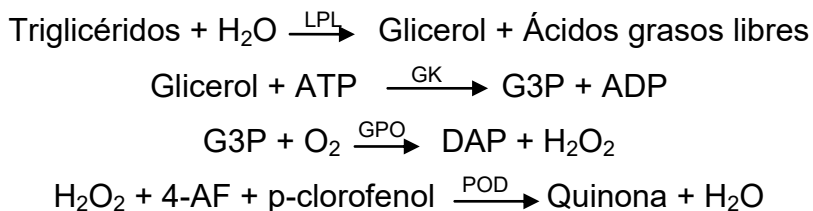
200 – 239 mg/dL	moderado
240 mg/dL o más	alto

### 7.3.3 Triglicéridos método enzimático (GPO-POD)

Principio del método.

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por GPO.

Al final el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra analizada (suero).<sup>66</sup>

Reactivos.

Todos los reactivos estaban listos para su uso y eran de la marca Principio del método.



En nuestro caso usamos el inmunoensayo de tipo competitivo en el cual un antígeno no marcado (insulina) presente en las muestras obtenidas y calibradores compite con una cantidad fija de antígeno marcado (insulina) con  $I^{125}$  por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo (anti-insulina). La concentración del antígeno en la muestra es inversamente proporcional a la radiactividad medida en los tubos. Se obtiene una curva inversamente proporcional entre la concentración de los estándares de la hormona y el porcentaje de unión en la que se interpola el valor obtenido en porcentaje de unión de cada muestra para conocer la concentración.

#### SPINREACT.

**R** (GOOD pH 6.3 50mmol/L, p-clorofenol 2mmol/L, Lipoprotein lipasa (LPL) 150000 U/L, Glicerol quinasa (GK) 500 U/L, Glicerol-3-oxidasa (GPO) 3500 U/L, Peroxidasa (POD) 400 U/L, 4-Aminofenazona (4-AF) 0.1mmol/L, ATP 0.1mmol/L).

#### **TRIGLYCERIDES CAL** (Calibrador primario de Triglicéridos).

Procedimiento.

1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda..... 505nm (490-550)

Cubeta..... 1cm de paso de luz.

Temperatura..... 37°C/15-25°C.

2. Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3. En tres cubetas se pipeteó 1mL de R, a una se le agregaron 10  $\mu$ L de patrón, a otra 10 $\mu$ L de muestra, la última se leyó como blanco de reactivo.
4. Se mezcló e incubó 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C
5. Se leyó la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo.
6. Se calculó la concentración.

Valores de referencia:

Hombres 40 --160 mg/dL

Mujeres 35 – 135 mg/dL

#### **7.3.4 Ghrelina por técnica de RIA.**

Principio del método.

En nuestro caso usamos el inmunoensayo de tipo competitivo en el cual un antígeno no marcado (ghrelina) presente en las muestras obtenidas y calibradores compite con una cantidad fija de antígeno marcado (ghrelina) con I<sup>125</sup> por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo (anti-ghrelina). La concentración del antígeno en la muestra es inversamente proporcional a la radiactividad medida en los tubos. Se obtiene una curva inversamente proporcional entre la concentración de los estándares de la hormona y el porcentaje de unión en la que se interpola el valor obtenido en porcentaje de unión de cada muestra para conocer la concentración.

## Reactivos.

Kit de RIA específico para ghrelina total (Cat.#GHRT-89HK) marca MILLIPORE.

Buffer de ensayo ghrelina total (fosfato 0.01M, EDTA 0.01M, azida de sodio 0.08%, pH 8.5), anticuerpo de ghrelina total (suero de conejo con anti-ghrelina en buffer de ensayo), buffer de hidratación de ghrelina marcada (0.025% de triton-X 100 e Ig-G normal de conejo como portador), I<sup>125</sup>-ghrelina (ghrelina marcada con I<sup>125</sup>, purificada por HPLC, liofilizada), estándar de ghrelina total (ghrelina liofilizada en buffer de fosfato de sodio), controles 1 y 2 de ghrelina (ghrelina liofilizada control bajo: 421-881 pg/mL, control alto: 1000-2077 pg/mL), reactivo precipitante (Goat anti-rabbit Ig-G serum, PEG 3% y 0.05% triton-X 100 en solución salina 0.05M, EDTA 0.025M, azida de sodio 0.08%).

### Preparación de ghrelina marcada con I<sup>125</sup>

Se adicionó el buffer de hidratación de ghrelina marcada al vial con el liofilizado y se hidrató a temperatura ambiente por 30 minutos, mezclando ocasionalmente (día dos del inmunoensayo).

### Preparación de estándar de ghrelina

Se reconstituyó con 2 mL de agua destilada y deionizada, se invirtió, mezclo hasta su completa disolución y se dejó reposar por 5 minutos.

Se etiquetaron 6 tubos y se les adiciono 0.5 mL de buffer de ensayo. Se realizó una serie de diluciones que se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3. Diluciones de solución estándar de ghrelina.

Tubo	Volumen de buffer de ensayo (mL)	Volumen de estándar (mL)	Concentración de estándar (pg/mL)
1	0.5	0.5 de estándar reconstituido	3750
2	0.5	0.5 del tubo 1	1875
3	0.5	0.5 del tubo 2	937.5
4	0.5	0.5 del tubo 3	468.75
5	0.5	0.5 del tubo 4	234.375
6	0.5	0.5 del tubo 5	117.19

Preparación de los controles 1 y 2 de ghrelina total.

Se reconstituyeron con 1 mL de agua destilada y desionizada, se mezcló y dejo reposar por 5 minutos, se mezcló hasta su disolución.

Procedimiento:

1. Se pipeteó buffer de ensayo: 300  $\mu$ L en los tubos (3-4) de unión no especifica (NSB), 200  $\mu$ L en los tubos (5-6) de referencia (BR), 100  $\mu$ L desde el tubo 7 hasta el 126.
2. Se pipetearon 100  $\mu$ L de estándar o controles por duplicado a partir del tubo 7 hasta el 24.
3. Se pipetearon 100  $\mu$ L de muestra por duplicado a partir del tubo 25.

4. Se pipeteó 100  $\mu$ L de anticuerpo de ghrelina a todos los tubos excepto a los tubos de la cuenta total (1-2) y a los de unión no específica (3-4).
5. Se mezclaron, cubrieron e incubaron de 20 a 24 horas a 4° C.
6. Se hidrató la ghrelina marcada con  $I^{125}$  y se pipetearon 100 $\mu$ L a todos los tubos.
7. Se mezclaron, cubrieron e incubaron de 22 a 24 horas a 4° C.
8. Se adicionó 1.0 mL de reactivo precipitante a 4°C a todos los tubos excepto a los de la cuenta total (1-2).
9. Se mezclaron e incubaron a 4°C por 20 minutos.
10. Se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 2500 xg.
11. Se decantó el sobrenadante de todos los tubos excepto de los tubos de la cuenta total (1-2) se dejaron escurrir y los tubos dejando solo el pellet donde se contó la radiación absorbida en un contador gamma.

Valores de referencia:

Adultos de peso normal	520 - 700 pg / mL
Adultos con obesidad	340 - 450 pg / mL
Adultos con obesidad y tratamiento dietético	450 - 600 pg / mL

### **7.3.5. Insulina por técnica de RIA.**

Principio del método.

En nuestro caso usamos el inmunoensayo de tipo competitivo en el cual un antígeno no marcado (insulina) presente en las muestras obtenidas y calibradores compite con una cantidad fija de antígeno marcado (insulina) con  $I^{125}$  por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo (anti-insulina). La concentración del antígeno en la muestra es inversamente proporcional a la radiactividad medida en los tubos. Se obtiene una curva inversamente proporcional entre la concentración de los estándares de la hormona y el porcentaje de unión en la que se interpola el valor obtenido en porcentaje de unión de cada muestra para conocer la concentración.

#### Reactivos.

Todos los reactivos eran del Kit de RIA específico para Insulina Humana (Cat. # HI-14K) Marca MILLIPORE.

Buffer de ensayo (fosfatasa alcalina 0.05M pH 7.4, contiene EDTA 0.025M, azida sódica al 0.08%), anticuerpo insulina humana (anticuerpo específico de cobayo anti-insulina humana en buffer de ensayo),  $^{125}I$ -insulina ( $^{125}I$ -insulina marcada, purificada por HPLC. liofilizada para estabilizar), buffer de hidratación (buffer de ensayo, contiene suero de cobayo. Usado para hidratar la hormona marcada), estándar de insulina humana (insulina humana recombinada purificada, contenida en buffer de ensayo), controles 1 y 2 (insulina humana recombinada purificada, contenida en buffer de ensayo), agente precipitante (suero de cabra con IgG anti-cobayo, fosfatasa

alcalina 0.05M, EDTA 0.025M, azida de sodio al 0.08%, triton X-100 al 0.05% y PEG al 3%).

Preparación de estándar.

Se etiquetaron 6 tubos y se les adiciono 1.0 mL de buffer de ensayo.

Se realizó una serie de diluciones que se muestran en el cuadro 4:

Cuadro 4. Diluciones de estándar de Insulina.

Tubo #	Volumen de buffer de ensayo (mL)	Volumen de estándar (mL)	Concentración de estándar ( $\mu\text{U}/\text{mL}$ )
1	1.0	1.0 estándar de 200 $\mu\text{U}/\text{mL}$	100
2	1.0	1.0 del tubo 1	50
3	1.0	1.0 del tubo 2	25
4	1.0	1.0 del tubo 3	12.5
5	1.0	1.0 del tubo 4	6.25
6	1.0	1.0 del tubo 5	3.125

Procedimiento.

1. Se pipeteó buffer de ensayo: 300  $\mu\text{L}$  en los tubos (3-4) de unión no especifica (NSB), 200  $\mu\text{L}$  en los tubos (5-6) de referencia (BR), 100  $\mu\text{L}$  desde el tubo 7 hasta el 126.
2. Se pipetearon 100  $\mu\text{L}$  de estándar o controles por duplicado a los tubos del 7 hasta el 24.

3. Se pipetearon 100  $\mu\text{L}$  de muestra por duplicado a partir del tubo 25.
4. Se hidrató la insulina marcada con  $\text{I}^{125}$  y se pipetearon 100 $\mu\text{L}$  a todos los tubos.
5. Se pipeteó 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de insulina a todos los tubos excepto a los tubos de la cuenta total (1-2) y a los de unión no específica (3-4).
6. Se mezclaron, cubrieron e incubaron de 20 a 24 horas a 4° C.
7. Se adicionó 1.0 mL de reactivo precipitante a 4°C a todos los tubos excepto a los de la cuenta total (1-2).
8. Se mezclaron e incubaron a 4°C por 20 minutos.
9. Se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 2000 xg.
10. Se decantó el sobrenadante de todos los tubos excepto de los tubos de la cuenta total (1-2) se dejaron escurrir de 15 a 60 segundos los tubos, dejando solo el pellet donde se contó la radiación absorbida en un contador gamma.

Valores de referencia: 5 – 15  $\mu\text{U/ml}$

### **7.3.6. Resistencia a la insulina**

El grado de resistencia a la insulina se estimó por medio del modelo homeostático para la evaluación de resistencia a la insulina (HOMA-RI).<sup>69</sup>

$$\text{HOMA-RI} = \frac{\text{Insulina en ayunas} \left( \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) \times \text{glucosa} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \right)}{22.5}$$



### **7.3.7. Medidas antropométricas.**

A todas las participantes se les tomaron las medidas antropométricas para la determinación del IMC, las cuales se obtuvieron con el siguiente protocolo:

- **Peso:** Las mujeres fueron pesadas con bata clínica en la báscula del estadiómetro de la marca BAME.
- **Talla:** Las mujeres se colocaron con los talones juntos, glúteos, hombros y cabeza en contacto con el estadiómetro, los ojos mirando al frente y en el plano de Frankfurt paralelo al suelo.
- **IMC:** Se obtuvo a través de la razón peso dividido por el cuadrado de la estatura ( $\text{Kg/m}^2$ ).

### **7.4. Diseño estadístico**

Se realizó la prueba de normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk y se encontró que no tenían una distribución normal por lo que los datos fueron expresados con la mediana y rangos intercuartílicos. La comparación de variables cualitativas dicotómicas se hizo con la prueba de chi cuadrada y las variables cuantitativas se

compararon entre los dos grupos de estudio con la prueba U de Mann-Whitney y entre embarazo y posparto con la prueba de Wilcoxon. La relación entre las variables se evaluó con la correlación de Spearman. Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics versión 21.

### 8.1. Seguimiento de los grupos de estudio.

En la figura 10 se muestra el seguimiento realizado a las mujeres del estudio.

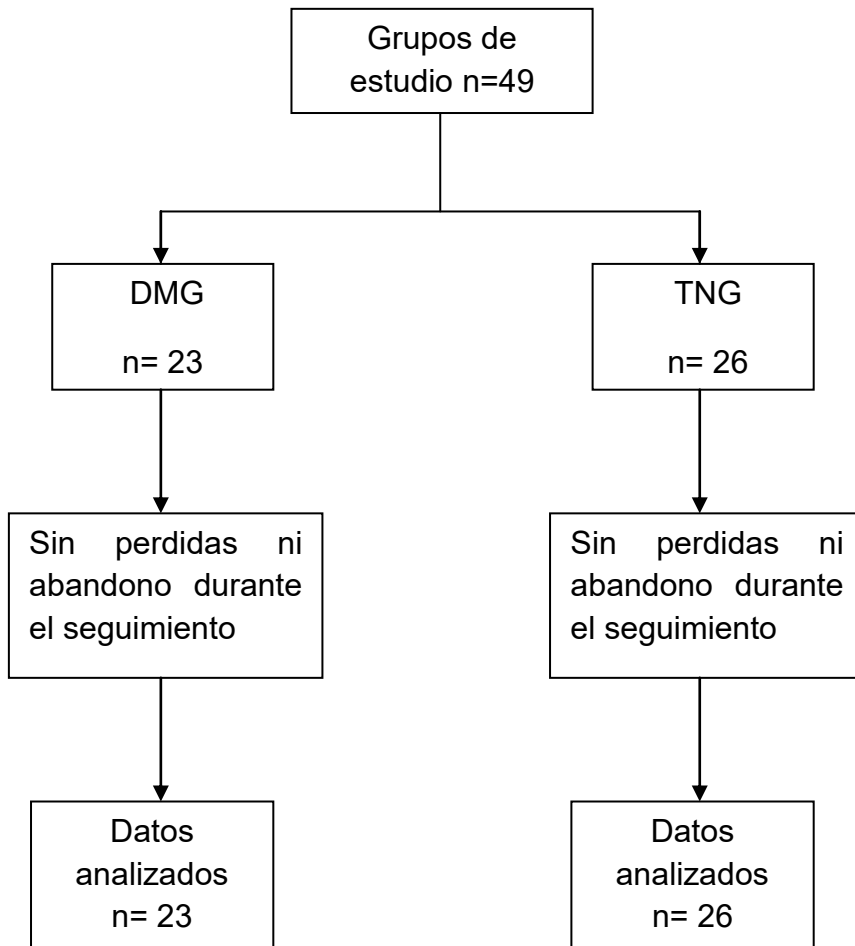


Figura 10. Diagrama de seguimiento de las mujeres con DMG y TNG en embarazo y seis semanas posparto.

## **8.2. Características antropométricas y obstétricas de las mujeres previas al embarazo.**

Las principales características previas al embarazo de los dos grupos de estudio se muestran en el cuadro 5. Se observó que las mujeres con DMG tenían mayor edad, peso, IMC previo a la gestación, además de presentar una mayor proporción de familiares directos con DM2 que el grupo de embarazadas con TNG. En cuanto a los antecedentes de DMG y paridad no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

Cuadro 5. Características antropométricas y obstétricas de las participantes previas al embarazo.

Característica	DMG (n= 23)	Tolerancia normal a la glucosa (n= 26)	P
Edad (años)	33.0 (27.0–36.0)	24.0 (18.8-28.5)	<0.001
Peso (kg)	70.3 (61.5-80.0)	56.0 (52.0-64.0)	<0.001
Talla (m)	1.55 (1.50-1.59)	1.55 (1.49-1.60)	0.943
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.5 (26.6-32.4)	23.0 (19.5-25.3)	<0.001
Familiares con DM2 n(%)	14 (60.9)	6 (23.1)	<0.05
DMG previa n(%)	3 (13)	0	0.057
Paridad n(%)			
0	4 (17.4)	11 (42.3)	0.059
1 o más.	19 (82.6)	15 (57.7)	

Las variables continuas se muestran como mediana y rango intercuartílico y las variables categóricas como número y porcentaje. Prueba de U de Mann-Whitney para variables cuantitativas y  $\chi^2$  para variables cualitativas presentadas en porcentaje

### **8.3. Características antropométricas y bioquímicas en el tercer trimestre de embarazo y seis semanas posparto.**

Las características de las mujeres en el tercer trimestre de embarazo y seis semanas posparto se muestran en el cuadro 6. Durante el tercer trimestre de embarazo las mujeres con DMG tuvieron mayor peso, IMC, glucosa, triglicéridos e insulina que el grupo control. En el posparto de los dos grupos de estudio disminuyeron el peso, el IMC y los triglicéridos; el colesterol únicamente disminuyó en el grupo control. Por el contrario, los niveles de glucosa y ghrelina incrementaron en ambos grupos. La ghrelina incrementó 106% en las mujeres con DMG y 128% en el grupo control (Fig. 11).

Cuadro 6. Características antropométricas y bioquímicas de las participantes durante el embarazo y seis semanas posparto.

	Tolerancia normal a la glucosa		DMG	
	Tercer trimestre de gestación	Seis semanas posparto.	Tercer trimestre de gestación	Seis semanas posparto.
Peso (kg)	64.9 (60.3 – 73.5)*	59.0 (56.3-71.5)	77.0 (69.1-84.0)*+	68.0 (61.5-75.0)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26.6 (23.2 – 29.4)*	23.9 (18.5-28.1)	32.9 (29.5-34.0)*+	29.0(25.6-31.6)+
Glucosa (mg/dL)	68.6 (62.6-77.1)*	75.1 (65.0-80.0)	97.0 (80.3-117.6)*+	108.9 (94.8-121.7)+
Colesterol (mg/dL)	253.2(210.7-313.5)*	208.3 (161.5-240)	247.6 (230.2–282.8)	234.7(212.1-284.3)
Triglicéridos(mg/dL)	221.7(160.5-310.5)*	109.9 (86.0-184.7)	316.7(232.7-426.3)*+	185.2 (117.8-228.1)+

Los datos se muestran como medianas y rango intercuartílico. Prueba de Wilcoxon embarazo- posparto

\*P<0.05, prueba U de Mann-Whitney DMG-TNG + P<0.05.

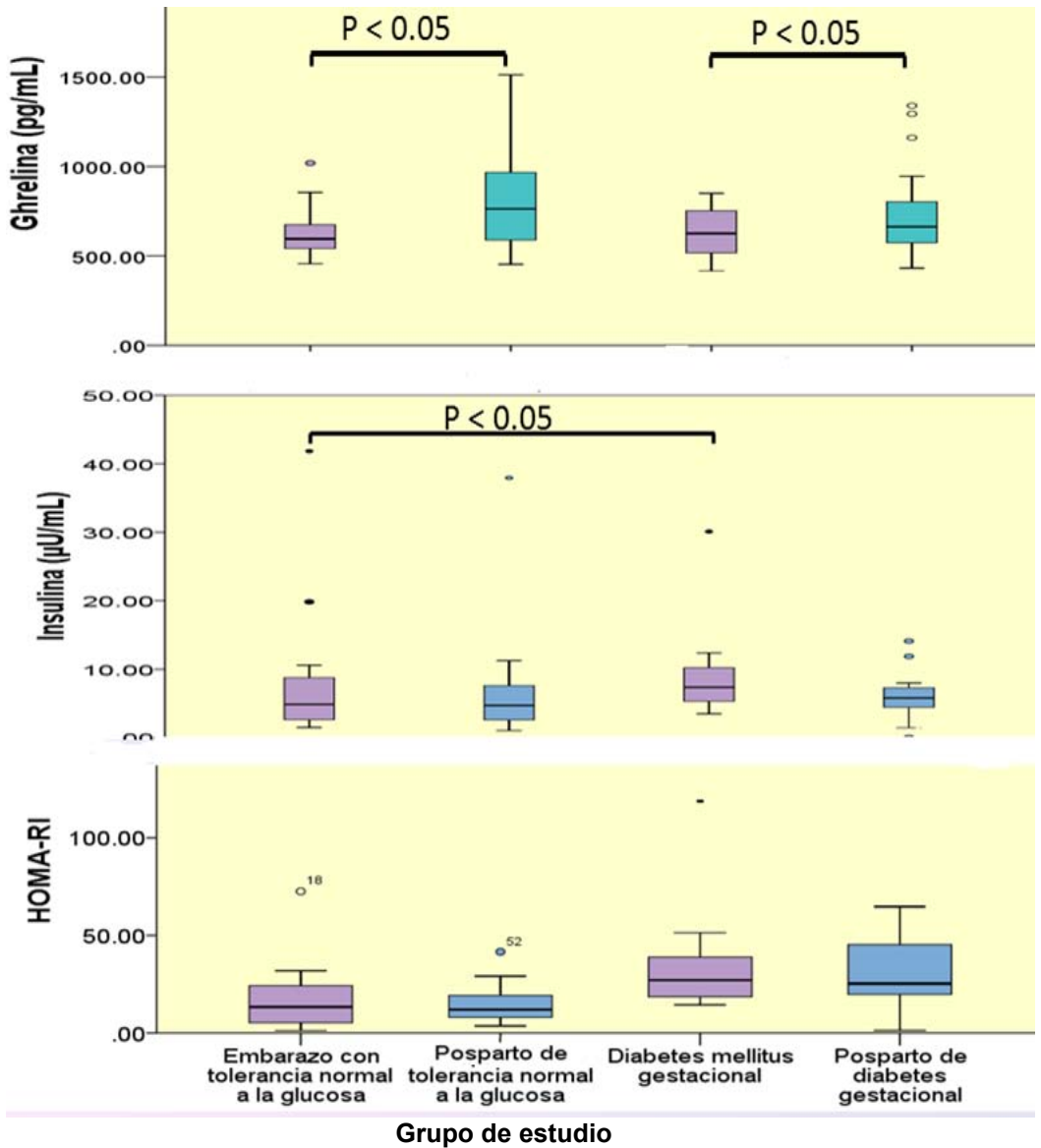


Figura 11. Comparación de ghrelina, insulina y RI durante el tercer trimestre de embarazo y 6 semanas posparto en DMG y TNG.



#### **8.4. Asociación de ghrelina con otras variables.**

No se encontró asociación entre ghrelina y la RI, insulina y glucosa en el embarazo y posparto de los dos grupos de estudio (cuadro 7).

En el análisis de correlación de ghrelina se encontró una asociación negativa con el peso de las mujeres con DMG en el embarazo y con el IMC a las seis semanas posparto. Asimismo en el grupo de mujeres embarazadas con TNG se observó una asociación negativa entre ghrelina e IMC (Fig. 12).

Por otra parte no se encontró asociación del peso con ghrelina en el embarazo de mujeres con TNG ( $r -0.368$ ,  $P 0.059$ ) y en el periodo de posparto en las mujeres con DMG ( $r -0.227$ ,  $P 0.298$ ) y con TNG ( $r -0.109$ ,  $P 0.613$ ). Tampoco se encontró asociación entre el IMC y la ghrelina en el embarazo de las mujeres con DMG ( $r 0.305$ ,  $P 0.157$ ) y en las mujeres con TNG a las seis semanas posparto ( $r -0.091$ ,  $P 0.647$ ).

Cuadro 7. Análisis de correlación de ghrelina con glucosa, insulina y resistencia a insulina durante el embarazo y posparto en cada grupo de estudio.

	Ghrelina							
	TNG				DMG			
	Embarazo		Posparto		Embarazo		Posparto	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Glucosa	- 0.222	0.265	0.095	0.657	0.005	0.958	0.180	0.412
Insulina	- 0.219	0.340	0.182	0.572	0.203	0.505	- 0.203	0.505
HOMA-RI	- 0.027	0.894	0.057	0.773	0.282	0.192	0.098	0.655

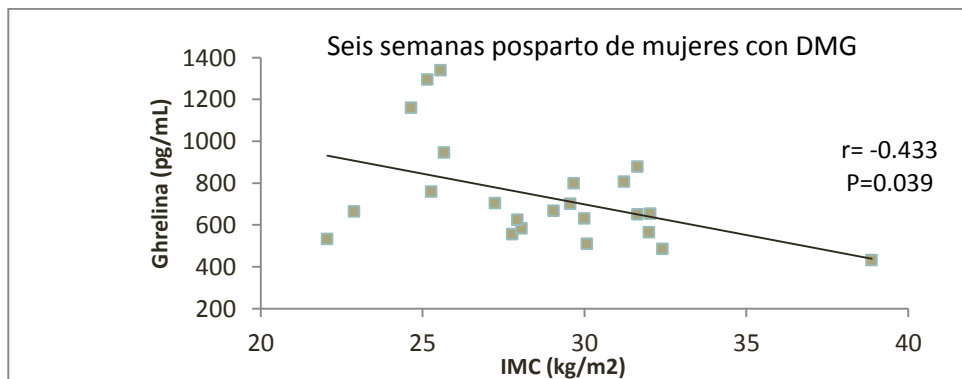
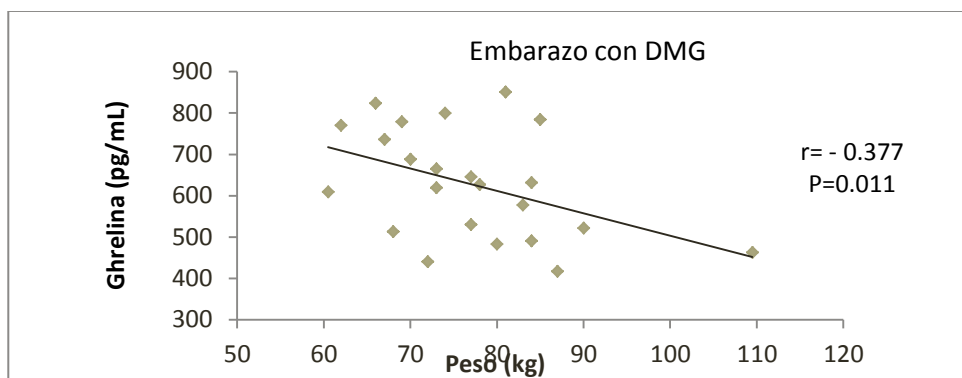
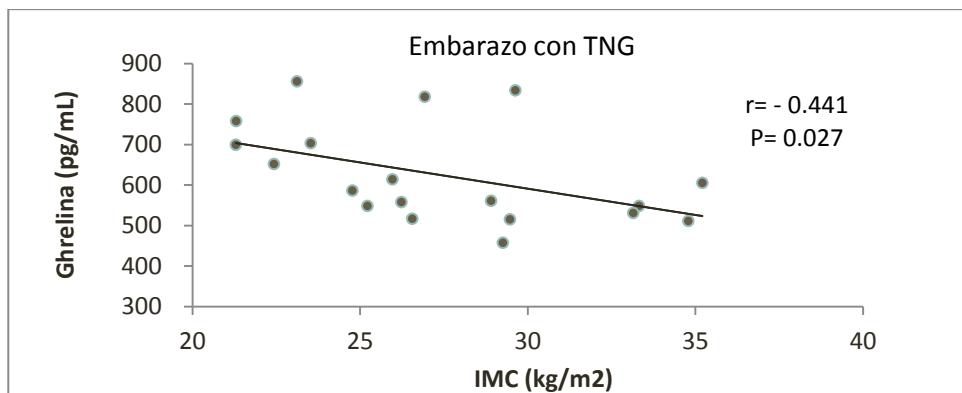


Figura 12. Asociación de ghrelina con peso e IMC en el tercer trimestre de embarazo y a las seis semanas posparto.

Previo al embarazo, las mujeres del grupo con DMG presentaban diversos factores de riesgo para el desarrollo de este padecimiento como: mayor edad, peso, IMC y una mayor predisposición genética (familiares de primer grado con DM2) en comparación con el grupo control. Estos factores de riesgo también son importantes para el desarrollo de DM2.<sup>69</sup>

Al realizar el análisis antropométrico en el tercer trimestre de gestación se observó un mayor peso e IMC en el grupo con DMG que en el grupo con TNG lo que refleja el elevado grado de sobrepeso/obesidad con el que las mujeres iniciaron el embarazo. Sin embargo, la ganancia de peso durante la gestación en las mujeres con DMG fue en promedio 4.8 kg y en el grupo control 8.3 kg. Recientemente, el Instituto de Medicina de Estados Unidos y el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos, en base a diversos estudios que han mostrado la asociación de la obesidad materna con diversas complicaciones como preeclampsia, hipertensión gestacional, DMG y hemorragia obstétrica, señalaron que el incremento de peso durante el embarazo se debe basar en el IMC con que una mujer inicia el embarazo, a mayor IMC menor número de kilogramos adquiridos en la gestación. De tal manera que se advierte un buen control obstétrico del peso de las participantes.<sup>70</sup>

Asimismo las mujeres con DMG presentaron mayores niveles de glucosa, triglicéridos e insulina que el grupo control. En la DMG hay una mayor resistencia a la insulina que en las embarazadas con tolerancia normal a la glucosa, por lo tanto la célula beta secreta mayor insulina para tratar de compensar dicha resistencia. La resistencia a los efectos de la insulina lleva a una disminución en la captación de glucosa por el tejido adiposo y el músculo y a un incremento en la liberación de glucosa hepática acompañada de una mayor liberación de ácidos grasos a la circulación.<sup>70-74.</sup>

En relación a los niveles de ghrelina durante el embarazo, estos fueron similares en los dos grupos de estudio y no se asociaron con los niveles de insulina ni con la RI, de manera similar a lo obtenido por Riedl M.<sup>12</sup> Por el contrario, otros estudios han mostrado menor nivel de ghrelina en DMG que en embarazo normal como consecuencia de mayor RI<sup>7,11</sup>, por la hiperinsulinemia y por una mayor secreción de adipocinas como TNF- $\alpha$  y resistina, los cuales son factores inhibidores de la producción de ghrelina. Las razones de la discrepancia entre los distintos estudios se han explicado por diferencias en las poblaciones, al tamaño de muestra y al método utilizado para la determinación de ghrelina.

La DMG se ha considerado una manifestación temprana de la DM2, por lo que su estudio ha permitido la valoración longitudinal de diversos parámetros metabólicos que llevan a la DM2. De ahí nuestro

interés en la evaluación de las mujeres en el posparto. Los dos grupos de estudio disminuyeron el peso y triglicéridos; el colesterol únicamente disminuyó en el grupo de mujeres con tolerancia normal a la glucosa. Durante el embarazo, el colesterol favorece la síntesis de hormonas esteroideas placentarias como progesterona, estradiol y testosterona, las cuales participan en el crecimiento fetal y en el mantenimiento del equilibrio madre-placenta-feto. También hay un aumento en la lipólisis debido al requerimiento de lípidos que ayudan a la compensación de la demanda de ácidos grasos libres que requiere el feto para crecer. Es probable que las mujeres con DMG tuvieran un largo periodo de sobrepeso/obesidad antes del embarazo acompañado de una alteración en el metabolismo de lípidos, por lo que persisten altos los niveles de colesterol en el posparto.<sup>16, 41</sup>

Por el contrario, el nivel de glucosa incrementó en ambos grupos. A este respecto se ha señalado que el aumento en el consumo de glucosa por el feto y la placenta provoca niveles bajos en la mayoría de las mujeres embarazadas. En relación a la insulina y RI no se encontró una diferencia significativa en el posparto de ambos grupos pero se observa una tendencia de disminución.

La ghrelina incrementó 106% en las mujeres con DMG y 128% en el grupo control. Similar a lo obtenido por Riedl M. quien encontró un incremento en los niveles de ghrelina del 300% en el posparto<sup>12</sup>. Se ha sugerido que la supresión de ghrelina durante el embarazo es

necesaria para asegurar la RI de la gestación. Estudios in vitro han mostrado que la ghrelina inhibe la secreción de insulina y estimula la utilización de glucosa en los adipocitos<sup>20</sup>. Además, se ha señalado que hormonas que se encuentran elevadas en la gestación como la PGH e IGF-I ejercen un efecto negativo sobre la secreción de ghrelina.

Al analizar en conjunto el embarazo y posparto de los dos grupos de estudio se encontró una asociación negativa entre ghrelina y el peso o IMC. Numerosos autores han señalado que la obesidad a través de una mayor secreción de leptina y TNF- $\alpha$  inhibe la secreción de ghrelina.<sup>74-76</sup>

Las principales limitaciones del estudio fueron el tamaño de muestra, el método para evaluar la RI, ya que el HOMA solo evalúa la resistencia a la insulina a nivel hepático y no a nivel muscular como el clamp, y la medición de ghrelina total y no la ghrelina acilada bioactiva.<sup>69</sup> La ghrelina acilada cumple con la función de inducir el apetito, inhibe la secreción de insulina y la utilización de glucosa por los adipocitos; sin embargo su medición presenta ciertas dificultades técnicas ya que se degrada fácilmente y requiere cuidados especiales al momento de tomar la muestra, de transportarla y de procesarla. Por ello se decidió medir la ghrelina total al no requerir tantos cuidados y al conocer que se le ha propuesto como un marcador de la ghrelina bioactiva ya que usualmente las dos cambian en paralelo.<sup>55-57</sup>.

## 10. CONCLUSIONES.

Tomando en cuenta la hipótesis:

- ❖ De acuerdo a lo reportado sobre los niveles de ghrelina en el embarazo y posparto suponíamos que los niveles de ghrelina serían menores tanto en el embarazo como el posparto en mujeres con DMG comparadas con mujeres con TNG.
- ❖ De acuerdo a lo reportado en la literatura sobre la relación de la ghrelina con la RI, suponíamos que su asociación sería inversa.

Al haber realizado este trabajo se concluye que:

- Los niveles de ghrelina son menores en el embarazo y aumentan en el posparto de DMG y TNG.
- No hay una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de ghrelina entre las mujeres de DMG y las de TNG en el embarazo ni a las seis semanas posparto.
- No hay asociación entre los niveles de ghrelina y la RI.



Con base a los resultados obtenidos en este estudio se propone:

- Medir los niveles de ghrelina acilada y desacilada en lugar de ghrelina total.
- Ampliar el tamaño de muestra de ambos grupos.
- Evaluar las concentraciones de leptina, PRL, PGH, citocinas y diversas hormonas que regulan la producción de ghrelina.
- Establecer si hay diferencias con las diferentes formas de ghrelina entre DMG y TNG.

## 12. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. WHO/NCD/NCS/99.2. 1999.
2. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Sec.2. In Standards of Medical Care in Diabetes-2015. Diabetes Care. 2015; 38(Suppl.1): S8–S16.
3. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana Nom-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. México: Secretaria de Salud; 23/11/2010.
4. Guía de práctica clínica, diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo, México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 2009.
5. Almiron M, Gamarra S, González M, Ramón I. Diabetes Gestacional. Posgrado de la Vía cátedra de medicina. 2005; 152: 23-27.
6. González-Ruiz M, Rodríguez-Bandala C, Salcedo-Vargas M, Martínez-Lara E, Enríquez-Espinoza F, Polo SM, et al. Actualidades en diabetes gestacional. Rev Sanid Milit Mex. 2014; 68: 276-282.
7. Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovszky M, Szöcs A, Winkler G, et al. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. Diabetes res clin pract. 2007; 76: 351–357.

8. Aydin S. The Presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides*. 2010; 31: 2236-2240.
9. Tham E, Liu J, Innis S, Thompson D, Gaylinn BD, Bogarin R, et al. Acylated ghrelin concentrations are markedly decreased during pregnancy in mothers with and without gestational diabetes: relationship with cholinesterase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296: E1093–E1100.
10. Gibson WT, Liu J, Gaylinn B, Thorner M, Meneilly GS, Babich SL, et al. Effects of Glucose and Insulin on Acyl ghrelin and Desacyl ghrelin, Leptin and Adiponectin in Pregnant Women with Diabetes. *Metabolism*. 2010; 59: 841–847.
11. Baykus Y, Gurates B, Aydin S, Celik H, Kavak B, Aksoy A, et al. Changes in serum obestain, preptin and ghrelins in patients with Gestational Diabetes Mellitus. *Clin Biochem*. 2012; 45: 198-202.
12. Riedl M, Maier C, Handisurya A, Luger A, Kautzky-Willer A. Insulin Resistance has no impact on ghrelin suppression in pregnancy. *J Intern Med*. 2007; 262: 458-465.
13. Chaudhri O, Wynne K, Bloom S. Can Gut Hormones Control Appetite and Prevent Obesity?. *Diabetes Care*. 2008; 31: S284-S289.

14. Chabot F, Caron A, Laplante M, St-Pierre DH. Interrelationships between ghrelin, insulin and glucose homeostasis: Physiological relevance. *World J Diabetes*. 2014; 5: 328-341.
15. Diario Oficial de la Federación. Proyecto de Norma Oficial Mexicana Nom-007-SSA2-2010, Para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y del recién nacido: 05/11/2012.
16. Cetin I, Cardellicchio M. Fisiología del embarazo: interacción materno infantil. *Ann Nestlé*. 2010; 68: 7-16.
17. Osorio J. Embarazo y metabolismo de los carbohidratos. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2003; 54: 97-106.
18. Mills JL, Jovanovic L, Knopp R, Aarons J, Conley M, Park E, et al. Physiological reduction in fastig plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the diabetes in early pregnancy study. *Metabolism*. 1998; 47: 1140-1144.
19. Guía de práctica clínica de referencia rápida, diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo, México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 2009.
20. Voto L, Nicolotti A, Salcedo L, Gonzalez M, Nasiff J, Elizalde A. Consenso de diabetes, recopilación, actualización y recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes gestacional. *F.A.S.G.O*. 2012; 11: 37-48.

21. Kampmann U, Ring L, Oeskov G, Smed I, Moeller N, Ovesen P. Gestational diabetes: A clinical update. *World J Diabetes*. 2015; 6: 1065-1072.
22. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana Nom-034-SSA2-2013, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento: 24/06/2014.
23. Baz B, Riveline J, Gautier J. Endocrinology of pregnancy gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol*. 2016; 174: R43-R51.
24. Duarte-Gardea M, Muñoz G, Rodríguez-Saldaña J, Escorza-Dominguez A. Prevalencia, detección y tratamiento de la diabetes gestacional. *Rev Salud Publica Nutr*. 2004; 5: 1-8
25. Font-López K, Cejudo-Carranza E, López-Caucana A, Peralta-Pedrero M, Díaz-Velásquez M, Puello-Tamara E, et al. Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2010; 48: 673-684.
26. Zarate A, Saucedo R, Basurto L, Hernandez M. El nuevo enfoque hacia la diabetes gestacional. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2011; 49: 1-3.
27. Federación internacional de diabetes. Atlas de la diabetes de la FID. 6 ed: Federación internacional de diabetes; Vancouver: 2013.

28. Duarte-Gardea M, Muñoz G, Rodríguez-Saldaña J, Escorza-Dominguez A. Prevalencia, detección y tratamiento de la diabetes gestacional. *Rev Salud Publica Nutr.* 2016; 16: 1-11.
29. Abell SK, De Courten B, Boyle JA, Teede HJ. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 13442-73.
30. Homko C, Sivan E, Chen X, Reece EA, Boden G. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 568-73.
- 31 Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB & Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165: 1667–1672.
32. Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes.* 1999. 48; 1807-1814.
33. Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology.* 1980; 106: 663–667.

34. Smith RG, Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Yang L, et al. Growth hormone releasing substances: types and their receptors. *Horm Res.* 1999; 51: 1–8.
35. Arce VM, Catalina PF, Mallo F. *Endocrinología. Universidad de Santiago de Compostela universidad de Vigo. España* : 2006: 121-136.
36. Kojima M, Hosada H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402: 656-660.
37. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005; 85: 495-522.
38. Rincón J. Ghrelina, un péptido modulador del metabolismo energético. *Rev Endocrinol Nut.* 2007; 15: 138-148.
39. Heppner KM, Tong J. Regulation of glucose metabolism by ghrelin system: multiple players and multiple actions. *Eur J Endocrinol*; 2014: 183: 1-30.
40. Nogueiras R, Williams LM, Dieguez C. Ghrelin: New molecular pathways Modulating appetite and adiposity. *Obes Facts.* 2010; 3: 285-292.
41. Alvarez M, González LC, Gil M, Fontans S, Romani M, Vigo E, Mallo F. Las hormonas gastrointestinales en el control de la ingesta de alimentos. *Endocrinol Nutr.* 2009; 56: 317-330.

42. Blanco A. Obesidad y respuesta inflamatoria. *Bol Pediatr.* 2007; 47: 237-249
43. Romero A, Kirchner H, Heppner K, Pfluger P, Tschöp MH, Nogueiras R. GOAT: the master switch for the ghrelin system?. *Eur J Endocrinol.* 2010; 163: 1-8.
44. Khatib N, Gaidhane B, Gaidhane AM, Khatib M, Simkhada R, Gode D, et al. Ghrelin: Ghrelin as a Regulatory Peptide in Growth Hormone Secretion. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8: 13-17.
45. Andrich DE, Cianflone K, Comtois AS, Lalonde S, St-Pierre DH. The endocrine effects of acylated and des-acylated ghrelin. *Dove Preess.* 2012; 2: 31-40.
46. Natalucci G, Riedl S, Gleiss A, Zidek T, Frisch H. Spontaneous 24-h ghrelin secretion pattern in fasting subjects: maintenance of a meal-related pattern. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152: 845-850.
47. Karra E, O'Daly O, Choudhury A, Yousseif A, Milership S, Neary M, et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J Clin Invest.* 2013; 123: 3539-3551.
48. Morgado E, Caba MS. Ghrelina: Una hormona reguladora de la ingesta de alimento y del peso corporal. *Med UV;* 2008: 2: 35-41.
49. Schwartz MW, Merton GJ. Keeping hunger at bay. *Nature.* 2002; 418: 595-597.



50. Garcia P. Gordos y flacos. R Acad Cienc Exact Fis Nat. 2007; 101: 361-387.
51. Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. Molecular Metabolism. 2015; 4: 437-460.
52. Giménez O, Caixàs A. Ghrelina: de la secreción de hormona de crecimiento a la regulación del equilibrio energético. Endocrinol Nutr. 2004; 51: 464-472.
53. Korner J, Label RL. To eat or not to eat- how the gut talks the brain. N Engl J Med. 2003; 349:926-928.
54. Knerr I, Herzog D, Rauh M, Rascher W, Horbach T. Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients. Eur J Clin Invest. 2006; 179: 237-244
55. Overduin J, Tylee TS, Frayo RS, Cummings DE. Hyperosmolarity in the small intestine contributes to postprandialghrelin suppression. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014; 306:G1108-16.
56. Shrestha YB, Wickwire K, Giraud SQ. Direct effects of nutrients, acetylcholine, CCK, and insulin onghrelin release from the isolated stomachs of rats. Peptides. 2009; 30:1187-91.
57. Iwaukura H, Kangawa K, Nakao K. The regulation of circulating ghrelin- with recent updates from cell-based assays. Endocr J. 2015; 62: 107-22.

58. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006; 444: 854-859.
59. Altabas V, Zjacic-Rotvoc V. Anti-ghrelin antibodies in appetite suppression: recent advances in obesity pharmacotherapy. *Dove Press*. 2015; 4: 123-130.
60. Özcan B, Neggers S, Reifel A, Yang HC, Lucaites V, Aribat T, et al. Does des-acyl ghrelin improve glycemic control in obese diabetic subjects by decreasing acylated ghrelin levels?. *Eur J Endocrinol*. 2014; 170: 799-807.
61. Fuglsang J, Skjaerback C, Espelund U, Frystyk J, Fisker S, Flyvbjerg A, et al. Ghrelin and its relationship to growth hormone during normal pregnancy. *Clin Endocrinol*. 2005; 62: 554-559.
62. Makino Y, Hosoda H, Shibata K, Makino I, Kojima M, Kangawa K, Kawarabayashi T. Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. *Hypertension*. 2002; 39: 781-784.
63. Stuebe AM, Mantzoros C, Kleinman K, Gillman M, Rifas-Shiman S, Gunderson E, et al. Duration of Lactation and Maternal Adipokines at 3 Years Postpartum. *Diabetes*. 2011; 60: 1277–1285.
64. Lappas M, Jinks D, Ugoni A, Louizos CC, Permezel M, Georgiou HM. Post-partum plasma C-peptide and ghrelin concentrations are

predictive of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus. *J Diabetes*.2015;5:1436-42.

65. Kaplan A. *Glucose*. Clin Chem the C.V. Mosby Co. Toronto. Princeton. 1984: 1032-1036.

66. Naito HK, Kwak YS. Accurate measurement of serum total cholesterol: the need for standardization. *J Am Coll Nutr*. 1992;11:8S-15S.

67. Buccolo G. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem*. 1973; 19: 476-482.

68. Alfayete R, Mauri M. Algunos aspectos que el endocrinólogo debe conocer sobre los métodos de determinaciones hormonales. *Endocrinol nutr*; 2008;55:84-88

69. Perez M, Montoya E. Técnicas para el estudio de la resistencia Insulínica. Una valoración crítica. *Av Diabetol*; 2001: 17:179-186.

70. Duarte M, Muñoz G, Rodríguez J, Escorza AB. Prevalencia, Detección y Tratamiento de la Diabetes Gestacional. *Respyn*; 2004:1: 1-8.

71. American College of Obstetricians and Gynecologists. Obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2001; 121: 213–217.

72. Delhanty PJ, Neggers SJ, Van der Lely J. Ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur J Endocrinol.* 2012; 167: 601-608.

73. Milke M. Ghrelina: más allá de la regulación del hambre. *Rev Gastroenterol Mex.* 2005; 70: 465-473.

74. Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, et al. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 3935-3940.

75. Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, et al. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology.* 2002; 143: 3341-50.

76. Llamas-Covarrubias I, Ruiz-Solorio L, Llamas-Covarrubias M, Rivera-León E, Sánchez-Enríquez S. Efectos de la ghrelina y la obestatina en la salud y la enfermedad. *Rev Medica MD.* 2015; 6: 196-208.

## Anexo 1 Carta de consentimiento informado

México DF a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Por medio de la presente \_\_\_\_\_ acepto participar en el protocolo de investigación titulado: "Niveles de ghrelina en embarazo y posparto de mujeres con diabetes mellitus gestacional y embarazo con tolerancia normal a la glucosa", el objetivo del estudio es medir la concentración de ghrelina en la diabetes gestacional y en el embarazo normal e identificar la asociación de la resistencia a la insulina con la concentración de esta hormona. Se me ha explicado que mi participación consistirá en tomas de muestra de sangre venosa en el tercer trimestre de embarazo y en la sexta semana posparto. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: los riesgos asociados con la toma de muestra sanguínea son desmayo, sensación de mareo, hematoma y punciones múltiples para obtenerla muestra. Los beneficios de mi participación son la evaluación continua de los niveles de glucosa y el cálculo del riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 en el futuro.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la paciente

\_\_\_\_\_  
Investigador responsable  
Renata Patricia Saucedo García  
Matrícula 99091877

\_\_\_\_\_  
Médico responsable  
Armando Cruz Rodríguez

Los números telefónicos a los cuales puedo comunicarme en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio son el 56276900 Ext.21479.

Testigos:

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

## Anexo 2 Cuestionario.

### PROTOCOLO:

### “Niveles de ghrelina en embarazo y posparto de mujeres con diabetes mellitus gestacional y embarazo con tolerancia normal a la glucosa”

Referida por: \_\_\_\_\_ Folio: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ No. de \_\_\_\_\_

Afiliación: \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_ Ocupación: \_\_\_\_\_

Semana 24-36 de embarazo:

FUR: \_\_\_\_\_ Edad gestacional (semanas): \_\_\_\_\_ Fecha probable parto: \_\_\_\_\_

Peso previo al embarazo: \_\_\_\_\_ Peso actual: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ IMC actual: \_\_\_\_\_ IMC previo al embarazo: \_\_\_\_\_ TA(1): \_\_\_\_\_ TA(2): \_\_\_\_\_

HAS previa al embarazo: No \_\_\_ Si \_\_\_ Controlada: \_\_\_\_\_

HAS durante el embarazo: No \_\_\_ Si \_\_\_ Controlada: \_\_\_\_\_

Tiempo de evolución: \_\_\_\_\_ Tx: \_\_\_\_\_

Paridad Gesta: \_\_\_ Partos: \_\_\_ Cesáreas: \_\_\_ Abortos: \_\_\_ Peso de bebé previo: \_\_\_\_\_

Parto previo de un bebé por encima de 4Kg de peso: Si \_\_\_ No \_\_\_

Muerte de un bebé o recién nacido Si \_\_\_ No \_\_\_

Malformación de bebé previo: Si \_\_\_ No \_\_\_ DMG previa: Si \_\_\_ No \_\_\_

Familiar en primer grado con DM: Si \_\_\_ No \_\_\_ quien \_\_\_\_\_

Tabaquismo: Nunca: \_\_\_\_\_ actual: \_\_\_\_\_ Previo al embarazo: \_\_\_\_\_ Duración \_\_\_\_\_ Alcoholismo: Nunca \_\_\_\_\_ actual \_\_\_\_\_ Previo al embarazo \_\_\_\_\_ Duración y cantidad \_\_\_\_\_ Actividad física previa al embarazo: \_\_\_\_\_

Ligera \_\_\_\_\_ Moderada \_\_\_\_\_ severa \_\_\_\_\_

Actividad física actual: Ligera \_\_\_\_\_ Moderada \_\_\_\_\_ severa \_\_\_\_\_

Glucosa previa y fecha: \_\_\_\_\_

Tx para la DMG: Dieta: \_\_\_\_\_ Insulina: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

Fecha de diagnóstico de la DMG: \_\_\_\_\_

Motivo de internamiento: \_\_\_\_\_

Semana seis posparto:

Edad gestacional al momento del parto o cesárea: \_\_\_\_\_

Parto \_\_\_ o cesárea \_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

Peso del bebé al nacer: \_\_\_\_\_ Talla al nacer: \_\_\_\_\_ Peso actual del bebé: \_\_\_\_\_

Amamanta al bebé: Si \_\_\_ No \_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ TA(1) \_\_\_\_\_ TA(2) \_\_\_\_\_

Resultados:

	Semana 24-36 de embarazo	Semana seis posparto
Peso		
IMC		
Triglicéridos		
Colesterol		
Insulina		
Ghrelina		
HOMA		

### Anexo 3. Procedimientos.

Procedimiento de radioinmunoensayo para determinación de Ghrelina.

Día 1					Día 2		Día 3	
	Paso 1	Paso 2-3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8	Paso 9-12
Tubo	Agregar Buffer de ensayo	Agregar estándar/ controles	Agregar Anticuerpo anti-ghrelina	Vortex, cubrir e incubar de 20 -24 hrs a 4°C	Agregar Ghrelina marcada con I <sup>125</sup>	Vortex, cubrir e incubar de 20 -24 hrs a 4°C	Agregar reactivo precipitante	Incubar 20 minutos a 4°C, centrifugar a 4°C por 20 minutos decantar y contar.
1,2	--	--	--		100µl		--	
3,4	300µl	--	--		100µl		1.0 mL	
5,6	200µl	--	100µl		100µl		1.0 mL	
7,8	100µl	100µl de 117.1875pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
9,10	100µl	100µl de 234.375pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
11,12	100µl	100µl de 468.75pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
13,14	100µl	100µl de 937.5pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
15,16	100µl	100µl de 1875pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
17,18	100µl	100µl de 3750pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
19,20	100µl	100µl de 7500pg/ml	100µl		100µl		1.0 mL	
21,22	100µl	100µl de control 1	100µl		100µl		1.0 mL	
23,24	100µl	100µl de control 2	100µl		100µl		1.0 mL	
25,26	100µl	100µl de muestra desconocida	100µl	100µl	1.0 mL			

Procedimiento de radioinmunoensayo para determinación de Insulina humana.

	Día 1					Día 2		
	Paso 1	Paso 2-3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8	Paso 9-11
Tubo	Agregar Buffer de ensayo	Agregar estándar/ controles	Agregar Insulina marcada $^{125}$ I	Agregar Anticuerpo anti-insulina	Vortex, cubrir e incubar de 20 -24 horas a temperatura ambiente	Agregar reactivo precipitante	Vortex, cubrir e incubar 20 minutos a 4°C	Centrifugar a 4°C por 20 minutos, decantar y contar.
1,2	--	--	100µl	--		--		
3,4	300µl	--	100µl	--		1.0 mL		
5,6	200µl	--	100µl	100µl		1.0 mL		
7,8	100µl	100µl de 3.125µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
9,10	100µl	100µl de 6.25 µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
11,12	100µl	100µl de 12.5 µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
13,14	100µl	100µl de 25 µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
15,16	100µl	100µl de 50 µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
17,18	100µl	100µl de 100 µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
19,20	100µl	100µl de 200 µU/ml	100µl	100µl		1.0 mL		
21,22	100µl	100µl de control 1	100µl	100µl		1.0 mL		
23,24	100µl	100µl de control 2	100µl	100µl		1.0 mL		
25,26	100µl	100µl de muestra desconocida.	100µl	100µl	1.0 mL			