



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

***“EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL MIR-372-5P EN EL SUERO
DE PACIENTES EN EL TRANCURSO DEL EMBARAZO:
POSIBLE BIOMARCADOR TEMPRANO EN EL
DESARROLLO DE CORIOAMNIONITIS.”***

T E S I S

Que para obtener el título de Especialista en

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A

FABIOLA GALLARDO GÓMEZ

**DR. MARIO ROBERTO RODRÍGUEZ BOSCH
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN**

**DRA. MARÍA DE LOURDES GÓMEZ SOUSA
ASESORA DE TESIS**

**M.en C. HECTOR FLORES HERRERA
ASESOR METODOLÓGICO**



Ciudad de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

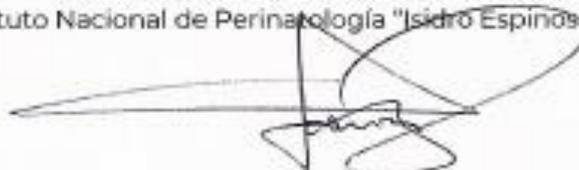
AUTORIZACIÓN DE TESIS:

**"EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL miR-372-5p EN EL SUERO DE PACIENTES EN EL
TRANSCURSO DEL EMBARAZO: POSIBLE BIOMARCADOR TEMPRANO EN EL DESARROLLO
DE CORIOAMNIONITIS."**



DRA. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ

Directora de Educación en Ciencias de la Salud
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



DR. MARIO ROBERTO RODRÍGUEZ BOSCH

Profesor Titular del Curso de Especialización en Ginecología y Obstetricia
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



M. EN C. HÉCTOR FLORES HERRERA

Asesor de Tesis
Investigador en Ciencias Médicas nivel C
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel I
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



DRA. MARÍA DE LOURDES GÓMEZ SOUSA

Asesora Metodológica
Departamento de Posgrado, Investigación y Calidad
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

DEDICATORIA

A mis padres por ser mi ejemplo de vida, enseñarme que con esfuerzo, dedicación y amor se pueden lograr las cosas y sobre todo apoyarme en este camino y creer en mí.

A mis hermanos, compañeros y amigos por su apoyo incondicional, acompañarme a lo largo de esta etapa. A mis maestros que estuvieron involucrados en mi formación ya que sin duda fueron gran fuente de inspiración para el crecimiento tanto personal, así como profesional. por estar pendiente e interesado en el trabajo propuesto.

A mis asesores de tesis quien desde el inicio del proyecto me apoyaron y proporcionaron las herramientas necesarias para concluir este proyecto.

Finalmente, a todos los que conforman el INPer por convertirse en mi casa estos años y a todas los pacientes ya que son el impulso y la motivación para seguir preparándome.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se desarrolló con fondos federales al Instituto Nacional de Perinatología “*Isidro Espinosa de los Reyes*” mediante el proyecto con número de registro 212250-3210091 (otorgado a HFH). Fabiola Gallardo Gómez es becaria del programa de Impulso a la Investigación en Salud desde el 2020 a 2022.

INFORMACIÓN DE LOS AUTORES

Dra. Fabiola Gallardo Gómez

Médico Residente

Especialidad Ginecología y Obstetricia,

Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11 000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: fabiolagallardo3191@gmail.com

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo:

1) Obtuvo el consentimiento informado de las pacientes que fueron incluidos en el presente trabajo; 2) Recolectó las muestras de sangre de las pacientes a las 12, 20 y 30 semanas de gestación; 3) Realizó la amplificación de los miRNA mediante la RT-PCR; 4) Revisó los expedientes clínicos 5) Realizó el análisis y discusión de los resultados para la escritura de la tesis.

Dra. María de Lourdes Gómez Sousa

Departamento de Posgrado, Investigación y Calidad

Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: posgradoeinvest@inper.gob.mx

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo:

1) Diseño y ejecución experimental 2) Revisión de la tesis, 3) Revisión y discusión de los resultados obtenidos.

M. en C. Héctor Flores Herrera

Investigador en Ciencias Médicas nivel C

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1

Departamento de Inmunobioquímica

Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: h.flores@inper.gob.mx

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo:

1) Estableció las diferencias en la amplificación de los miRNA mediante la RT-PCR entre las pacientes sanas y las que desarrollaron corioamnionitis; y 2) Obtención del financiamiento para el desarrollo del presente trabajo; 3) Revisión y discusión de los resultados obtenidos.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
AUTORIZACIÓN DE TESIS.....	2
DEDICATORIAS.....	3
AGRADECIMIENTO.....	3
INFORMACIÓN DE LOS AUTORES.....	4
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
1.0 INTRODUCCIÓN	9
1.1 Epidemiología	
2.0 ANTECEDENTES	
2.1 Etiología de la corioamnionitis	10
2.2 miRNAs.....	12
2.3 Relación de las miRNAs en el desarrollo de corioamnionitis.....	14
3.0 JUSTIFICACIÓN	16
4.0 HIPÓTESIS	16
5.0 OBJETIVO GENERAL	16
5.1 Objetivos particulares.....	16
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1 Aspectos éticos.....	17
6.2 Universo de las pacientes de estudio.....	18
6.3 Diseño del estudio	18
6.3.1 Características del estudio	18
6.3.2 Unidades de observación.....	18

6.3.3 Tamaño de la muestra	18
6.3.4 Criterios de selección	18
6.3.4.1 Criterios de inclusión	18
6.3.4.2 Criterios de no inclusión	19
6.3.4.3 Criterios de exclusión	19
6.3.4.4 Criterios de eliminación	19
6.4 Variables del estudio	19
6.5 Obtención del suero de las pacientes embarazadas	19
6.6 Expresión de los miRNAs	20
<i>Página</i>	
6.8 Análisis estadístico	21
7.0 RESULTADOS	
7.1 Características de la población de estudio	22
7.2 Parámetros bioquímicos de gabinete	23
7.3 Expresión de los miRNAs	25
8.0 DISCUSIÓN	25
9.0 CONCLUSIÓN	26
10.0 PERSPECTIVAS	27
11.0 BIBLIOGRÁFIAS.....	27
ANEXOS	
1. Registro del proyecto institucional	31
2. Consentimiento informado	32

RESUMEN

Introducción:

La corioamnionitis complica del 1 al 4% de todos los embarazos, es una de las patologías obstétricas, que ha sido estrechamente relacionada con el parto pretérmino espontáneo hasta en un 30% lo cual aumenta el riesgo de complicaciones neonatales a corto y largo plazo afectando a diversos órganos y sistemas convirtiéndolo en un problema de salud pública a nivel nacional y mundial. Actualmente el diagnóstico clínico de las infecciones durante el embarazo se realiza mediante el cultivo bacteriológico; sin embargo, esta metodología tiene baja sensibilidad y especificidad. Recientemente se ha demostrado el aumento en la expresión del miR-21 y -210 en el suero de pacientes con datos clínicos e histológicos de corioamnionitis y el aumento del miR-372-5p en el tejido de la coriodecidua infectada con *Escherichia coli*; sin embargo, no se ha evaluado la expresión de los miRNAs en etapas tempranas de la gestación humana y si estos pudieran ser utilizados en la clínica como biomarcadores temprano. Por lo que en el presente trabajo se cuantificó la expresión del miR-372-5p en etapas tempranas para lograr identificar el riesgo de desarrollar corioamnionitis.

Material y Métodos: Se han incluido 41 pacientes con embarazo único y sin comorbilidades asociadas a la respuesta inflamatoria y que fueron admitidas al Instituto Nacional de Perinatología para control prenatal, seguimiento y resolución. A las pacientes se les tomaron muestras a las 12, 20 y 30 semanas de gestación en total 5 ml de sangre periférica, y se obtuvo el suero el cual fue almacenado a -70°C. El RNA se obtuvo a partir de 500 µL del plasma al cual se le adicionó el mismo volumen del reactivo de TRIzol y se determinó el perfil de expresión del miR-372 mediante la retrotranscripción (RT) obteniendo el cDNA y posteriormente se realizó la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Las bandas de expresión fueron determinadas mediante el programa de ImageJ.

Resultados: Se ha obtenido el RNA de 15 pacientes en la semana 12, 20 y 30 de gestación. De las cuales se tuvo que excluir tres pacientes por presentar datos clínicos de preeclampsia. De las 12 pacientes se tuvieron dos grupos: 1) pacientes sanas (n=9) y pacientes con desarrollo de corioamnionitis (n=3). No se encontraron

diferencias significativas entre la edad ($p=0.5525$), talla ($p=0.3061$), peso ($p=0.0999$), índice de masa corporal ($n=0.0811$), en la edad de gestación al término de su embarazo ($p=0.0636$). Se han estandarizado las condiciones de amplificación por PCR y se analizó el perfil de expresión del miR-372-5p, en pacientes con corioamnionitis observando el aumento 1.26, 1.06 y 1.28 a las 12, 20 y 30 semanas de gestación respectivamente.

Conclusiones: La expresión del miR-372-5p permitirá obtener y comparar la expresión en las diferentes semanas de gestación. El aumento en la expresión del miR-372-5p podría ser utilizado en la clínica para dar intervenciones oportunas.

Palabras clave: Corioamnionitis, infección intramniótica, microRNAs, pacientes embarazadas, resultados perinatales.

ABSTRACT

Introduction:

Chorioamnionitis complicates 1 to 4% of all pregnancies, it is one of the obstetric pathologies, which has been closely related to spontaneous preterm delivery by up to 30%, which increases the risk of neonatal complications in the short and long term affecting the various organs and systems making it a public health problem at the national and global level. Currently, the clinical diagnosis of infections during pregnancy is carried out by bacteriological culture; however, this methodology has low sensitivity and specificity. Recently, the increase in the expression of miR-21 and -210 in the serum of patients with clinical and histological data of chorioamnionitis and the increase of miR-372-5p in the tissue of the choriodecidua infected with *Escherichia coli* have been demonstrated; however, the expression of miRNAs in the early stages of human gestation and whether they could be used clinically as early biomarkers has not been evaluated. Therefore, in the present work, the expression of miR-372-5p was quantified in early stages to identify the risk of developing chorioamnionitis.

Methods: 41 patients with a single pregnancy and without comorbidities associated with the inflammatory response were included and admitted to the National Institute of Perinatology for prenatal control, follow-up and resolution. A total of 5 ml of peripheral blood was sampled from the patients at 12, 20 and 30 weeks of gestation, and the serum was obtained which was stored at -70 ° C. The RNA was obtained from 500 µL of the plasma to which the same volume of the TRIzol reagent was added and the expression profile of miR-372 was determined by means of the reverse transcription (RT) obtaining the cDNA and later the amplification was carried out in polymerase chain (PCR). The expression bands were determined by the ImageJ program.

Results: RNA was obtained from 15 patients at weeks 12, 20 and 30 of gestation. Of which three patients had to be excluded due to presenting clinical data of preeclampsia. Of the 12 patients, there were two groups: 1) healthy patients (n = 9) and patients with the development of chorioamnionitis (n = 3). No significant differences were found between age (p = 0.5525), height (p = 0.3061), weight (p =

0.0999), body mass index ($n = 0.0811$), in gestation age at the end of pregnancy ($p = 0.0636$). The conditions of amplification by PCR have been standardized and the expression profile of miR-372-5p was analyzed in patients with chorioamnionitis, observing the increase of 1.26, 1.06 and 1.28 at 12, 20 and 30 weeks of gestation respectively.

Conclusion: The expression of miR-372-5p will allow obtaining and comparing the expression in the different weeks of gestation. The increase in the expression of miR-372-5p could be used in the clinic to give timely interventions.

Key words: Chorioamnionitis, intraamniotic infection, microRNAs, pregnant patients, perinatal results.

1.0 INTRODUCCIÓN

Actualmente corioamnionitis se define como la presencia de un grupo heterogéneo de condiciones que incluyen infección y/o inflamación con o sin presencia de microorganismos (inflamación intraamniótica estéril) resultante de cualquier combinación en líquido amniótico, placenta, feto, membranas fetales o decidua.^{1, 2, 3, 4, 5, 6,}

La corioamnionitis se asocia con una importante morbi-mortalidad materna y neonatal siendo una de las tres principales causas de parto pretérmino con y sin ruptura de membranas, representando complicaciones maternas como endometritis, infección de herida quirúrgica, tromboflebitis pélvica séptica, absceso pélvico y hemorragia posparto además de importantes complicaciones neonatales a corto y a largo plazo como neumonía, sepsis neonatal, parálisis cerebral, displasia broncopulmonar y muerte. Por lo que un diagnóstico oportuno es esencial para prevenir estos desenlaces^{2, 7, 8}

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas que han sido asociadas con el desarrollo en diferentes patologías humanas y muestran una adecuada sensibilidad y especificidad como pruebas diagnósticas. Se ha demostrado en el suero de pacientes embarazadas con datos clínicos e histológicos de corioamnionitis y con desarrollo prematuro del trabajo de parto (28.0 semanas de gestación) el aumento de 1.3-, y 1.1-veces en la

expresión de los miR-126 y -146 respectivamente ⁹ sin embargo, en este estudio el perfil de expresión de los miRNAs se determinó a las 28 semanas de gestación. Por lo que en el presente estudio nos proponemos a determinar la expresión del miR-372-5p desde etapas tempranas de la gestación (12,20,30 semanas) y en el momento de la presencia de la corioamnionitis y al término del embarazo.

2.0 ANTECEDENTES

La incidencia general de corioamnionitis clínica es del 1-4% en los países desarrollados y del 5-12% de todos los embarazos de término; esto representa que aproximadamente 1 de cada 30 partos se complica por la presencia de corioamnionitis. Se ha establecido que la frecuencia y gravedad de la corioamnionitis están inversamente relacionadas con la edad gestacional en el momento del parto. En un estudio de 7505 placentas de embarazos únicos, Russell informó que la frecuencia de corioamnionitis en pacientes con nacimientos entre las 21 y 24 semanas fue del 94.4% . La Corioamnionitis se encuentra en un 75% de los partos con ruptura pretérmino de membranas de los cuales 50% se asocian a corioamnionitis histológica mientras que del 40-60% se asocian a inflamación intraamniótica estéril, en las gestaciones a término con ruptura de membranas está presente en un 4% sin embargo sólo el 40% de todos los casos se diagnostican intraparto, se asume que la mayoría de los casos con presencia de corioamnionitis aguda es de etiología no infecciosa. ^{10,11,12,13}

La placenta se compone de tres estructuras principales: corion, membranas corioamnióticas y el cordón umbilical. Las lesiones inflamatorias agudas de la placenta se caracterizan por la infiltración de neutrófilos en cualquiera de estas estructuras específicamente, cuando el proceso inflamatorio afecta el corion y el amnios, esto se denomina corioamnionitis aguda; si afecta al árbol veloso, esto representa una villitis aguda. Si el proceso inflamatorio involucra el cordón umbilical (vena umbilical, arteria umbilical y la gelatina de Wharton), esto se conoce como funisitis aguda, siendo la contraparte histológica del síndrome de respuesta inflamatoria fetal (SRIF).

La Corioamnionitis se puede clasificar de acuerdo con la presencia o ausencia de signos clínicos y pruebas de laboratorio en:

Corioamnionitis clínica: se ha caracteriza por la presencia de fiebre materna (temperatura de 37.8-38°) con 2 o más de los siguientes signos clínicos: taquicardia materna (frecuencia cardiaca mayor a 100 lpm), taquicardia fetal (mayor a 160 lpm), sensibilidad uterina, líquido amniótico o flujo vaginal purulento con mal olor, leucocitosis materna (leu mayor de 15,000), la precisión diagnóstica de estos criterios para identificar infección intraamniótica es del 50%¹⁴. El diagnóstico se realiza en el periodo anteparto en un 15% y de manera intraparto en un 85%¹⁵

Corioamnionitis subclínica se definirá por la presencia de inflamación en líquido amniótico o cultivo positivo de éste detectado por una amniocentesis. Ésta a su vez, se puede dividir en corioamnionitis histológica, infección intraamniótica (IIA) inflamación intraamniótica e inflamación intraamniótica en presencia de invasión microbiana a cavidad amniótica (MIAC).⁶

Corioamnionitis histológica: se define por la presencia de cambios histológicos agudos en las membranas fetales causando inflamación intrauterina caracterizada por infiltración aguda de granulocitos en los tejidos materno- fetales o fetales. Cubre dos subtipos MIAC (infecciosa) y sin MIAC (estéril).^{16,6} .La incidencia de HCA a término varía de 20%-24% a las 37 semanas y un 34% a las 40 semanas. Su prevalencia se correlaciona con la edad gestacional.

La infección se provoca comúnmente por una invasión ascendente de microorganismos del tracto genital inferior por lo que los microorganismos que se identifican con mayor frecuencia en este tipo de pacientes son *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus agalactiae*, *Lactobacillus species*, y *Bacteroides species*, la invasión polimicrobiana está presente en el 50% de los casos. También existe la diseminación hematogena siendo el agente causal más común por esta vía *Listeria monocytogenes*¹, retrograda o iatrogenia¹⁷ lo cual provoca respuesta inflamatoria materna y fetal. Dentro de la etiología viral se encuentran adenovirus, citomegalovirus, enterovirus, y con menor frecuencia, virus sincitial respiratorio y el virus de Epstein-Barr^{18,19}

Se ha observado que fisiopatológicamente el proceso infeccioso activa la respuesta inmunológica innata del tejido epitelial, de macrófagos, monocitos, células NK y neutrófilos. El reconocimiento de las bacterias activa la secreción masiva de diversas citocinas quimiotácticas (IL-6 e IL-8) e inflamatorias (IL-1 β , y el factor de necrosis tumoral tipo alfa; TNF α), que son las responsables de amplificar la respuesta inmunológica y la activación para la fagocitosis y de los linfocitos T^{20,21}.

El diagnóstico, puede ser presuntivo basado en hallazgos clínicos y de microbiología, o bien confirmatorio mediante pruebas de laboratorios que indiquen infección de líquido amniótico obtenido por amniocentesis o histológico postparto.

Diagnóstico Clínico:

Se utilizan los criterios de Gibbs desde la década de 1970 que consisten en: la presencia de fiebre materna (temperatura de 37.8-38°) con 2 o más de los siguientes signos clínicos: taquicardia materna (frecuencia cardiaca mayor a 100 lpm), taquicardia fetal (mayor a 160 lpm), sensibilidad uterina, líquido amniótico o flujo vaginal purulento con mal olor, leucocitosis materna (leu mayor de 15,000)²²

Diagnóstico bioquímico:

El cultivo de líquido amniótico es el estándar de oro para el diagnóstico, pero su utilidad limitada debido a demoras en la disponibilidad de resultados y por ser un procedimiento invasivo, se utiliza para confirmar sospecha de corioamnionitis subclínica en caso de signos clínicos incompletos. En la tabla 1 se encuentran los criterios los diagnósticos en líquido amniótico.^{23,24,25}

Tabla 1.- Criterios Diagnósticos en líquido amniótico.		
Marcador	Sensibilidad	Especificidad
Glucosa <10 mg/dl	82%	82%
Esterasa Leucocitaria Positiva	85-91%	95-100%
Leucocitos >15 mm³	57%	78%

IL 6 > 2.6 Ng/ml	100%	83%
Tinción Gram Positivo	24%	99%
Metaloproteinasa Positivo	90%	80%
Cultivo LA	Estándar de oro diagnóstico	
Marcadores séricos maternos		
Leucocitosis	>15,000, >5% de bandas	
PCR	>20 mg/l	

Diagnostico histopatológico

Se realiza el diagnóstico de corioamnionitis aguda mediante la presencia de un infiltrado neutrofílico en los tejidos placentarios, amnios²⁶. Sin embargo, puede no estar disponible hasta después del parto lo cual limita su utilidad clínica.

Tipos de RNA

El ácido ribonucleico (RNA) es una molécula de síntesis celular conocida principalmente por su papel en la exportación de información genética desde el núcleo hacia el citoplasma donde normalmente se traduce a proteínas²⁷.

Los miRNAs

Los micro RNA (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 21 nucleótidos que son críticas para la regulación postranscripcional de la expresión génica. Originalmente descubiertos en el nemátodo *Caenorabditis elegans*, a lo largo de los años se ha ido acumulando mayor evidencia sobre su potencial uso como biomarcadores no invasivos de enfermedades en el embarazo, relacionando su expresión con preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, aborto recurrente y embarazo ectópico.^{31,32,33}

En el escenario de corioamnionitis y regulación de la respuesta inflamatoria-antinflamatoria se ha demostrado la participación de una clase particular de ARNs no codificantes, denominados microRNA como moduladores de la respuesta inflamatoria que inhiben los factores encargados de la diferenciación y activación de las células inmunológicas o inhibición de diferentes tipos de ARN mensajeros^{34,35} lo cual nos da la posibilidad de utilizarlos como bio-marcadores tempranos no invasivos de corioamnionitis

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el diagnóstico clínico de las infecciones durante el embarazo se realiza mediante el cultivo bacteriológico; sin embargo, esta metodología tiene baja sensibilidad y especificidad. Recientemente estudios han demostrado la expresión de diversos miRNAs con la presencia de corioamnionitis sin embargo se desconoce la función que podrían tener como biomarcadores temprano por lo que en este trabajo se intenta cuantificar y analizar la expresión que pueden tener durante el embarazo y establecer marcadores de diagnóstico temprano que logren identificar la corioamnionitis durante el embarazo.

4. HIPÓTESIS

La expresión del miR-372-5p se incrementará en pacientes con evidencias clínicas de corioamnionitis con respecto a las pacientes embarazadas sanas, si el aumento ocurre antes de la aparición de los signos clínicos podría utilizarse como marcador temprano de corioamnionitis lo cual pudiera prevenir los desenlaces adversos.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión del miRNA-372-5p en el suero de pacientes en tres intervalos del embarazo en la semana 12,20, y 30 compararlos en aquellas pacientes que desarrollen corioamnionitis.

Objetivos específicos

- Evaluar en el suero de pacientes embarazadas sanas la expresión del miRNA-372-5p en la semana 12,20,30 de gestación.
- Compara a la misma edad gestacional el nivel de expresión del miR-372-5p entre las pacientes embarazadas sanas con respecto a las pacientes que desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

Previo a la obtención de la sangre de las pacientes se obtuvo el consentimiento informado en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación, el cual fue aprobado por los comités de investigación y ética institucionales y cuenta con número de registro institucional 212250-3210091 (anexo 1). Se les informó que la obtención de la sangre sería tomada por el médico especialista (MCZ) en tres ocasiones a las 12, 20 y 30 semanas de gestación y que este procedimiento no afectaría con el bienestar de su embarazo. Finalmente, se le entregó la carta de consentimiento informado para que la paciente firmará de manera libre (anexo 2).

De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de los pacientes en este estudio conlleva un tipo de riesgo: mínimo.

6.2 Universo de las pacientes de estudio: Participaron 41 pacientes embarazadas que cumplieron con los criterios de inclusión. Se analizaron hasta el momento 15 muestras tomadas en las semanas 12, 20, y 30 de gestación, se eliminaron 3 pacientes por desarrollar preeclampsia, concluyendo 9 pacientes sanas y 3 pacientes con desarrollo de corioamnionitis.

6.3 Diseño del estudio

Tipo de investigación: Clínico

Tipo de diseño: Experimental biomédico

6.3.1 Características del estudio

- a) Por la participación del investigador: Analítico
- b) Por la temporalidad del estudio: Longitudinal
- c) Por la lectura de los datos: Prolectivo
- d) Por el análisis de datos: Analítico.

6.3.2 Unidades de observación: Se determinó la banda de expresión del miRNA-372 mediante la densidad óptica. Las unidades son reportadas como unidades relativas.

6.3.3 Tamaño de la muestra

Para cubrir con los objetivos planteados en el desarrollo del presente trabajo hemos considerado incorporar 60 pacientes. Este número, fue designado como resultado de la experiencia de nuestro grupo de investigación demostrado por la publicación previa de Álvarez-Cabrera y colaboradores²⁶

6.3.4 Criterios de selección

6.3.4.1 Criterios de inclusión

Serán seleccionadas pacientes entre 15 y 35 años de edad que acudan al INPer para su seguimiento obstétrico y resolución del embarazo con embarazo único que no presenten signos y síntomas evidentes de patología obstétrica asociadas a la respuesta inflamatoria al momento de la obtención de las muestras de sangre previa obtención del consentimiento informado.

6.3.4.2 Criterios de no inclusión

Pacientes en las cuales hayan desarrollado datos sugestivos de preeclampsia, o asociadas a la respuesta inflamatoria.

6.3.4.3 Criterios de exclusión

Aquellas pacientes que al momento del procesamiento de las muestras se determine alguna patología asociada a la respuesta inflamatoria, paciente a las cuales no se les pueda tomar las muestras de sangre consecutivas.

6.3.4.4 Criterios de eliminación

Serán eliminadas del estudio aquellas pacientes en las que la resolución sea fuera del Instituto, por falta de datos de la paciente, o por haber desarrollado patologías obstétricas a lo largo de su embarazo asociada a respuesta inflamatoria.

6.4 Variables de estudio

A) Variable independiente: Desarrollo de corioamnionitis

Definición operacional: corioamnionitis fue diagnosticada basado en los criterios de Gibbs o histopatológico.

B) Variable dependiente: Expresión del miR-372-5p.

Definición operacional: Cuantificación de expresión del miR-372-5p. en el suero de las pacientes embarazadas de 12,20 y 30 semanas de gestación.

6.5 Obtención del suero de las pacientes embarazadas

A las pacientes que acudan a realizarse el ultrasonido primer trimestre o de seguimiento a las 12 semanas de gestación en el Departamento de Medicina Fetal, del instituto Nacional de Perinatología y que presenten los criterios de inclusión serán invitadas a participar en el estudio. Se les explicó el protocolo y se les dio a leer el consentimiento informado, en caso de aceptar se les recordó que se les tomaría en tres ocasiones (12, 20 y 30 semanas de gestación) 5 mL de sangre el cual fue colocado en tubo morado con EDTA-K2 como anticoagulante. Las muestras serán centrifugadas a 1400 rpm por 5 minutos. Posteriormente el suero fue recuperado y depositado en tubos Eppendorf. Cada tubo fue identificado mediante número consecutivo y en una bitácora el nombre completo de la paciente, edad gestacional al momento de la toma de sangre, así como el número de registro asignado por el instituto. Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta la obtención del RNA total.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de inmunobioquímica. A todas las pacientes se les dará el seguimiento clínico habitual de control prenatal en el Instituto Nacional de Perinatología, sin intervención de los investigadores y se seleccionarán como la cohorte de casos aquellas pacientes que cumplan con los criterios diagnósticos para corioamnionitis propuestos por clínica, laboratorio o histopatológico durante el embarazo o el puerperio y serán la cohorte de pacientes sin corioamnionitis aquellas que no presenten esta complicación bajo los mismos criterios durante el embarazo o el puerperio.

El transporte y eliminación de los residuos biológicos infecciosos y punzocortantes se apegó estrictamente a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 referente a la "Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológicos infecciosos"

clasificación y especificaciones de manejo” y conforme al manual institucional de procedimientos para el manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

6.6 Determinación de la expresión del miR-372-5p por el método de RT-PCR

6.6.1 Extracción del RNA total

A 500 µl del suero fueron mezclados con el mismo volumen de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA) la mezcla se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubaron por 15 min a 30°C. Posteriormente a cada muestra se les añadió 100 µl de cloroformo (Invitrogen), se agitaron por 15 seg. y fueron incubadas por 5 min a 30°C. Al término las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 15 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó 550 µl de isopropanol (Invitrogen) y 1 µl de Glucógeno (Invitrogen). Posteriormente se incubaron por 1 hora a -20°C. Al término de este tiempo las muestras se centrifugaron a 4 000 rpm por 30 min. Al pellet se le adicionó 1 ml de etanol al 100% y se agito vigorosamente por 15 seg., y fue centrifugado nuevamente a 4000 rpm por 15 min. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. El RNA fue evaporado toda la noche a temperatura ambiente, y al día siguiente fue hidratado con 20 µl de agua inyectable.

6.6.2 Reacción de RT

Para la obtención del cDNA se utilizó el kit Access RT-PCR System (Promega Madison WI, USA). Se tomaron 7 ng de cada una de las muestras y se preparó el mix de RT con 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO₄ [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de AMV RT y 1 µL de iniciador específico del miR-372-5p cuya secuencia es 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGAATA-3' [20 pmol]. El iniciador fue diseñado a partir de la secuencia de humano hsa-miR-372 maduro obtenida por el sitio web www.miRBase.org. La síntesis del cDNA se realizó durante 45 minutos a una temperatura de 45°C.

6.6.3 Reacción de PCR

A partir del cDNA obtenido se trabajó con 10 µL del mismo y con un mix de PCR el cual contenía 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO₄ [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de Tfi, 1 µL de iniciador específico para PCR miR-372-5p cuya secuencia es 5'-CGGCCGCCTCAAATGTG-3' [20 pmol] y 1 µL iniciador

universal [20 pmol]. Cada uno de los tubos fueron procesados en el termociclador con el siguiente programa: 94°C para una elongación inicial durante un minuto y 40 ciclos con 94°C durante 30 segundos, 56°C en 30 segundos, 72°C durante 30 segundos. Se realizó una elongación final de 72° durante 10 minutos.

6.6.4 Expresión del miR-372

Los amplificadores fueron sometidos en geles de agarosa al 4% a voltaje constante por 40 minutos y las bandas fueron visualizadas en luz UV. Las imágenes fueron capturadas usando el sistema foto documentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). El perfil de las bandas del miR-451 y miR-146a en las diferentes condiciones experimentales de infección fueron determinadas mediante la densidad óptica utilizando el programa ImageJ (NIH; USA).

6.7 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA). La comparación post hoc fue realizada mediante la medición de Tukey. Se usó el software de SigmaPlot (versión 11.0; USA). Todos los valores son presentados como la media desviación estándar y en cada caso las mediciones se realizaron por duplicado. Se tomó como diferencia estadísticamente significativa el valor menor a $p=0.05$.

7.0 RESULTADOS

7.1 Características de la población de estudio.

En el periodo de marzo del 2020 a abril del 2021 se incluyeron un total de 41 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (ver apartado 6.4.1). Hasta el momento se han procesado 15 muestras ya que se cuenta con las tres mediciones correspondientes a la semana 12, 20, y 30. De las 15 pacientes se tuvieron que excluir a tres por presentar datos de preeclampsia el cual moduló la expresión del miR-372-5p (*datos no mostrados*) como ha sido reportado en otros estudios ³⁴. De las 12 pacientes se tuvieron dos grupos: 1) pacientes sanas (n=9) y 2) pacientes con datos clínicos de corioamnionitis (n=3).

La tabla 1 muestra las características maternas de las 12 pacientes a las que se les cuantificó la expresión de miRNA-372-5p. Los datos fueron obtenidos del archivo clínico del INPer.

Tabla 1 Características maternas a las 12 semanas de gestación de la población de estudio.

Variables Maternas	Sanas (n=9)	Corioamnionitis (n=3)	Valor de p
Edad (años)	32.1±6.9	29.3±5.8	0.5525
Talla, (cm)	1.55±0.048	1.60±0.11	0.3061
Peso, (Kg)	73.3±10.1	62.0±5.3	0.0999
IMC, (Kg/m ²)	24.6±5.3	30.4±4.3	0.0811
Semanas de gestación al nacimiento	35.3±3.7	38.3±1.39	0.0636

Los datos se muestran como la media ± desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de t-student y se consideró una diferencia estadísticamente significativa menor a 0.05 (*).

Nueve pacientes (75%) fueron sanas y 3 pacientes (25%) presentaron corioamnionitis (tabla 2) en la semana 36.5, 38.4 y 31.1 de gestación. Se identificó en una de las pacientes el aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* con datos histopatológicos de corioamnionitis severa. En todos los casos las pacientes fueron tratadas con antibióticos (metronidazol, penicilina).

Antes de determinar el perfil de expresión de miR-372-5p del suero de las 12 pacientes se realizó la estandarización del miR-372-5p.

7.2 Estandarización de las condiciones de PCR

Para encontrar la temperatura óptima de alineamiento de PCR se utilizó un cotiledón de tejido placentario humano. La figura 1 muestra la banda de expresión tomando como base $52 \pm 1^\circ\text{C}$.

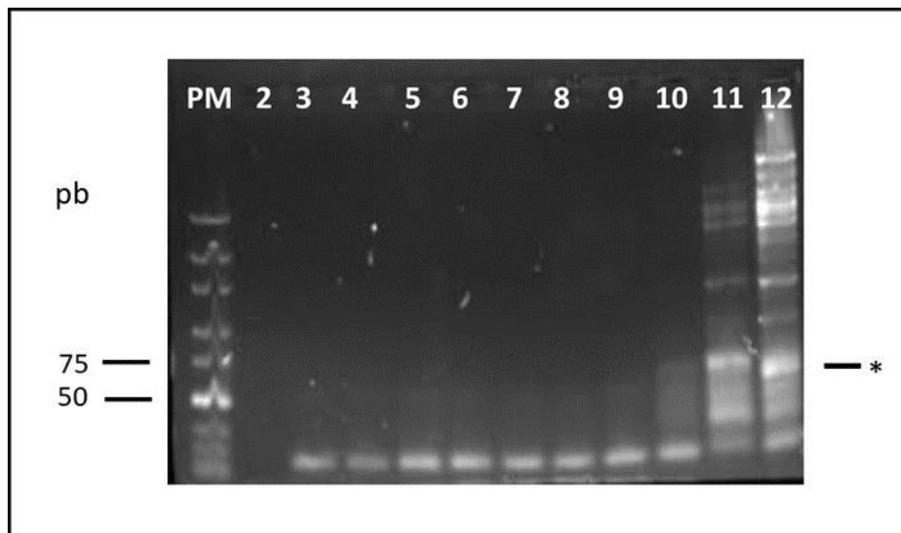


Figura 1. Condiciones de temperatura de alineamiento de PCR del miR-372-5p. Marcador de peso molecular (PM; 100 pares de bases; invitrogen), carril 2 vacío, carril 3 control negativo (sin RNA, 52°C), carriles 4-7 tejido de corazón de ratón a 50 , 51 , 52 , y 53°C respectivamente y carril 8 control negativo de corazón de ratón (sin RNA, 52°C), carriles 9-12 tejido de placenta humano a 50 , 51 , 52 , y 53°C respectivamente. La expresión muestra una banda de aproximadamente 73 pb (*) que corresponde a la expresión del miR-372-5p detectado en el tejido placentario.

Este resultado, nos indica que las condiciones óptimas para la alineación de la PCR que permiten la expresión del miR 372-5p son las siguientes: elongación inicial a 94°C (1 minuto) y 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 53°C en 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y una elongación final de 72° durante 10 minutos.

Después de establecer la temperatura de alineamiento se esta analizando el perfil de expresión sanas (n=9) y de aquellas que desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (n=3) en el primer (figura 1), segundo (figura 2) y tercer trimestre (figura 3) de la gestación.

7.2.1 Expresión del miR-372-5p a las 12 semanas de gestación.

En las pacientes sanas encontramos que la expresión del miR-372-5p en el primer trimestre (12.23±0.5 semanas de gestación) fue de 1323±209 la cual aumento aumentó 1.26-veces en el grupo de corioamnionitis; sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p=0.1474; figura 1).

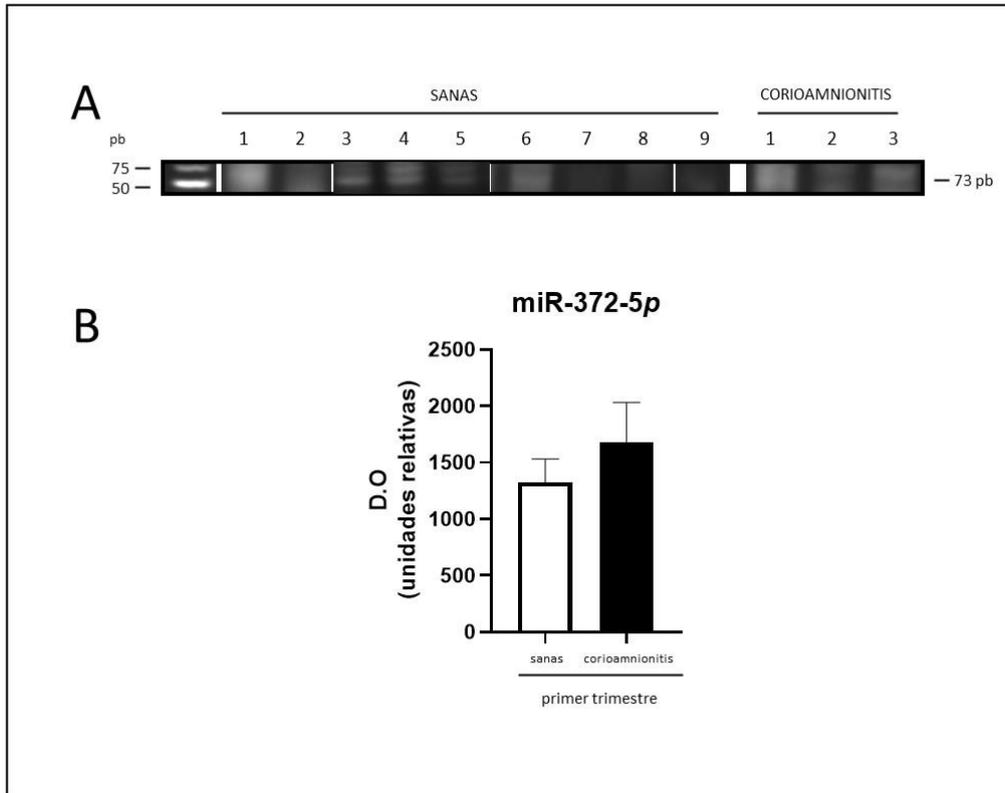


Figura 1 Expresión del miR-372-5p en el suero del primer trimestre de embarazo. **(A)** muestra la expresión relativa en las pacientes sanas (n=9), y en las pacientes que desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (n=3). **(B)** indica la densidad óptica (D.O) de la banda de expresión la cual fue determinada en el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. La banda de expresión tiene un tamaño molecular relativo de 73 pares de bases. Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (InvitroGene).

7.2.2 Expresión del miR-372-5p a las 20 semanas de gestación.

En las pacientes sanas encontramos que la expresión del miR-372-5p en el segundo trimestre (20.13 \pm 0.15 semanas de gestación) fue de 1038 \pm 291 la cual aumento aumentó 1.06-veces en el grupo de corioamnionitis; sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p=0.7550; figura 2).

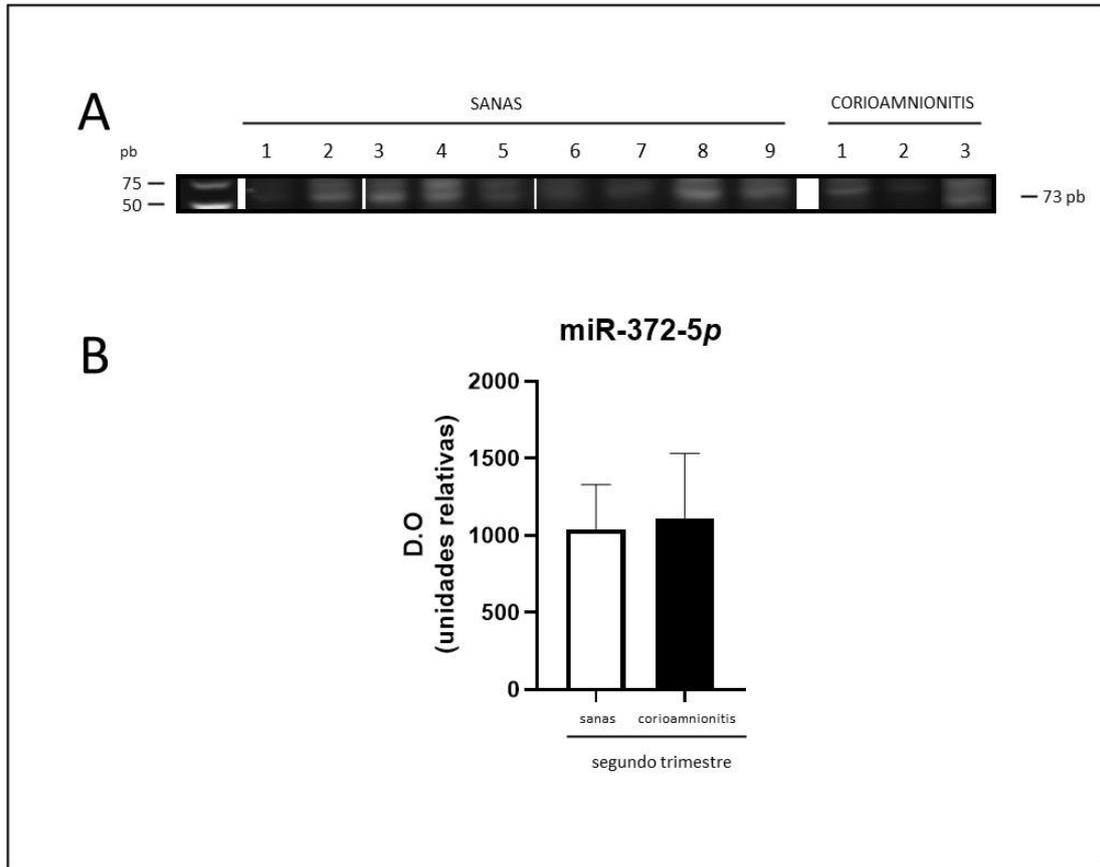


Figura 2 Expresión del miR-372-5p en el suero del segundo trimestre de embarazo. (A) muestra la expresión relativa en las pacientes sanas (n=9), y en las pacientes que desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (n=3). **(B)** indica la densidad óptica (D.O) de la banda de expresión la cual fue determinada en el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. La banda de expresión tiene un tamaño molecular relativo de 73 pares de bases. Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (InvitroGene).

7.2.3 Expresión del miR-372-5p a las 30 semanas de gestación.

En las pacientes sanas encontramos que la expresión del miR-372-5p en el tercer trimestre (30.37 \pm 0.32 semanas de gestación) fue de 2176 \pm 196 la cual aumento significativamente 1.28-veces en el grupo de corioamnionitis. Entre ambos grupos encontramos una diferencia estadísticamente significativa (p=00.34; figura 3).

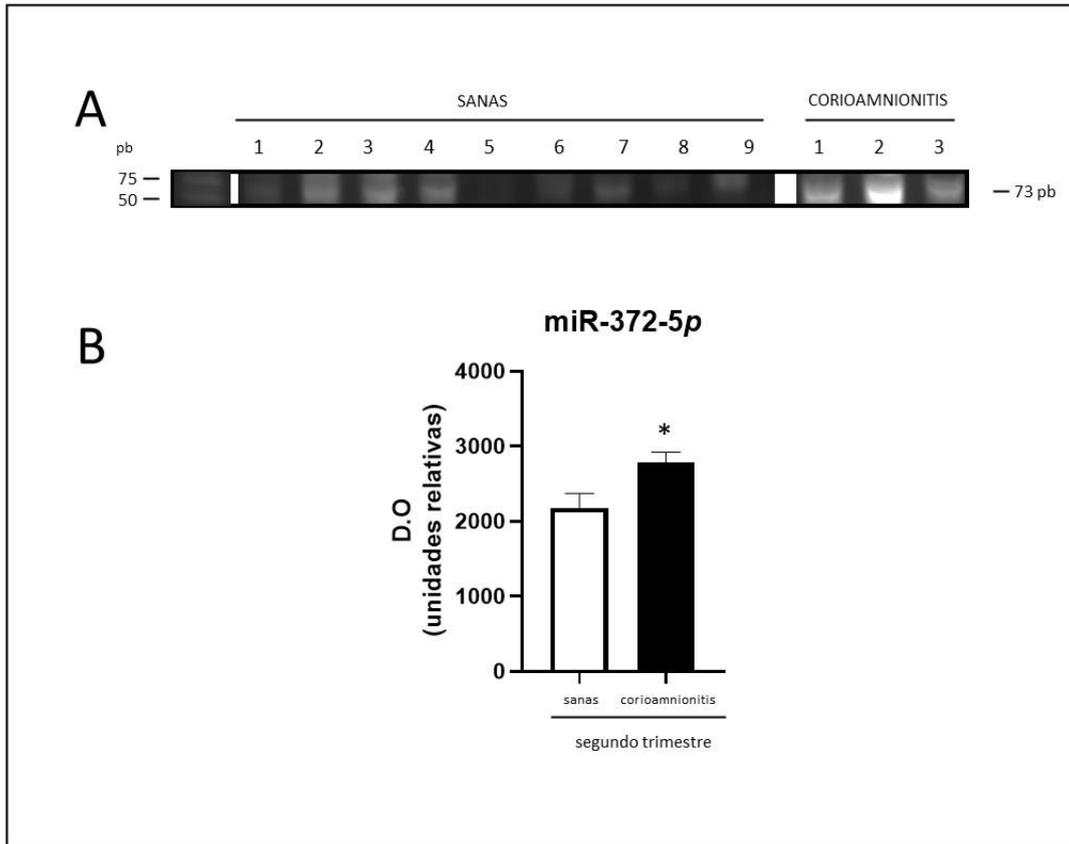


Figura 3 Expresión del miR-372-5p en el suero del tercer trimestre de embarazo. (A) muestra la expresión relativa en las pacientes sanas (n=9), y en las pacientes que desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (n=3). **(B)** indica la densidad óptica (D.O) de la banda de expresión la cual fue determinada en el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. La banda de expresión tiene un tamaño molecular relativo de 73 pares de bases. Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (InvitroGene).

8.0 DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó el aumento en los niveles séricos de miR-372-5p en pacientes con desarrollo de corioamnionitis comparado con el grupo control en las cuales se observó expresión débil. Este hallazgo es consistente con otros estudios que han reportado la detección de miRNAs en suero de pacientes y que se han asociado con la respuesta inflamatoria en diferentes enfermedades.^{15,17}

De acuerdo con lo establecido con Taganov y colaboradores se sabe que miR 372-5p es un regulador importante en la señalización de TLR-4 como parte de una respuesta inmune inflamatoria que da lugar a que se desencadenen cascadas de señalización que provocan inflamación a diferentes niveles.

Actualmente se ha obtenido el RNA de 15 pacientes en la semana 12, 30 y 30 de gestación, de las 12 pacientes se tuvieron dos grupos: 1) pacientes sanas (n=9) y pacientes con desarrollo de corioamnionitis (n=3). No se encontraron diferencias significativas entre la edad (p=0.5525), talla (p=0.3061), peso (p=0.0999), índice de masa corporal (n=0.0811), en la edad de gestación al término de su embarazo (p=0.0636).

La estandarización de las condiciones de amplificación por PCR para analizar el perfil de expresión del miR-372-5p es importante ya que nos permite tener las condiciones optimas para la alineación de PCR que permite la expresión del miR 372-5p. Los resultados indican que en el suero de pacientes con corioamnionitis existe un aumento en la expresión de miR 372-5p (p=0.034) siendo significativo en la semana 30 casi una semana antes de la presentación clínica de corioamnionitis en una de nuestras pacientes por lo que sugiere podría ser un biomarcador temprano.

9.0 CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados sugieren que el perfil de expresión de miR-372-5p podría considerarse marcador molecular temprano de corioamnionitis. Para que esto pueda

tomarse como patrón de referencia deberán emprenderse más estudios que corroboren este patrón y evalúen su eficacia.

10.0 PERSPECTIVAS

Becaria del Programa Impulso a la Investigación en Salud 2020-2021 y 2021-2022

11.0 BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Committee on Obstetric Practice. Committee Opinion No. 712: Intrapartum Management of Intraamniotic Infection. *Obstetrics and Gynecology* 2017; 130; e95.
- 2.- Higgins R. Evaluation and Management of Women and Newborns with a Maternal Diagnosis of Chorioamnionitis: Summary of Workshop, 2016 March; 127 (3);426-436.
- 3.-Hurtado M. Criterios actuales en el diagnóstico y manejo de la corioamnionitis, *Rev. Latin. Perinat*, 2018;21(1);11-19.
- 4.-Peng C. Intrauterine Inflammation, infection or both (Triple I): A new concept for choriamnionitis. *Pediatrics and Neonatology*; 2017 September 19; 59;231-237.
- 5.-Randis T. Chorioamnionitis: Time for new approach. *Curr opinio Pediatr*, 2017 April; 29(2),159-164.
- 6.-Myntti T. Amniotic Fluid Biomarkers in the diagnosis of intra-amniotic infection in preterm singleton pregnancies, University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Finland, 2017, 1-90.
- 7.- Clark Johnsn, Antibiotic Therapy for Chorioamnionitis to Reduce the Global Burden of Associated Disease, *Obstetric and Pediatric Pharmacology*, 2017 March 14; 8 (97); 1-6
- 8.-Cataño P. Validation of diagnostic tests for histologic Choriamnionitis: Systematic review and meta-analisis, *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018 June 09; 228;1-35.
- 9.-García-Rodríguez AM, Sánchez-González CM, OsorioCaballero M, Díaz NF, Flores-Herrera H. Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno. *Ginecol Obstet Mex* 2018 marzo;86(3):174-185. DOI: <https://doi.org/10.24245/gom.v86i3.1809>

- 10.-Kikhney J. Is *Ureaplasma* spp. The leading causative agent of chorioamnionitis in women with preterm birth?, *Clinical microbiology and infection*, 2017 February ; 23(2), 119.e1-119e7.
- 11.-Joon K. Twenty- four percent of patients with clinical chorioamnionitis in preterm gestations have no evidence of either culture-proven intraamniotic infection or intraamniotic inflammation, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2017 June, 216 (6), 604.e1-604.211.
- 12.-Lilia R. Complications of pregnancy: premature rupture of membranes, chorioamnionitis, amnioinfusion prenatal administration of surfactant, *International Journal of Pregnancy and Child Birth*; 2018 January 29, 4 (1), 48-60.
- 13.- Sweeney E. The Human *Ureaplasma* Species as causative agents of Chorioamnionitis, *American Society For Microbiology*; 2017 January, 30 (1), 349-379.
- 14.-. Romero R, Chaemsaihong P, Korzeniewski SJ, et al. Clinical chorioamnionitis at term III: how well do clinical criteria perform in the identification of proven intra-amniotic infection? *J Perinat Med* 2016;44:23–32.
- 15.-Venkatesh KK, Glover AV, Vladutiu CJ, Stamilio DM. Association of chorioamnionitis and its duration with adverse maternal outcomes by mode of delivery: a cohort study. *BJOG* 2019;126:719–27
- 16.-Conti N. Term Histologic Chorioamnionitis: A heterogeneous Condition, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2015 February 19;188; 34-38.
17. Romero R, Miranda J, Kusanovic JP, et al. Clinical chorioamnionitis at term I: microbiology of the amniotic cavity using cultivation and molecular techniques. *J Perinat Med* 2015;43: 19–36
- 18.-Venegas M. Antibioticoterapia en Coriomnionitis, *Revista Obstetricia y Ginecologia*;2013 8 (1), 49-54.
- 19.- Ericson J. Chorioamnionitis Implications for Neonate, *Clin. Perinatology* ;2015,42,155–165
20. Splichal I, Trebichavsky I. Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections. *Folia Microbiol.* 2001; 46(4): 345-51. 10.
- 21.Sato BL, Collier ES, Vermudez SA, Junker AD, Kendal-Wright CE. Human amnion mesenchymal cells are pro-inflammatory when activated by the Toll-like receptor 2/6 ligand, macrophage-activating lipoprotein-2. *Placenta.* 2016; 44: 69-79

- 22.- Chong J. Acute Chorioamnionitis and Funisitis Definition, Pathologic features, and clinical significance, *AJOG*, 2015 October; s29-s52
23. Higgins RD, Saade G, Polin RA, et al. Evaluation and management of women and newborns with a maternal diagnosis of chorioamnionitis: summary of a workshop. *Obstet Gynecol* 2016;127:426–36
- 24.- Burke C. Chorioamnionitis at Term Definition, Diagnosis, and Implications for Practice, *J. Perinat. Neonat*, 2016 January 26 30 (2), 106-114.
- 25.- T Myntti. Amniotic fluid rapid biomarkers are associated with intra-amniotic infection in preterm pregnancies regardless of the membrane status. *Journal of Perinatology* ,2016, 36, 606–611.
- 26.- Johnson C. Current Management and Long- term Outcomes following chorioamnionitis, *Obstetric and Gynecology Clin.*, 2014;41;649-669.
27. Merrick WC. Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *J Biol Chem*. 2010;285(28):21197-201
28. Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. *Biochem J*. 1990;270(2):281-9
29. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*. 2004;36(1):40-5
30. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci*. 2002;11(9):2067-79.
31. Maraia RJ, Arimbasseri AG. Factors That Shape Eukaryotic tRNAsomes: Processing, Modification and Anticodon-Codon Use. *Biomolecules*. 2017;7(1).
- 32.- Tsochandaridis Marthe, Nasca Laurent. Circulating MicroRNAs as Clinical Biomarkers in the Predictions of Pregnancy Complications. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 294954. doi: 10.1155/2015/294954
- 33.- Cretoiu Dragos, Jiahong Xu Jiahong et al. Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Dis Markers*. 2016; 2016: 3851054. doi: 10.1155/2016/3851054
- 34.- Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 9(6): 703-711.

35. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(2): 111-22

36. García-Rodríguez AM, Sánchez-González CM, OsorioCaballero M, Díaz NF, Flores-Herrera H. Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno. *Ginecol Obstet Mex* 2018 marzo;86(3):174-185. DOI: <https://doi.org/10.24245/gom.v86i3.1809>

ANEXO 1

Registro del proyecto institucional



Instituto Nacional de Perinatología
Isidro Espinosa de los Reyes

Dirección General

"2013, Año de la Lealtad Institucional, y Centenario del Ejército Mexicano"

1000.2013:- 000699

México, D.F., a 01 de Octubre de 2013

M. en C. Héctor Flores Herrera
Investigador en Ciencia Médica "C"
Adscrito al Departamento de Inmuno-Bioquímica

Me es grato informar a Usted, y a su grupo de colaboradores, que las Comisiones de Investigación y Ética en Investigación han revisado y emitido el dictamen correspondiente a su proyecto:

"Perfil de secreción de las proteínas de choque térmico y determinación de la expresión de microRNAs en pacientes con desarrollo de preeclampsia"

ACEPTADO

Registro: 212250-3210091

En cuanto al monto económico solicitado por Usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos federales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los recursos entregados por agencias financiadoras externas.

Me permito hacer de su conocimiento que al término del desarrollo de este proyecto Usted deberá entregar un **informe técnico final**, (según el formato institucional) disponible en www.inper.mx/investigacion.html, para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

Dr. Javier Mancilla Ramirez
Director General



TEXTO DECLARATORIO

Estimada señora:

Por medio de la presente le informamos que en el departamento de Inmunobioquímica de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

PERFIL DE SECRECIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TERMICO Y DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE microRNAs EN PACIENTES CON DESARROLLO DE PREECLAMPSIA.

La preeclampsia es una enfermedad del embarazo y está asociada con los nacimientos antes de llegar a término del embarazo y está asociada con enfermedades de la mamá y del bebé. La preeclampsia, se presenta después de la semana 20 de gestación y clínicamente se manifiesta por la elevación de la presión arterial, dolores de cabeza y problemas visuales.

El principal objetivo de este estudio es cuantificar el incremento de proteínas que están relacionadas con el desarrollo de la preeclampsia.

El estudio consiste en

1. Se le limpiará la zona del antebrazo para tomarle 5 mililitros de sangre, este procedimiento será realizado por el personal médico responsable del Instituto y no representa ningún riesgo para usted.
2. La muestra será analizada en el departamento de Inmunobioquímica de este Instituto donde se determinará la concentración de proteínas asociadas a la preeclampsia.

Su participación en este estudio permitiría contribuir en forma importante a la comprensión del desarrollo de la preeclampsia. En caso de que usted no acepte participar, **no tendrá ninguna repercusión** en la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto, ni tampoco se incrementará el costo de la atención médica que ambos reciban. Así mismo le informamos que usted tiene la libertad de retirarse del estudio sin que tenga ningún efecto sobre la atención médica de usted o de su bebé.

Este estudio no producirá **ningún costo adicional**; así mismo, le informamos que a usted no se le remunerará por su participación. La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será usada sólo para fines de investigación.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con el M en C. Héctor Flores Herrera al teléfono 55 20 99 00 Ext 222 de Lunes a Viernes de 8:00 am a 4:00 pm. También será atendida vía correo electrónico en la dirección floresh8@yahoo.com

Dr. Alejandro Martínez Juárez
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Instituto Nacional de Perinatología
Tel 5520 9900 extensión 316

M. en C. Héctor Flores Herrera
Investigador del proyecto
Instituto Nacional de Perinatología
Tel 5520 9900 extensión 222
Correo electrónico: floresh8@yahoo.com