

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

**COORDINACION DE
POSGRADO E INVESTIGACION**



“Detección de múltiples marcadores moleculares para el diagnóstico de la preeclampsia”

“TESIS”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
MEDICINA MOLECULAR**

Que presenta:

IBT. Alyn Flores Herrerías

Director de tesis:

Dra. Vera Lucia Petricevich.

Asesor de tesis:

Dr. Gabriel Guillen Solís.

Lugar y fecha de la realización de la tesis:

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Medicina. (2016-2018)

Grupo QUAE, laboratorio de Diagnóstico Molecular. (2016-2017)

GENO+, Laboratorio de especialidades Genómicas. (2017-2018)

Miembros del comité tutorial:

Dra. Vera Lucia Petricevich (tutor principal).

Dr. Gabriel Guillen Solís (Co-tutor).

Dr. Jesús SantaOlalla Tapia (tutor personal).

Dr. Joaquín Sánchez Castillo.

Dr. León Pérez Carrillo.

Miembros del jurado de examen:

Dr. Jesús SantaOlalla Tapia (Presidente)

Dr. David Martínez Duncker Ramírez (Secretario)

Dra. María Angélica Santana Calderón (Primer Vocal)

Dr. León Pérez Carrillo (Segundo vocal)

Dra. Vera Lucia Petricevich (Tercer vocal)

Agradecimiento de fuentes de financiamiento:

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT- México) por la beca otorgada en estos dos años de la maestría (2016-2018).

Al programa de Fortalecimiento académico para Indígenas. Apoyos complementarios a mujeres Indígenas Becarias CONACyT 2017-1.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes: Familia, amigos y personas especiales en mi vida, que significan mucho para mí en esta etapa de mi existir, he logrado concluir con esfuerzo y éxito un proyecto que en el último escalón como sabrán mi nueva condición de vida me ha convertido en una guerrera de EII, apoyada en todo momento por ustedes que no son nada más y nada menos que un conjunto de seres queridos que benefician completamente en mis circunstancias de humana, es por ello que no puedo sentirme más amena con la confianza y la creencia que han puesto sobre mi persona, agradezco nuevamente por ser personas de bien, seres que emanan amor, por los grandes lotes de felicidad y los finos deleites de esta vida.

Por todo esto y más, es cuánto...

Contenido

Índice de tablas.....	6
Índice de figuras.....	7
Glosario.....	8
RESUMEN.....	9
Introducción	10
Epidemiología.....	10
Factores de riesgo	11
Etiología.....	13
Fisiopatología	14
Diagnóstico.....	20
Métodos de predicción en Preeclampsia.....	22
Redes de Interacción.....	27
Planteamiento del problema	29
Objetivos	30
General.....	30
Particulares	30
Hipótesis.....	31
Diseño del estudio.....	32
Materiales y Métodos	32
Metodología del estudio.....	32
Muestras biológicas	33
Criterios de inclusión y exclusión	33
Procesamiento de las muestras y consentimiento informado	33
Aspectos éticos	33
Análisis de la información	34
Bioinformática.....	34
Redes de interacción.....	34
Estudio biológico de genes en GeneOntology.	34
Patogénesis con Pathway Studio.....	35
Redes interacción de proteínas.....	35

Diseño de oligonucleótidos.....	35
Amplificación por Reacción de la cadena de la polimerasa	36
Secuenciación y alineamiento.....	40
Validación de paquete tecnológico.....	40
Productos esperados.....	41
Resultados.....	42
Población de estudio y datos	42
Análisis bioinformático.....	43
Amplificación por Reacción de la cadena de la polimerasa	63
Secuenciación y alineamiento.....	68
Discusión	74
Conclusiones	77
Referencias bibliográficas	78
ANEXOS	82
1. Encuesta para pacientes	82
2. Carta de consentimiento del paciente	83

Índice de tablas

Tabla 1: Factores de riesgo de la PE.	12
Tabla 2: Clasificación de los trastornos hipertensivos gestacionales.....	17
Tabla 3: Criterios para clasificación y diagnóstico de PE.....	18
Tabla 4: Principales causas de mortalidad materna de acuerdo con la OMS.....	18
Tabla 5: Signos potenciales y síntomas de preeclampsia.....	20
Tabla 6: Criterios diagnósticos de Preeclampsia-Eclampsia.....	21
Tabla 7: Marcadores bioquímicos para la PE.	25
Tabla 8: Protocolo de amplificación para PCR.....	36
Tabla 9: Protocolo de amplificación para multiplex PCR.....	38
Tabla 10: Protocolo de amplificación para multiplex PCR.....	39
Tabla 11: Características de mujeres incluidas en el estudio.	42
Tabla 12: Metaanálisis de asociación de los polimorfismos seleccionados de PE.....	42
Tabla 13: Genes identificados para los SNPs de PE	44
Tabla 14: Tabla de porcentajes de proceso biológico con clase de proteínas.	46
Tabla 15: Tabla de nombres de genes con sus respectivas descripciones.....	48
Tabla 16: Primers diseñados por grupo QUAE.	62
Tabla 17: Frecuencias alélicas de los rs en pacientes control	69
Tabla 18: Frecuencias alélicas de los rs en pacientes con preeclampsia.....	71
Tabla 19: Odds Ratio para los polimorfismos genéticos de PE.....	73

Índice de figuras

Figura. 1: Etiología de la preeclampsia.....	16
Figura. 2: Etiología, fisiopatología y manifestaciones clínicas de la PE..	20
Figura. 3: Clasificación de los SNPs funcionales..	27
Figura. 4: Resultados de función biológica por GeneOntology para los SNPs de preeclampsia.....	45
Figura 5: Interactoma circular de Gene Manía para los SNPs de preeclampsia.	51
Figura 6: Total de interacción de los nodos por GeneOntology entre los genes para PE.	52
Figura 7: Porcentaje de redes en GeneOntology para las proteínas de preeclampsia.	52
Figura 8: Patogénesis asociadas a PE por PathwayStudio	53
Figura 9: Mapa de interacción de la patogénesis de endometriosis asociada a los genes de PE	54
Figura 10: Mapa de interacción de la patogénesis de diabetes mellitus tipo II asociada a los genes de PE	55
Figura 11: Mapa de interacción de la patogénesis de aterosclerosis asociada a los genes de PE.....	56
Figura 12: Mapa de interacción de la patogénesis de degenerativa macular relacionada con la edad asociada a los genes de PE	57
Figura 13: Mapa de interacción de la patogénesis de obesidad asociada a los genes de PE..	58
Figura 14: Distribución de SNPs funcionales para PE: cSNP, rsSNP y rSNP.....	59
Figura. 15: Efecto funcional de los rSNP propuesto por Ramírez-Bello et al, 2013. UTR: región no traducida.....	60
Figura 16: Distribución del efecto funcional de rSNP de 105rs para PE.	61
Figura. 17: Distribución del efecto funcional de rSNP de 42rs para PE.....	61
Figura 18: Protocolo en el software de miniPCR 1.6.....	63
Figura. 19: geles de agarosa 1% con 3rs.	64
Figura 20: gel 1 de agarosa 1% con 3rs.	65
Figura 21: gel 2 de agarosa 1% con 3rs.	65
Figura 22: gel 3 de agarosa 1% con 3rs.	66
Figura 23: gel 4 de agarosa 1% con 3rs.	66
Figura 24: geles de agarosa 1% con productos de PCR multiplex con 3rs.....	67

Glosario

OMS	Organización mundial de la salud
PE	Preeclampsia
IMSS	Instituto del Seguro Social
IMC	Índice de Masa Corporal
Th1	linfocitos T helper 1
TNF-a	Factor de necrosis tumoral alfa
HELLP	Hemolisis, elevación de enzimas hepáticas, trombocitopenia
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
NKB	proteína -neurokinina B
TXA2	Tromboxano A2
PGI ₂	Prostaciclina
mg	Miligramos
dL	Decilitros
mmHg	Milímetros de mercurio
g	Gramos
hr	Hora
PCR	Reacción en la cadena de la polimerasa
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Cbs	Códigos de barra
DT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional

RESUMEN

En las últimas décadas un problema de salud pública presentado en países desarrollados principalmente en población de embarazadas es el riesgo de padecer preeclampsia (PE), que es de etiología desconocida y considerada un trastorno multisistémico más temibles del embarazo. El objetivo es el diseño y desarrollo del diagnóstico molecular a través de marcadores moleculares asociados a la PE. La investigación está dividida en tres etapas, primero se propone el análisis de los polimorfismos asociados con herramientas bioinformáticas, en la segunda se propone el diseño de los oligonucleótidos de los SNPs elegidos, y por último la validación de paquete tecnológico. Los resultados evidenciaron la presencia de 105 polimorfismos distribuidos en 95 genes y 45 tienen asignado un proceso biológico en la clasificación de “Gene Ontology”. La interacción molecular se determinó analizando las redes de interactoma, identificando los nodos para cada gen y el porcentaje de análisis de redes señaladas como: expresión, interacciones físicas, localización, dominios compartidos de la proteína, interacciones genéticas y rutas, así como la clasificación de las funciones en tres aspectos: Función molecular, componente celular y proceso biológico. Además, se realizó la elección de 42 SNPs para ser sintetizados y evaluados por frecuencias alélicas y “Razón de momios” en alrededor de 96 pacientes de las cuales solo 6 pacientes fueron identificadas al inicio del estudio con PE, a pesar de ser una cantidad muy pequeña se pudo evaluar la presencia de la mayoría de los SNPs identificados en investigaciones previas y metaanálisis desarrollada, donde se evidencia la presencia de esos SNPs en PE, sin embargo en perspectiva es fundamental obtener y reproducir el estudio con un mayor número de personas con PE, sin embargo a pesar de la cantidad de muestra, de manera *in silico* estratégicamente se pudo identificar las enfermedades asociadas con los genes de PE, la distribución de los SNPs funcionales y su efecto, logrando además de manera reproducible y económica mediante herramientas moleculares el desarrollo del paquete tecnológico con PCR multiplex y en efecto cumplir en gran parte con la finalidad de este proyecto, que mediante marcadores moleculares se pueda determinar el factor de riesgo a padecer la

PE, y su aplicación puede contribuir a establecer la historia de la PE siendo una herramienta efectiva para el médico y atender con un tratamiento eficaz, disminuyendo la gravedad y tasas de morbimortalidad.

Introducción

La preeclampsia (PE) o toxemia gravídica, es un trastorno multisistémico de etiología desconocida, considerada una de las complicaciones más temibles del embarazo, representa una de las causas principales de morbilidad y mortalidad materna y perinatal a nivel mundial, estas muertes se deben principalmente a eclampsia, hipertensión no controlada o inflamación sistémica⁶, afectando a más de 8 millones de mujeres cada año, según el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG) en el 2013 esta complicación medica se diagnostica con hipertensión en asociación con trombocitopenia, insuficiencia hepática, desarrollo de insuficiencia renal de Novo, edema pulmonar, alteraciones cerebrales o visuales de Novo, provocando daños tanto en la madre como en el desarrollo del bebe ocasionando problemas en órganos y sistemas como el nervioso central, hígado, corazón, riñón y en la coagulación, que si no se trata puede llevar a complicaciones fatales para ambos. Actualmente existen pruebas de diagnóstico para la PE sin embargo no son de detección temprana del tipo universal, reproducible y económica⁴¹.

Epidemiología

Actualmente se estiman que cada año se producen aproximadamente 530 000 muertes maternas, ocurridos mayormente en países en desarrollo, entre las causas directas de la mortalidad materna son las hemorragias, las infecciones y los trastornos hipertensivos (preeclampsia/eclampsia), estos últimos considerados mundialmente como una de las principales causas de 12% al 25% del total de la mortalidad materna, fetal y neonatal y como una de las primeras complicaciones médicas en muchos países²⁹. Sin embargo, en los países desarrollados las tasas de morbilidad y mortalidad materna asociadas a esta enfermedad hipertensiva han disminuido, siendo lo contrario

en los países en vías de desarrollo en donde existen mayores rezagos, carencia de servicios de salud básicos y especializados, además de deficiencia alta de autocuidado de salud en la población.

En México en el 2004, la Dirección General de Información en Salud de la Secretaría de Salud, reportó que el 29.5% del total de las defunciones en mortalidad materna corresponde a trastornos hipertensivos, además se considera que este porcentaje varía en cada una de las entidades federativas, existiendo entidades en donde representa más de la mitad del total de sus defunciones. Por otra parte, en el 2005 el Sistema Nacional de Salud de México, reportó 1,242 defunciones maternas, de las cuales una tercera parte se debe a trastornos hipertensivos durante el embarazo, representando el 34% del total de las muertes maternas.

La OMS estima que la PE es siete veces mayor en los países en desarrollo que en los desarrollados, se calcula que cada siete minutos muere una mujer por esta enfermedad^{18,34,39}. En México los datos son más alarmantes ya que de acuerdo con la Secretaría de Salud la preeclampsia/eclampsia representa hasta el 34% del total de las muertes maternas por lo que se considera la principal causa de muerte asociada a complicaciones de embarazo. En nuestro país, la atención de salud materna se lleva a cabo por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reporta que las principales causas de muerte materna que se mantuvieron a lo largo del periodo estudiado fueron la PE, eclampsia, hemorragia obstétrica y la tromboembolia pulmonar³⁶. Dentro de la Mortalidad Materna, la PE es considerada una de las enfermedades más complejas en el ser humano por presentar datos clínicos y de laboratorio en donde la patogénesis varía dependiendo de factores de riesgo previos.

Factores de riesgo

Mundialmente se han identificado los posibles factores de riesgo asociados al desarrollo de la PE: antecedentes de diabetes e hipertensión arterial, obesidad, primigravidez, cambio de paternidad, antecedentes familiares o enfermedades preexistentes, edad materna joven (<20 años), edad avanzada (<35 años), índice de

masa corporal aumentada, embarazo múltiple, etc., estos factores se han identificado con el fin de determinar qué mujeres tienen mayor riesgo²⁷. Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar estos factores de riesgo que millones de mujeres en el mundo los tienen y no desarrollan preeclampsia. Además, también existen algunas consideraciones por parte del padre que pueden contribuir como factores de riesgo (tabla 1).

Tabla 1: Factores de riesgo de la PE.

Factores maternos
<i>Inherentes</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Edad <20 o 35-40 años • Nuliparidad • Antecedentes familiares o previos de PE o enfermedad cardiovascular
<i>Afecciones médicas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • IMC de 26 a > 29.9 • Hipertensión crónica • Enfermedad renal crónica • Diabetes mellitus • Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos • Enfermedades del tejido conectivo • Trombofilia
<i>Específicas del embarazo</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Gestación múltiple • Donación de ovocitos • Infección de las vías urinarias • Trastornos congénitos que afectan al feto: - mola hidatiforme, -hidrops fetal, -anomalías estructurales.
Consideraciones paternas
<ul style="list-style-type: none"> • Exposición limitada al esperma • Anticoncepción de barrera • Padre primerizo • Inseminación del donante • Origen de placenta (Persona que fue padre de otro embarazo con PE con otra mujer).

Existen otros factores que son considerados como participes en el desarrollo de la PE, como los factores inmunológicos que han sido identificados en el aumento del ADN fetal en el plasma/suero de las gestantes con PE, por otra parte los factores nutricionales donde se ha encontrado un riesgo significativo de desarrollar PE de acuerdo a la deficiencia de la ingesta de leche, también considerando los niveles de ácido ascórbico se tienen a estar reducidos en los primeros meses del embarazo en mujeres con desarrollo de PE, en mujeres que consumían diariamente menos de la cantidad recomendada de vitamina C (85mg), se observó un riesgo dos veces mayor de PE que las controles, y por último los factores genéticos que de acuerdo a la presencia polimorfismos de ciertos genes en particular pueden desarrollar complicaciones por ejemplo el flujo útero-placentario y del cordón umbilical. Se han encontrado que existen regiones en los cromosomas que poseen los genes que son favorecedores para el desarrollo de la PE. A nivel de alelos como el alelo T del gen TNF-alfa puede ocasionar un riesgo individual de PE, protegiendo contra el desarrollo de esta complicación. También se ha pensado que el ARNm del feto se incrementa en el plasma materno de la mujer con PE²⁷.

Adicionalmente a los factores antes mencionados que favorecen el desarrollo de la PE, existen otros factores considerados protectores que tienden a reducir el riesgo de padecer PE, entre los que destacan: los Antecedentes de embarazos a término, Suplementos vitamínicos (vitaminas C y E), uso de Aspirina en mujeres con historia de PE anterior dando un pequeño beneficio en el grupo de mujeres con riesgo, y finalmente la Actividad Física²⁷.

Etiología

La preeclampsia-eclampsia es un trastorno hipertensivo de origen placentario que actualmente se desconoce cuál es la naturaleza exacta del acontecimiento primario que causa la PE, se han considerado que es de origen multifactorial, donde se incluyen alteraciones en placenta, vasculares, genéticas, metabólicas, renales, hepáticas,

hematológicas, inmunológicas, o mixtas asumiendo factores culturales, geográficos, sociales y económicos²⁹.

Según los lineamientos técnicos del centro nacional de equidad de género y salud reproductiva en el 2007 menciona que últimamente con el desarrollo científico y su avance en el campo de la biología molecular y la genética, se han podido deducir algunas de las teorías del desarrollo de la PE, demostrando con eventos moleculares que la fisiopatología de la PE tiende a ser similar con las interacciones enzimáticas que están presentes en las respuestas inflamatorias, que a su vez existe intervención de los diferentes factores de crecimiento transformadores y citocinas. También se ha confirmado que existen factores de riesgo preconceptionales y conceptionales que favorecen tanto la aparición de la preeclampsia como de sus complicaciones.

Entre las perspectivas se espera logran avances en el conocimiento de biomarcadores útiles para la predicción temprana de la PE con el fin de evitar complicaciones maternas y fetales. De manera preventiva se espera en un futuro que la evidencia medica corrobore la utilidad de medicamentos o suplementos que tiendan a evitar la aparición de la Preeclampsia-eclampsia y que los estudios de los genes avancen en el establecimiento de identificar con precisión los genes implicados en la aparición de estos padecimientos maternos²⁹.

Fisiopatología

La PE se caracteriza por acontecer en la segunda mitad del embarazo dependiendo de los cambios en el organismo ocurridos en la primera mitad, por lo que es importante que en la placenta sucedan una serie de acontecimientos que conlleven a una deficiencia vascularización en la placenta, Durante la "oleada trofoblástica" de la placenta, se produce una invasión de las arterias espirales maternas endometriales por el trofoblasto fetal, de tal manera que los vasos sanguíneos modifican su capa muscular

y se dilatan, y su flujo sanguíneo aumenta. Esto acontece en dos tiempos en la 6-12 semanas de gestación llamada "primera oleada" y en 14-20 semanas denominada "segunda oleada".

El segundo paso etiopatogénico, la disminución de los niveles de O₂ placentario debido a su deficiente circulación genera una serie de respuestas, por diferentes factores liberados al torrente sanguíneo materno, que provocan una reacción inflamatoria y daño vascular a nivel placentario y sistémico materno¹⁴. Existe, además, elevación de las resistencias vasculares sistémicas, activación de la cascada de la coagulación e incremento de la agregación plaquetaria. También se considera a la PE como un síndrome inflamatorio sistémico y un síndrome metabólico debido a que comparte aspectos fisiopatológicos y morfológicos. (Figura 1)³⁷.

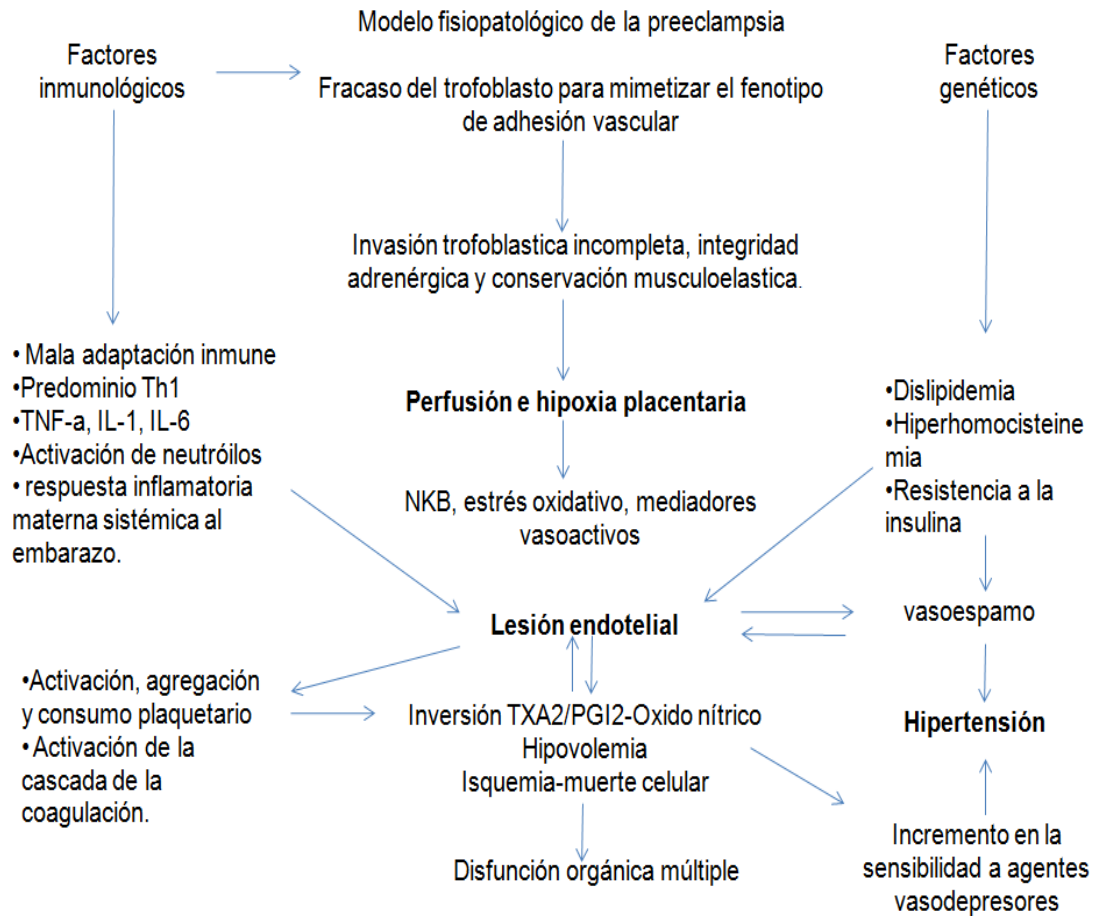


Figura. 1: Etiología de la preeclampsia. Es desconocida, sin embargo, la invasión incompleta del trofoblasto se ha constituido en un punto de confluencia entre las diversas teorías que pretenden explicar su etiopatogenia. El sustrato genético y las alteraciones inmunológicas participan en la formación de un síndrome inflamatorio y metabólico caracterizado por lesión endotelial como centro fisiopatológico que se evidencia clínicamente en la forma de hipertensión, proteinuria, alteraciones de la coagulación e hipoperfusión tisular generalizada, que puede conducir finalmente a la disfunción orgánica múltiple y eventualmente a la muerte materna y/o perinatal³⁷.

En México, según el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC) y la Guía Práctica Clínica de Trastornos Hipertensivos del Embarazo del 2013 (GPC), han tomado múltiples escenarios para la clasificación y diagnóstico de

los trastornos hipertensivos del embarazo como: hipertensión presente antes del embarazo, diagnóstico por primera vez durante el embarazo o hipertensión evidente durante el trabajo de parto o en el posparto. La clasificación de los trastornos hipertensivos gestacionales está basada en el momento de la presentación y en las dos más comunes manifestaciones de la PE: Hipertensión arterial y proteinuria, de acuerdo con los valores de tensión arterial y edad gestacional (Tabla 2)⁸.

Tabla 2: Clasificación de los trastornos hipertensivos gestacionales.

Presentación antes de las 20 semanas	<ul style="list-style-type: none"> • Embarazo molar/embarazo múltiple • Hipertensión arterial crónica • Hipertensión arterial crónica con preeclampsia sobreañadida.
Presentación después de las 20 semanas	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión gestacional. • Preeclampsia. • Eclampsia.

La CENETEC de acuerdo con su Algoritmo en el manejo de las enfermedades hipertensivas del embarazo, en pacientes con tensión arterial detectadas con Proteinuria y PE, hace una clasificación de la PE de acuerdo con la tensión arterial en PE leve y PE severa. Esta clasificación coincide con la clasificación de GPC de Trastornos Hipertensivos del Embarazo y la Secretaría de Salud, los criterios de clasificación se muestran en la siguiente tabla (Tabla 3)^{24,29}.

Tabla 3: Criterios para clasificación y diagnóstico de PE.

PE	Tensión arterial [mm Hg]		Proteinuria	Otros
	Sistólica	Diastólica		
Leve	> 140	> 90	> 300 mg o > 30mg/dL	No evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasmo persistente.
Severa	> 160	> 110	> 2g	-Oliguria: diuresis < de 500ml en 24 hrs -Creatinina sérica > 1.2 mg/dl -Trastornos cerebrales severos persistentes o alteraciones visuales -Edema agudo pulmonar -Dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho del abdomen -Disfunción hepática (TGO> 70/UI). -Trombocitopenia (< 100,000 mm ³) -Coagulación intravascular diseminada -RCIU

Las principales causas de muerte materna de acuerdo con la OMS se han determinado por los registros que se tienen sobre las mismas como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4: Principales causas de mortalidad materna de acuerdo con la OMS.

Causas	%
Condiciones médicas preexistentes agravadas por el embarazo	28
Hemorragias graves	27
Hipertensión inducida por el embarazo	14

Infecciones (después del parto)	11
Parto obstruido y otras causas directas	9
Complicaciones de un aborto	8
Coágulos de sangre (embolias)	3

En la actualidad el único tratamiento efectivo para la PE es la interrupción del embarazo, del 15 al 23% de los nacimientos pretérmino están indicados medicamente por PE¹.

Sin embargo, a pesar de las investigaciones que se ha realizado para conocer la etiología de la PE, ésta es aún desconocida. Se piensa que la placenta tiene un papel fundamental en su patogénesis, en gran parte debido a que los signos y síntomas clínicos desaparecen una vez que se interrumpe el embarazo, Los diferentes estudios clínicos y moleculares recientes, permiten avanzar en las posibles explicaciones de la patogénesis de la enfermedad, entre las más importantes están: la adaptación inmunológica inadecuada y la isquemia placentaria (Figura 2)²⁷.

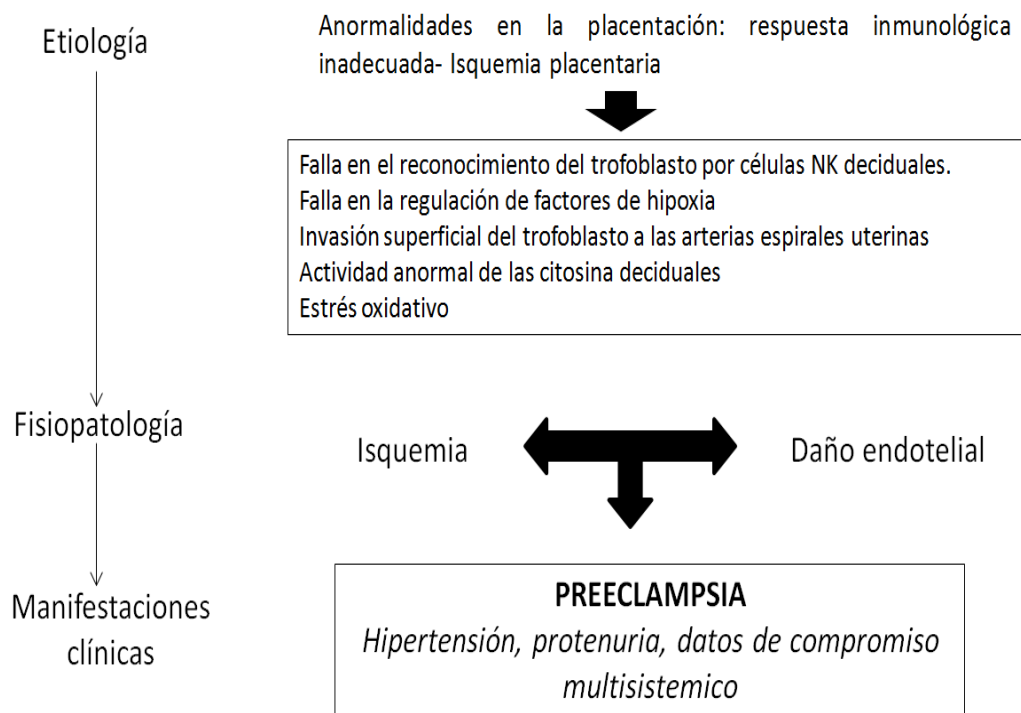


Figura. 2: *Etiología, fisiopatología y manifestaciones clínicas de la PE.* El reconocimiento inadecuado de las células del trofoblasto por parte de las células NK, así como la falla en la regulación de factores de hipoxia, provocan una invasión superficial del trofoblasto a las arterias espirales uterinas, una falta de remodelación, actividad anormal de citocinas, inflamación y estrés oxidativo que generan isquemia, daño endotelial y finalmente hipertensión, proteinuria, así como algunos otros datos de compromiso multisistémico.

Diagnóstico

En la Guía de Referencia Rápida del Consejo de seguridad General (GPC IMSS-586-12) mencionan que cuando la PE se presenta generalmente después de las 20 semanas de gestación y se diagnostica por hipertensión y proteinuria, puede estar asociado por un conjunto de signos y síntomas entre los que se incluyen: alteraciones visuales, cefalea, dolor abdominal, náusea, vómito y edema, así como alteraciones Bioquímicas (Tabla 5).

Tabla 5: *Signos potenciales y síntomas de preeclampsia.*

Sistema nervioso central: hiperexcitibilidad, hiperreflexia, cefalea, alteración de la visión y convulsiones (eclampsia).
Sistema cardiovascular: estado hiperdinámico temprano que puede cambiar a elevada resistencia vascular total, depleción del volumen intravascular.
Sistema hematológico: hipercoagulabilidad, activación plaquetaria con consumo microvascular, activación del sistema fibrinolítico.
Sistema renal: disminución de la tasa de filtración glomerular, aumento de la proteinuria, aumento de ácido úrico, oliguria.
Hepático: aumento de transaminasas en suero, edema hepático/dolor en el cuadrante abdominal superior derecho, ruptura de la capsula de Glisson con hemorragia hepática.
Sistema endocrino: desequilibrio de la Prostaciclina con respecto al Tromboxano, alteración de sistema renina-angiotensina-aldosterona.
Sistema uteroplacentario: persistencia de un circuito de alta resistencia con disminución del flujo sanguíneo, restricción del crecimiento intrauterino.

Los criterios diagnósticos de PE incluyen: presión arterial iguales o mayores de 140/90 mmHg que ocurre después de las 20 semanas de gestación, en mujeres con presión arterial previamente normal (Tabla 6).

Tabla 6: Criterios diagnósticos de Preeclampsia-Eclampsia.

Preeclampsia leve:	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión: (presión arterial sistólica > 140/mmHg o presión arterial diastólica >90mmHg). • Proteinuria (>30mmg/24 horas o aumento significativo desde el valor basal).
Preeclampsia grave si uno o más de los siguientes:	<ul style="list-style-type: none"> • Presión arterial sistólica sostenida > 160mmHg o presión arterial diastólica >110mmHg (medida dos veces con seis horas de diferencia). • Evidencia de otro daño de órganos diana:

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Deterioro de la función renal, incluyendo proteinuria en rango nefrótico, oliguria súbita, elevación de creatinina. ➤ Alteración del sistema nervioso central (alteración de la visión, cefalea). ➤ Edema pulmonar (3% de los pacientes). ➤ Disfunción hepática ➤ Dolor epigástrico/dolor en el cuadrante superior derecho. ➤ Trombocitopenia (15%-30% de los pacientes). ➤ HELLP.
--	--

Cuando la PE ocurre antes de las 20 semanas, se relaciona con embarazos múltiples y mola hidatiforme³⁷.

Métodos de predicción en Preeclampsia

Historia clínica

La detección clínica de factores de riesgo antes y después del embarazo, tienden eventualmente ayudar a realizar una prevención para esta patología en estudio detectando a las mujeres que tienen mayor riesgo: La historia previa de la PE, la edad,

historia familiar, enfermedades preexistentes e intervalo gestacional, además existen otros factores como los preconceptionales y/o patológicas crónicas como la hipertensión, obesidad, diabetes mellitus tipo I y diabetes gestacional, anticuerpos antifosfolípidos entre otros; existen factores presentes durante la gestación como los embarazos múltiples, malformaciones congénitas, cromosopatías y mola hidatiforme⁷.

Presión arterial

Cuando se detecta el cambio en la presión arterial igual o mayor a 140/90 mmHg durante el embarazo, permite monitorear de forma clínica y la oportuna intervención terapéutica en la preeclampsia severa - eclampsia y la experiencia clínica sugiere que es beneficioso para la madre y el feto. La presión arterial diastólica elevada en el segundo trimestre de gestación puede ser elemental para la predicción del síndrome hipertensivos³⁸.

Doppler

La flujometría Doppler es una técnica que mide la velocidad de flujos sanguíneos y su resistencia descrita en 1983, siendo propuesta como prueba para predecir riesgo de PE, restricción del crecimiento fetal, y otros resultados perinatales adversos. El principio fisiopatológico de su uso se basa en la representación flujométrica en las arterias uterinas de una resistencia aumentada, dada por una invasión trofoblástica defectuosa y el fallo en la conversión de las arteriolas uterinas de alta resistencia a canales venosos de baja resistencia²⁶. Una de las variables es al momento de realizar el examen en diferentes edades gestacionales, la metodología empleada del examen y las definiciones de mal resultado perinatal.

La mejor capacidad diagnóstica del Doppler de arterias uterinas es la medición del índice de pulsatilidad promedio por vía transvaginal entre las 20 y 24 semanas en población de alto riesgo (incluyendo factores epidemiológicos dentro del tamizaje) para predecir PE de inicio precoz²⁶.

En recientes estudios se encontró que esta técnica puede predecir las patologías, pero si se realiza un Doppler anormal en el segundo trimestre del embarazo aumenta el riesgo de presentar PE en 6 veces, haciéndolo clínicamente relevante⁴.

Marcadores Bioquímicos

Es útil para el tamizaje de la PE, debido a que se basa en los elementos etiopatogénicos, siendo posible la identificación de los marcadores séricos o plasmáticos en distintas fases: precoz, intermedio y tardío¹². Como ejemplo la proteína placentaria 13 (PP13), que es considerado uno de los marcadores prometedores para identificar pacientes con riesgo de PE, encontrando hasta el 90% de las mujeres en riesgo, por lo tanto se puede tomar medidas necesarias protectoras de prevención. Se propone que un método es excelente predictor de la PE si detecta marcadores desde el primer trimestre, identificando diferentes aspectos del proceso de la enfermedad y se pueda incrementar la sensibilidad, como se menciona en la Tabla 7, de acuerdo con el tipo de método se puede realizar ciertos procedimientos predictivos.

Tabla 7: Marcadores bioquímicos para la PE.

Método	Procedimiento predictivo
En orina	hipocalciuria
	Calicreina/Creatinina
	micro albuminuria
	Ácido Úrico
	Calcio
Bioquímica en sangre	Inhibina A
	Activina A
	Alfa-fetoproteína
	fibronectina
	Factor de crecimiento placentario
	Factor de crecimiento endotelial vascular
	Forma soluble tirosina-quinasa
	Proteína placentaria 13
	Antitrombina
	Alipoproteína E
	Inhibidor del Activador plasminógeno
	Estrés oxidativo

Marcadores Moleculares

Son considerados una herramienta útil para explorar la diversidad genética, por lo tanto los marcadores de ADN son útiles tanto en la investigación básica y aplicada, son necesarios en muchos campos como la evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y diversidad, utilizados también para localización y aislamiento de genes de interés. Estos estudios actualmente se realizan a través de herramientas moleculares que nos permiten conocer las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta como las proteínas y de manera directa en el estudio del ADN, estos marcadores tienen la capacidad de detectar los polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante^{10,30}. Algunas de estas tecnologías basadas en el ADN son: aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD),

Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), mini satélites (VNTR) y microsátélites (SSR), entre otros³.

La investigación que se puede desarrollar con estas técnicas mencionadas es el polimorfismo de un solo nucleótido o SNP que son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN, la mayoría de SNP se localizan en las regiones no codificantes, y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), y pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Debido a su distribución tan amplia, se pueden localizar en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma, estos SNPs que poseen implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica se conocen como SNP reguladores (rSNP), por otro lado los denominados SNP ARN estructurales (srSNP), alteran la traducción de los ARN mensajeros (ARNm), la eficiencia para potenciar o inhibir el corte y empalme la estabilidad de los ARNm y la función de las proteínas (sin alterar su estructura) y por último los SNP codificantes (cSNP) que se localizan en los exones y se subdividen en sinónimos (si el cambio de nucleótido no cambia de aminoácido) y no sinónimos (si el cambio de nucleótido cambia un aminoácido) (figura 3)²³. Por lo tanto son considerados potenciales para detectar la variación genética funcional^{5,21,25}. Las variaciones deben darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Si no se llega al 1% no se considera SNP y sí una mutación puntual, además constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 1,300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano. Dos tercios de los SNP corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc.⁹

Las alteraciones de un solo nucleótido afectan a nivel genético y transcripcionales, viéndose expresadas en un proteoma específico en las diferentes regiones de las

enfermedades, alterando desde la estructura primaria de las proteínas hasta la estructura cuaternaria, siendo relevantes a nivel funcional, tanto estructural como enzimática¹³.

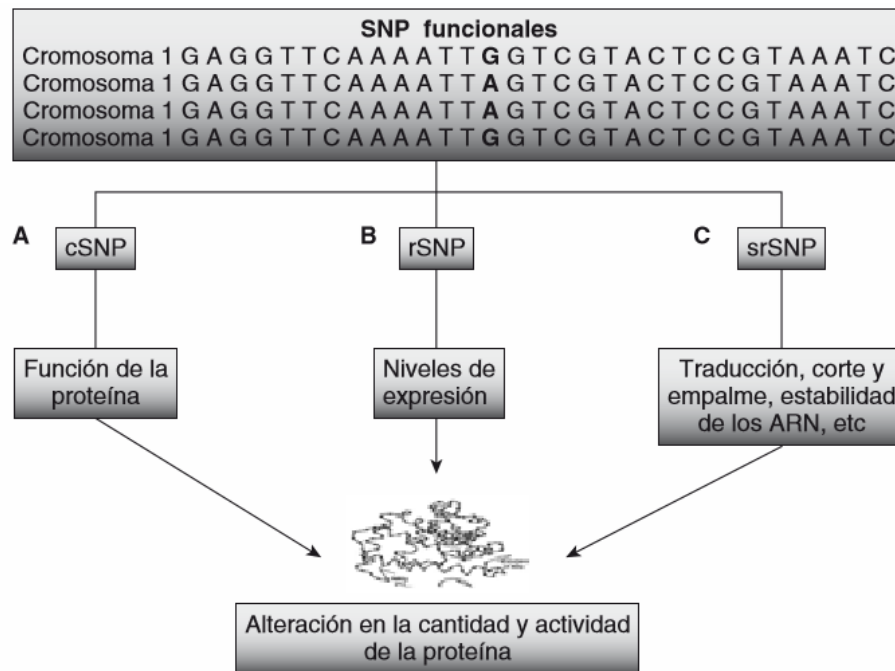


Figura. 3: Clasificación de los SNPs funcionales. *Funcionalmente los SNPs se dividen en: a) cSNP sinónimos (el nucleótido no cambia aminoácido) y no sinónimos (nucleótido cambia aminoácido) se encuentran en los exones; b) rSNP si afectan la expresión génica, y c) srSNP si afectan a la estructura y función de los ARNm de genes que sintetizan proteínas.*

Redes de Interacción

El interés del estudio global de genes expresados en ciertos organismos se ha desarrollado a partir de los resultados de secuenciación de genomas enteros, por lo tanto, la comunidad científica actualmente se enfrenta a grandes retos de identificación y caracterización de genes en organismos propuestos¹¹. La función de modo biológico de la célula no se puede atribuir únicamente a la acción individual de una sola

molécula, sino que tiene participación de interacciones globales de varios componentes celulares como las proteínas, ARN, ADN entre otras, por lo tanto, la investigación está completamente comprometida con el estudio global de organismos. A partir de la era post-genómica de dio paso a la Proteómica que tiene como fin, el estudio de todas las proteínas expresadas en el tiempo, estructuras, interacciones, función y propiedades bioquímica²⁰. Sin embargo, la Proteómica además de estudiar las interacciones de proteína-proteína, también comprende las modificaciones postraduccionales y de interacciones con secuencias, lípidos y glicanos de ADN y ARN, por lo tanto estos niveles nos pueden desarrollar en conjunto un estudio celular en redes de interacción, este tipo de investigación favorablemente es llevada a cabo por los avances en la genómica y la bioinformática. Sin embargo el análisis de las interacciones se lleva a cabo a nivel proteína con proteína, proteína con ácidos nucleicos, proteína con metabolitos y son representados a través de nodos conectados entre enlaces que representan interacciones al menos entre dos componentes. Estas redes de interacción son obtenidas a nivel informático por medio de un lenguaje matemático a un grafo².

La construcción de redes tiene la finalidad de visualizar los mecanismos moleculares de funciones biológicas de acuerdo con las interacciones dinámicas presentes entre las biomoléculas que existen en la célula, para poder tener conocimiento de estas interacciones se requiere de tecnologías de alto rendimiento que ofrecen una plataforma para trazar relaciones en escala de proteoma y del genoma. Sin embargo, los métodos computacionales no predicen con gran exactitud las uniones o interacciones de las proteína³³. Las interacciones se obtienen dependiendo de su origen pueden ser redes con o sin dirección, por ejemplo en las redes con dirección las interacciones de los nodos tienden a ser bien definidas al menos entre dos nodos, observándose en eventos de dirección del flujo de materiales de una reacción metabólica, en la regulación del gen a partir de factores de transcripción, etc. Por otro lado, en las redes que no tienen dirección, sus enlaces son de similar interacción entre los nodos involucrados.

En los últimos años los mapas de interacción propuestos han sido para genomas de virus y eucariotas. Para el año 2000 se describe la primera interacción de ruta procariota²².

Planteamiento del problema

La preeclampsia provoca daños a la madre, al hijo y son motivo de hospitalizaciones prolongadas, afectando el bienestar económico familiar. Por lo tanto, uno de los mayores retos de México, es el desarrollo de métodos confiables de predicción de enfermedades multifactoriales que permitan detectar a la población de riesgo, y generar estrategias para prevenir el desarrollo de un trastorno particular, a través de la detección de las alteraciones del DNA que causan la enfermedad. La integración de moléculas o marcadores que participan en el desarrollo y en la progresión de la preeclampsia, en un ensayo de detección molecular podría favorecer la identificación de la población en riesgo y poder salvar muchas vidas.

Es necesario realizar un método de detección de marcadores de riesgo dirigidos a la prevención de la preeclampsia, sin duda su desarrollo y aplicación puede contribuir de manera importante a establecer no solo la historia de la PE, sino a estimar la diversidad de los caracteres distintivos de la población en riesgo de padecerla y permitirá tener un perfil genético de las pacientes el cual sería una herramienta efectiva para el médico para poder dar un tratamiento a tratar de manera más eficaz, disminuyendo la gravedad y las tasas de morbimortalidad de la PE.

Objetivos

General

Diseñar y desarrollar una prueba de detección de marcadores moleculares asociados a la preeclampsia.

Particulares

- Analizar la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de genes asociados al desarrollo de la preeclampsia.
- Diseñar los oligonucleótidos de al menos 40 marcadores asociados a preeclampsia para la amplificación de la región del Polimorfismo de un solo nucleótido.
- Validar el paquete tecnológico de Diagnóstico molecular con sangre 50 personas.
- Determinar el factor de riesgo para desarrollar la enfermedad a través de la información del genoma y del estilo de vida de las personas seleccionadas.

Hipótesis

La detección de marcadores moleculares asociados a preeclampsia puede permitir la prevención y la identificación de individuos sanos que son candidatos por desarrollar la enfermedad. Así como, determinar la etiología de la enfermedad y elegir la terapia basada en un diagnóstico más exacto.

Ha: La identificación de polimorfismos de un solo nucleótido y el estudio de la correlación, nos proporcionara las probabilidades o proporción de tener el alelo de riesgo para tener preeclampsia en nuestras pacientes.

Ho: La identificación de polimorfismos de un solo nucleótido no es útil para el estudio de la correlación y proporción de tener el alelo de riesgo para tener preeclampsia en nuestras pacientes.

Diseño del estudio

Clasificación del diseño de estudio: Finalidad

De acuerdo con el factor de estudio con intervención: Descriptivo

Tipo de estudio descriptivo: Estudio de prevalencia

Población de estudio: Mujeres del estado de Morelos, realizándose la obtención de muestras en el mes de mayo- junio 2016.

Materiales y Métodos

Metodología del estudio

Población: Mujeres del estado de Morelos, a quien se les realizó la toma de muestras en la facultad de Medicina de la UAEM y en el laboratorio de Diagnóstico Molecular grupo QU Ae, entre el mes de mayo- junio 2016.

Materiales: Cuestionario en físico y material de extracción por venopunción en tubos con EDTA.

Lugar donde se llevará el estudio: laboratorio de Diagnóstico Molecular grupo QU Ae.

Universo: Mujeres del estado de Morelos.

Muestra: Mujeres en el estado de Morelos presentes entre mayo- junio 2016 en la facultad de Medicina de la UAEM y en el laboratorio de Diagnóstico Molecular grupos QU Ae.

Tamaño de la muestra: 40 mujeres de la Facultad de medicina UAEM y 10 mujeres del laboratorio de Diagnóstico Molecular grupo QU Ae.

Técnicas: Biología Molecular e informática.

Variables que estudiar: polimorfismos de un solo nucleótido presentes para PE.

Muestras biológicas

Criterios de inclusión y exclusión

El material biológico de origen humano utilizado en este proyecto está comprendido por un total de 50 muestras de sangre de población femenina.

Las mujeres reclutadas para los estudios son preferentemente localizadas en el estado de Morelos, con edad mínima de 18 años. Las muestras de exclusión para este proyecto es la población masculina, mujeres menores de 18 años y que no estén en el estado de Morelos.

Procesamiento de las muestras y consentimiento informado

Se realizó la recolección de las muestras a través de la vinculación con diferentes hospitales y consultorios médicos en Morelos, antes de la recolectar las muestras sanguíneas, se obtuvo el consentimiento escrito de la paciente, donde se capturaron los datos antropomórficos y de estilo de vida a través de una encuesta directa que fue aplicado por el personal encargado de la extracción de sangre del Hospital.

Aspectos éticos

En este estudio de investigación nos apegamos al Reglamento de la Ley General de Salud de acuerdo a lo señalado en el título segundo de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, Capítulo I, Artículo 13, donde prevalece el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, así como también la confidencialidad de sus datos y además es una investigación sin riesgo.

Los cuestionarios otorgados a las pacientes son manejados con discreción y confidencialidad (ver Anexo 1). Los datos son conservados por el investigador del estudio hasta al menos los dos años de investigación hasta la terminación formal del mismo. Además, también nos apegamos de acuerdo con la declaración de Helsinki (ver Anexo 2), que prevalece el criterio de dignidad, confidencialidad y respeto en los derechos de los pacientes.

Análisis de la información

Bioinformática

Para el análisis de la información de SNPs se realizó un análisis bioinformático en la base de datos para polimorfismos llamado SNPedia utilizando en su buscador la palabra *Preeclampsia* para posteriormente obtener todos los datos registrados de este padecimiento y realizar una biblioteca de datos: genes que cambian su patrón de expresión durante el establecimiento de la enfermedad, frecuencia, alelos, SNPs para población mexicana, etc. Adicionalmente se utilizó otra base de datos disponible en línea NCBI para obtener la secuencia total de los genes registrados por SNPedia con la finalidad de realizar el diseño de primers.

Redes de interacción

Para la obtención de interacciones entre cada SNP anteriormente identificado se realizó la búsqueda de los genes, introduciendo sus nombres en la base de datos: Gene Manía, generando hipótesis acerca de la función y análisis de genes, entre listas de genes similares identificando la proteómica y la genómica entre la base de datos existentes en la plataforma, donde existen actualmente un soporte de siete organismos, entre ellos el del *Homo sapiens*, que de acuerdo a esta investigación se realizó la identificación y gráficas de los nodos para cada gen y el porcentaje de análisis de redes señaladas como: Co-expresión, interacciones físicas, co-localización, predicho, dominios compartidos de la proteína, interacciones genéticas y rutas.

Estudio biológico de genes en GeneOntology.

Para conocer la función de los genes y la relación que existen en la PE, se realizó el análisis en la base de datos GeneOntology obteniendo una clasificación de las funciones en tres aspectos: *Función molecular* (actividades moleculares de los productos génicos), *componente celular* (donde los productos de genes están activos) y *proceso biológico* (vías y procesos más amplios de las actividades de múltiples productos de genes).

Patogénesis con Pathway Studio

Para saber que genes de PE están asociadas a otras patologías, se realizó el estudio mediante la plataforma de Pathway Studio donde se puede analizar y visualizar el mecanismo de enfermedades, expresión de genes, metabólica y Proteómica, con la finalidad de ayudar al estudio de los datos experimentales mediante la normalización y herramientas estadísticas de las posibles causas de los procesos biológicos, para poder modelar la expresión diferencial de los genes y las interacciones entre proteínas de algún padecimiento en particular, en este caso para la PE.

Redes interacción de proteínas

Para comprender los fundamentos de las redes de proteínas es necesario conocer los detalles moleculares presentes, por lo tanto, en la plataforma Interactome3D se obtienen estructuras y modelado de las interacciones proteína-proteína en forma tridimensional, particularmente para este proyecto de PE, la finalidad fue encontrar el posible mecanismo de acción ocasionado por las variantes que otorgan los SNPs presentes en la PE, conociendo la ruta que tienen cada uno de los polimorfismos.

Diseño de oligonucleótidos

El Diseño de oligonucleótidos fue de cada uno de los marcadores seleccionados para amplificar por Reacción en la cadena de la polimerasa (PCR punto final) directamente de sangre y los oligonucleótidos específicos para la detección de los SNPs a los cuales se les adicionará los anti códigos de barra (tecnología de innovación desarrollada por el laboratorio de diagnóstico molecular Grupo QUAe).

El diseño de los oligonucleótidos se realizó de acuerdo con las recomendaciones sugeridas por Grupo QUAe Laboratorio de diagnóstico molecular: contenido de GC del 40 al 60%, un Tm entre 63 y 67 °C y que en el extremo 3' terminen con cualquiera de las siguientes combinaciones de secuencia GG, CC, GC o CG.

Además, se realizó el diseño de cada código de barras en el programa en línea "RandomADNsequencegenerator", con terminación en pares de bases GC, CC, GG, CG y con un Tm mayor o igual a 62.5 °C. El diseño de códigos de barra (Cb) fue dirigido para el extremo 3' donde se le agregará un Cb en la siguiente PCR para la

amplificación en la región 3' y en la región 5' de la misma manera que en la primera PCR.

Amplificación por Reacción de la cadena de la polimerasa

Se efectuaron en el equipo miniPCR, una mezcla de reacción con Direct PCR máster de Jena Bioscience en un volumen final de 20µl (Direct PCR máster 10µl, primer Forward 0.8µl, primer Reverse 0.8µl, muestra 1µl, agua PCR 7.4µl), utilizando el siguiente protocolo de amplificación (Tabla 8).

Tabla 8: Protocolo de amplificación para PCR.

temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	300s	1
95°C	20s	35
60°C	30s	
72°C	60s	
72°C	120s	1

Este procedimiento se realizó de manera individual para los 40 rs, por lo tanto para comprobar el funcionamiento de los primers diseñados para los SNPs seleccionados, se realizó PCR de 3 SNPs elegidos al azar (rs699, rs20563 y rs560887), evaluados en las 35 muestras sanguíneas elegidas al azar de un total de 50muestras, para posteriormente visualizarlas por electroforesis de agarosa al 1%, tomando 10 µl de producto de PCR y 2µl de buffer de carga (6X), con un volumen final de 12µl; Los geles fueron realizados de acuerdo a la tecnología de miniPCR, en el sistema de electroforesis blueGel™, ocupando por cada gel, un volumen final de 15ml..

Para la preparación del gel de agarosa al 1% se necesita 0.5g de agarosa y 50ml de TBE 10X. En un frasco de vidrio con tapa, añadir la agarosa y el TBE 10X., calentar en el microondas hasta disolver completamente la agarosa. El TBE 10X se prepara con 55g de Ácido bórico, 40ml de EDTA (0.5M), 108 g de TRIS base y finalmente aforar con 1000ml de agua desionizada, la forma correcta de preparación es diluir TRIS base

en 100 mL de agua desionizada, después agregar el ácido bórico y mezclar hasta disolver completamente, posteriormente agregar EDTA aforando a 200 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Posteriormente se propuso realizar una Multiplex (Figura. 4) para incluir los 40 rs en una sola reacción, con el mismo kit de PCR utilizado anteriormente, para la realización del multiplex con los 40 rs, se realizaron alícuotas de cada uno de los primers correspondientes a cada uno de los rs tanto Reverso y forward. Separando en un mismo tubo a los 40 primers Reverse y en otro tubo a los 40 primers Forward, en una dilución 1:10, para una concentración final de 10pmol, estos mix de oligos se usaron en las reacciones de Multiplex con un volumen final de 20µl (Direct PCR master 10µl, primer Forward(1:10) 1µl, primer Reverse (1:10) 1µl, muestra sanguínea (40%) 1µl, agua PCR 7µl), utilizando el protocolo de amplificación para PCR multiplex (tabla 9).

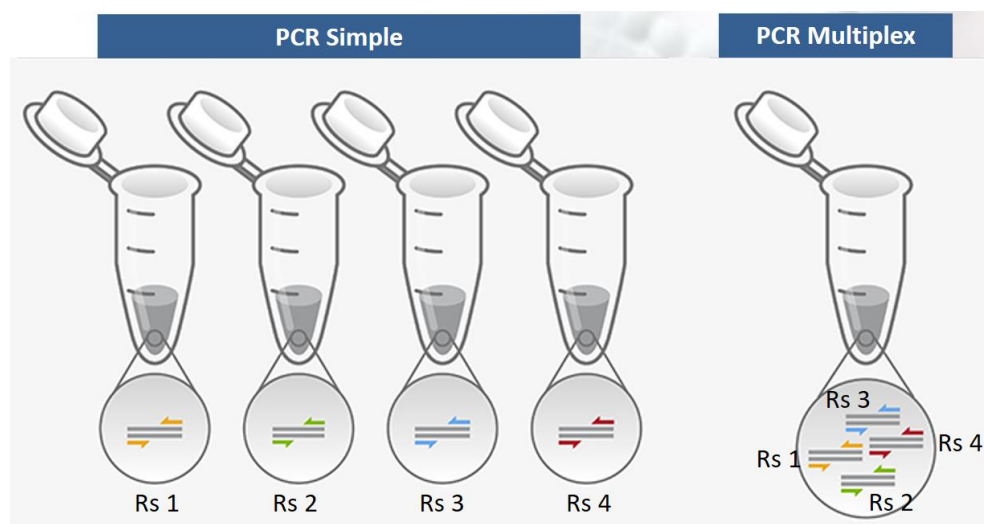


Figura. 4: Diferencias entre PCR simple y PCR multiplex. A la izquierda: PCR simple, analizando 4rs de manera individual en 4 reacciones. A la derecha: PCR multiplex, analizando 4rs en una sola reacción.

Tabla 9: Protocolo de amplificación para multiplex PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5min	1
95°C	20s	35
60°C	30s	
72°C	10s	
72°C	2min	1

Finalmente, los productos de las muestras se purificaron con AMPure XP PCR con Beads para ser secuenciadas de acuerdo con el protocolo de secuenciador *MinION™ nanopore DNA sequencer*.

El protocolo para la purificación de PCR se realizó de la siguiente manera: de acuerdo al volumen final de producto de PCR que se desee purificar, se multiplica por 1.2, en este caso se tomaron 10µl de los volúmenes finales de producto de PCR, por lo tanto se le agregan 12µl de beads de purificación de AMPure, estos se mezclan por pipeteo y se incuban por 5min, posteriormente se dejan reposar en el magneto que viene incluido en el kit de purificación, hasta formar el pellet (aprox. 3min), se desecha el sobrenadante y se le agrega 200ul de Etanol al 70%, se desecha nuevamente el sobrenadante y se agrega nuevamente el Etanol al 70%, posteriormente se deja evaporar el etanol, para poder resuspender en 15ul de H₂O, nuevamente dejamos en el tubo en el magneto de purificación hasta la formación del pellet, enseguida recuperamos el sobrenadante.

Este volumen final ya purificado está listo para ser secuenciado de acuerdo con el protocolo del *MinION™ nanopore DNA sequencer*. Para este protocolo de requiere realizar la incorporación de códigos de barra de paciente para poder iniciar con la secuenciación por MinION, se realiza la siguiente mezcla de reacción de PCR: Agua 13.4 ul, Buffer Pfu 2ul, oligo CBP 5´1ul, Oligo CBP 3´1ul, dNTPs 0.4ul, Enzima Pfu 0.2 ul, producto 2ul en un volumen total de 20 ul, mezclar de manera homogénea con

vortex y centrifugar durante 1 s, y utilizar el siguiente protocolo de amplificación con CBPs (tabla 10).

Tabla 10: Protocolo de amplificación para multiplex PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	2min	1
98°C	20s	35
62°C	25s	
68°C	30s	
68°C	5min	1

Para la secuenciación por MinION se requiere tomar 1 ug de los productos de amplificación obtenidos en la incorporación de código de barra previamente purificados, agregando de Ultra II End-prep buffer 7 ul, ultra II End-prep enzyme 3ul y de agua libre de nucleasas 5ul y mezclar la reacción por inversión 10 veces. Adicionar al tubo una relación 1:1 de AMPure XP beads y mezclar homogéneamente, después incubar la reacción en el mezclador por 5 min a temperatura ambiente, centrifugar por 3 s para bajar la solución que se haya quedado en las paredes y poner en la barra magnética BIO-RAD por 1 min, lavar 2 veces con 200 ul de etanol al 70% (previamente preparado con 500 ul de etanol con agua libre de nucleasas), sin retirar de la barra magnética, posteriormente centrifugar por 1 s, y retirar el remanente de etanol y dejar evaporar por 30 s. Retirar de la barra magnética y resuspender la pastilla en 31 ul de agua libre de nucleasas e incubar por 2 min a temperatura ambiente. Colocar nuevamente la barra magnética y esperar a que se forme la pastilla y recuperar 30 ul de sobrenadante, para posteriormente adicionar al tubo con los 30 ul del sobrenadante, 20 ul de Adapter Mix y 50 ul de Blunt/TA ligation Master Mix y mezclar por inversión y centrifugar 3 s. Incubar por 10 min a temperatura ambiente, adicionar enseguida las AMPure 40 ul a la reacción previa y mezclar, para incubar en el mezclador por 5 min a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 s, colocar enseguida en la barra magnética hasta que la solución se aclare y desechar el

sobrenadante con micropipeta, retirar de la barra magnética y adicionar 140 ul de Adapter Bead Binding Buffer a la pastilla de las AMPure y mezclar. Volver a colocar en la barra magnética, permitir la formación de pastilla, desechar el sobrenadante y repetir. Retirar de la barra magnética y resuspender la pastilla resultante en 15 ul de Elution Buffer, incubar por 10 min a temperatura ambiente. Colocar en la barra magnética hasta que el sobrenadante no tenga coloración, recuperar sobrenadante y colocar en un nuevo tubo, para posteriormente mezclar 520 ul de agua y 480 ul de RBF, abrir el puerto de la muestra de la celda de flujo y cargar 800 ul de la mezcla anterior y esperar 10 min, cargar los 200 ul restantes y esperar 10 min. En un tubo mezclar 35 ul de RBF, de LLB 25.5 ul y de la mezcla 12 ul y agua 2.5 ul. Abrir la tapa SpotON y adicionar gota a gota los 75 ul de la mezcla para cargar hasta que pasen por completo, enseguida cerrar la tapa, ensamblar la celda de flujo al MinION y conectarlo al PC y ejecutar el programa de MinION.

Secuenciación y alineamiento

Del secuenciador *MinION™ nanopore DNA sequencer*, se obtuvieron mediante su software las secuencias de las muestras previamente procesadas, estas secuencias se analizaron en formato “FASTA” para ser alineadas o comparadas con las secuencias previamente obtenidas en NCBI. El alineamiento se hizo con la finalidad de identificar con la determinación de Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en nuestras muestras de pacientes, adicionalmente se realizó un análisis de correlación, identificando las probabilidades o proporción de tener el alelo de riesgo para tener PE.

Validación de paquete tecnológico

Con los resultados que se obtengan anteriormente en el proceso se propondrá el desarrollo del paquete tecnológico si es factible realizar una identificación de todos los marcadores de interés en un solo tubo, para ello se pretende utilizar nuevamente la técnica de PCR sea evaluada con controles negativos y positivos sintéticos a diferentes concentraciones para la estandarización del paquete tecnológico, evaluando la eficiencia y la especificidad principalmente de los oligonucleótidos para la

identificación de los marcadores moleculares que se presentan con mayor frecuencia, el fin de validar el paquete tecnológico con un grupo de 50 pacientes.

Productos esperados

Tesis de Grado de Maestría en Medicina Molecular

Resultados

Población de estudio y datos

Las características fenotípicas que se obtuvieron de un total de 96 mujeres de las cuales 6 indicaron haber tenido preeclampsia, sus datos se resumen en la tabla 11. Comparado con mujeres sin preeclampsia, el grupo de mujeres con preeclampsia tenían los valores de Presión arterial más alta que el grupo control.

Tabla 11: Características de mujeres incluidas en el estudio.

<i>Características</i>	Control (n=90)	Preeclampsia (n=6)	Valor-p
<i>Edad (años)</i>	52.25±8.91	42.16±9.15	0.007
<i>talla (cm)</i>	154.73±4.80	154.71±6.39	0.496
<i>peso (kg)</i>	70.56±14.06	72.53±8.48	0.371
<i>IMC (Kg/m²)</i>	29.46±5.79	30.23±2.21	0.276
<i>PAM (mmHg)</i>	95.35±13.75	107.69±15.23	0.025
<i>PAS (mmHg)</i>	125.47±21	144.41±24.80	0.025
<i>PAD (mmHg)</i>	80.29±12.17	89.33±11.25	0.047

Se uso la prueba paramétrica t de Student agrupadas de dos colas para analizar las variables continuas y con homocedasticidad como resultado de varianzas iguales, cabe destacar que se realizó previamente la evaluación del cumplimiento de criterios estadísticos como coeficiente de simetría y la evaluación de homocedasticidad con su correspondiente nivel de significancia, requeridos para aplicar la prueba T de Student en muestras independientes.

Se realizo la recopilación de datos de estudios que se han realizado en para los 42 rs que búsqueda de Razón de momios (RM) de los 42rs y en la población en la que se ha estudiado, así como la condición o padecimiento en la que se ha estudiado (tabla 12).

Tabla 12: Metaanálisis de asociación de los polimorfismos seleccionados de PE.

rs	GEN	ALELO	OR	IC	n	POBLACION	CONDICION
699	AGT	C	1.26	1.00-1.59	27	CAU	PE
4606	RGS2	T	1.43	1.06-1.92	43	AME	PE
4680	COMT, MIR4761	G	0.796	0.646-0.982	120	AME	PE
5186	AGTR1	C	1.22	0.96-1.56	10	ASI	PE
5219	KCNJ11	G	1.15	1.10-1.21	23,262	EUR	DT2
5442	CDCA3, GNB3	G	2.22	0.734-6.73	101	AME	PE
5443	GNB3	A	1.5	1.2-2.0	216	EUR	HAS
6025	F5	A	1.74	1.43-2.12	41	LAT	PE
6269	COMT, MIR4761	G	3.11	1.4-6.6	149	CAU	INFLAMACION
16944	IL1B	G	1.74	1.2-4.3	145	CAU	DEPRESION
20563	LAMC1	G	0.73	0.55-0.96	176	LAT	PE
560887	G6PC2	A	0.83	0.72-0.96	9353	EUR	DT2
1024323	DDAH1	G	0.811	0.488-1.346	88	ASI	PE
1051740	COMT	T	0.85	0.68-1.06	30	AME	PE
1387153	MIR194-2	T	0.888	ND	750	AME	DMG
1556832	ADRA1D	T	4.33	2.27-8.27	21	AME	PE
1799884	GCK	G	1.4	0.95-2.07	1551	AME	DT2
1799963	TGFBRAP1	G	1.72	1.31-2.26	30	LAT	PE
1801058	GRK4	T	1.008	0.681-1.491	88	ASI	PE
1801278	IRS1	A	3.26	2.00-5.33	444	MEX	DT2
2305948	KDR	T	0.5	0.31-0.79	293	BRA	ENDOMETRIOSIS
2322659	LCT	T	1.14	ND	4394	EUR	ENF. CORONARIA
3734016	ERAP1	G	1.41	1.25-1.62	62	AME	PE
4402960	IGF2BP2	T	1.15	1.10-1.19	138	AME	DT2
4696480	TLR2	T	2.93	1.42-6.06	65	BRA	LABOR PREMATURA
4746822	HKDC1, LOC101928994	T	1.71	1.12-2.61	500	IND	DMG
4815879	MCM8	G	14.57	4.81-44.17	61	HIS	PE
4841132	LOC157273	G	1.04	ND	33823	EUR	OBESIDAD, DM2
4986790	TLR4	G	2.1	0.8-5.07	218	BRA	PE
4986791	TLR4	T	3.4	2.2-11.0	182	EUR	PE, HELLP
7664413	LOC105377555, VEGFC	T	2.04	0.99-4.17	117	AME	PE
7754840	CDKAL1	T	1.23	1.13-1.33	201	MEX	T2D
7903146	TCF7L2	T	1.65	1.46-1.84	204	AME	DM2
8187710	ABCC2	G	4.44	1.83-10.78	33	AME	DM2, COLESTASIS INTRAHEPATICA en pregnancy
10830963	MTNR1B	C	1.24	1.20-1.29	6696	EUR	DT2
12255372	TCF7L2	T	1.111	0.645-1.578	1549	AME	PE
17121510	LOC107984395	G	2.8	1.77-4.44	130	CAU	COAGULACION
17222723	ABCC2	T	4.44	1.83-10.78	33	AME	DM2, COLESTASIS INTRAHEPATICA en pregnancy
17408150	ERAP1, ERAP2	T	1.069	0.706-1.619	836	LAT	PE
17636747	TGFBRAP1	T	8.35	3.4-20.46	62	HIS	PE
28360974	MUC22	G	10.13	3.85-26.67	62	HIS	PE
137852769	HADHA	G	0.99	0.41-1.2	123	AME	PE

proceso biológico en la clasificación de “Gene Ontology”. La interacción molecular de estos marcadores genéticos se determinó analizando las redes de interactoma, identificando los nodos para cada gen y el porcentaje de análisis de redes señaladas como: Co-expresión, interacciones físicas, co-localización, dominios compartidos de la proteína, interacciones genéticas y rutas, así como la clasificación de las funciones en tres aspectos: Función molecular (actividades moleculares de los productos génicos), componente celular (donde los productos de genes están activos) y proceso biológico (vías y procesos más amplios de las actividades de múltiples productos de genes) (figura 4).

Tabla 13: Genes identificados para los SNPs de PE

<p>Organismo: Homo sapiens (human).</p>	<p>Genes: MYCBP2, WWTR1, ERP44, ABCC2, FAS, FOXP3, ABCB11, IGF2BP2, ATP8B1, HADHA, COMT, LAMA1, FGF14, FLT1, PLAT, TGFB1, RP11, GCK, ACTA2, GNB3, IL1A, GCA, IL1R1, IL1RL1, LCT, RND3, RGS2, CTH, INVS, ACVR2A, GRK4, IL1B, MCM8, KDR, NR1H2, MTNR1B, AGT, LAMC1, TGFBRAP1, TLR4, TLR2, PRCP, CTDSPL2, ESR2, EPHX1, REN, AGTR1, CORIN, CDKAL1, TCF7L2, SCN2B, VEGFC, G6PC2, DDAH1, SFR1, HKDC1, RUNX1, ERAP1, ERAP2, NOS3, STOX1, LRP1B , IRS1 , ADRA1D, ZNF295, F2, PAPP, DNAH14, KCNJ11, F5, MUC22.</p>
--	--

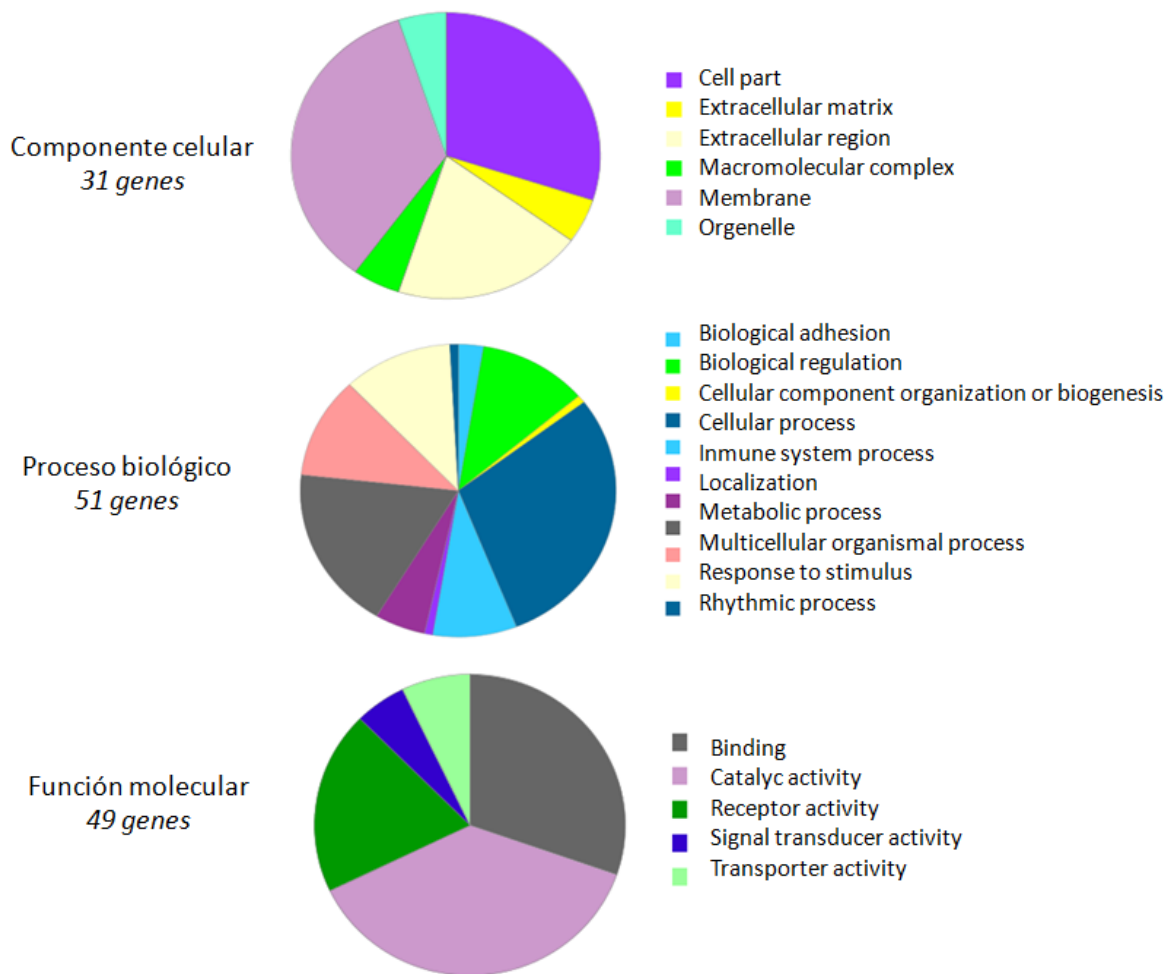


Figura. 4: Resultados de función biológica por GeneOntology para los SNPs de preeclampsia.

Los resultados obtenidos por GeneOntology nos muestra que la mayoría de los genes están involucrados en el proceso biológico al contener 51 de todos los genes analizados para PE, seguido de la función molecular con 49 genes, y por último la participación de 31 genes en los componentes celulares.

Para conocimiento del porcentaje del proceso biológico con su respectiva clase de proteínas y genes, se realizó la tabla 14 y una segunda tabla para nombre de genes con sus descriptivas descripciones, ver tabla 15, donde de primera instancia podemos

identificar que la mayoría de las proteínas están participando en procesos celulares, procesos metabólicos y regulación biológica.

Tabla 14: Tabla de porcentajes de proceso biológico con clase de proteínas.

PROCESO BIOLÓGICO	CLASE DE PROTEÍNAS	GENES
ADHESION BIOLÓGICO (2.6%):	<ul style="list-style-type: none"> ○ Extracellular matrix linker protein receptor ○ extracellular matrix protein receptor 	<ul style="list-style-type: none"> ○ LAMA1 ○ LAMC1 ○ TLR2
REGULACION BIOLÓGICA (11.2 %):	<ul style="list-style-type: none"> ○ cation transporter hydrolase ○ G-protein coupled receptor ○ interleukin superfamily ○ G-protein coupled receptor ○ Serine protease inhibitor ○ aspartic protease ○ metalloprotease 	<ul style="list-style-type: none"> ○ ATP8B1 ○ NOS3 ○ AGTR1 ○ ADRA1D ○ IL1A ○ GCK ○ MTNR1B ○ IRS1 ○ HKDC1 ○ AGT ○ REN ○ ERAP1 ○ KCNJ11
PROCESO CELULAR (29.3%):	<ul style="list-style-type: none"> ○ cation transporter hydrolase ○ Non-receptor serine/threonine protein kinase ○ growth factor ○ apolipoprotein cell adhesion molecule enzyme modulator extracellular matrix protein membrane-bound signaling molecule metalloprotease oxidase serine protease transporter ○ extracellular matrix protein receptor ○ G-protein coupled receptor ○ Small GTPase ○ nuclear hormone receptor nucleic acid binding ○ interleukin superfamily ○ Enzyme modulator mRNA splicing factor ribonucleoprotein ○ nucleic acid binding transcription factor ○ Carbohydrate phosphatase ○ Type I cytokine receptor ○ extracellular matrix linker protein receptor ○ Kinase modulator transcription cofactor 	<ul style="list-style-type: none"> ○ ATP8B1 ○ GRK4 ○ TGFB1 ○ NOS3 ○ F5 ○ TLR4 ○ AGTR1 ○ RND3 ○ ESR2 ○ VEGFC ○ CTDSPL2 ○ ADRA1D ○ IL1A ○ IGF2BP2 ○ RUNX1 ○ G6PC2 ○ GCK ○ IL1RL1 ○ LAMA1 ○ IRS1 ○ HKDC1 ○ WWTR1 ○ TCF7L2 ○ NR1H2 ○ FOXP3 ○ FGF14

	<ul style="list-style-type: none"> ○ nucleic acid binding ○ DNA binding protein transcription factor ○ heterotrimeric G-protein hydrolase 	<ul style="list-style-type: none"> ○ GNB3 ○ IL1R1 ○ LAMC1 ○ TLR2
DESARROLLO DE PROCESO (8.6%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ growth factor ○ hydrolase ○ Enzyme modulator mRNA splicing factor ribonucleoprotein ○ nucleic acid binding transcription factor ○ Extracellular matrix linker protein receptor ○ DNA binding protein transcription factor ○ TGF-beta receptor serine/threonine protein kinase receptor ○ Extracellular matrix linker protein receptor 	<ul style="list-style-type: none"> ○ TGFB1 ○ VEGFC ○ DDAH1 ○ IGF2BP2 ○ RUNX1 ○ LAMA1 ○ FOXP3 ○ ACVR2A ○ FGF14 ○ LAMC1
PROCESO DEL SISTEMA INMUNE (0.2%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ nucleic acid binding transcription factor 	<ul style="list-style-type: none"> ○ RUNX1
PROCESOS METABOLICOS (18.1%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ cation transporter hydrolase ○ Growth factor ○ Apolipoprotein cell adhesion molecule enzyme modulator extracellular matrix protein membrane-bound signaling molecule metalloprotease oxidase serine protease transporter ○ G-protein coupled receptor ○ interleukin superfamily ○ Enzyme modulator mRNA splicing factor ribonucleoprotein ○ nucleic acid binding transcription factor ○ Carbohydrate phosphatase ○ Serine protease ○ lyase ○ Kinase modulator Transcription cofactor ○ DNA binding protein Transcription factor ○ aspartic protease ○ metalloprotease ○ G-protein modulator 	<ul style="list-style-type: none"> ○ ATP8B1 ○ TGFB1 ○ NOS3 ○ F5

Tabla 15: Tabla de nombres de genes con sus respectivas descripciones.

Gene	Description
MUC22	mucin 22
DNAH14	dynein, axonemal, heavy chain 14
SFR1	SWI5-dependent recombination repair 1
STOX1	storkhead box 1
ERAP2	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2
CTDSPL2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2
HKDC1	hexokinase domain containing 1
ZBTB21	zinc finger and BTB domain containing 21
FOXP3	forkhead box P3
FGF14	fibroblast growth factor 14
CORIN	corin, serine peptidase
CDKAL1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1
ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2
ABCB11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4
ERP44	endoplasmic reticulum protein 44
PRPF31	pre-mRNA processing factor 31
MCM8	minichromosome maintenance complex component 8
LRP1B	low density lipoprotein receptor-related protein 1B
SCN2B	sodium channel, voltage-gated, type II, beta subunit
INVS	inversin
WWTR1	WW domain containing transcription regulator 1
TGFBRAP1	transforming growth factor, beta receptor associated protein 1 [Source: HGNC Symbol;Acc:16836
G6PC2	glucose-6-phosphatase, catalytic, 2
COMT	catechol-O-methyltransferase
LAMA1	laminin, alpha 1
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1
DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
TLR4	toll-like receptor 4
PRCP	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)
KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
LCT	lactase
AGTR1	angiotensin II receptor, type 1
PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1
EPHX1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)

ATP8B1	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1
IL1A	interleukin 1, alpha
HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
GCK	glucokinase (hexokinase 4)
CTH	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)
ADRA1D	adrenoceptor alpha 1D
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
MTNR1B	melatonin receptor 1B
PLAT	plasminogen activator, tissue
RUNX1	runt-related transcription factor 1
RND3	Rho family GTPase 3
ESR2	estrogen receptor 2 (ER beta)
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1
REN	renin
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
MYCBP2	MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
TLR2	toll-like receptor 2
GCA	granulocalcin, EF-hand calcium binding protein
NOS3	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
AGT	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
F2	coagulation factor II (thrombin)
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
IRS1	insulin receptor substrate 1
IL1B	interleukin 1, beta
GNB3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3
VEGFC	vascular endothelial growth factor C
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I
TGFB1	transforming growth factor, beta 1
NR1H2	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
ACVR2A	activin A receptor, type IIA
FAS	Fas cell surface death receptor

SRI	sorcin
LY96	lymphocyte antigen 96
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist
PGF	placental growth factor
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4
MTNR1A	melatonin receptor 1A
TMPO	thymopoietin
STOX2	storkhead box 2
CD14	CD14 molecule
ABCC8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor
CBFB	core-binding factor, beta subunit
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein
DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
GNG3	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3
GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide
CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A
SERPINA5	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 5
NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1

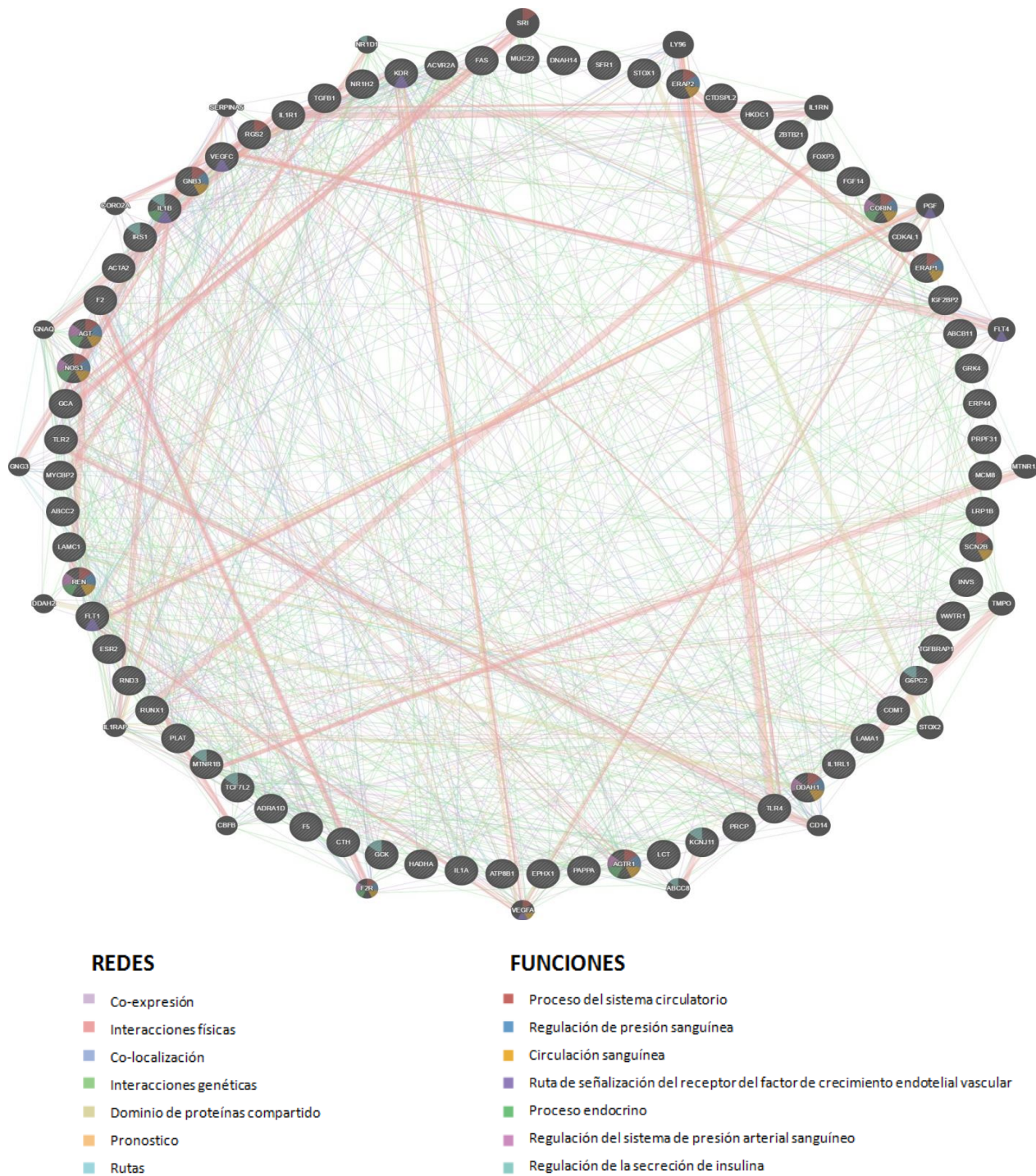


Figura 5: Interactoma circular de Gene Manía para los SNPs de preeclampsia.

Posteriormente se realizó el análisis global de los 91 genes identificados para los SNPs en preeclampsia, mediante la plataforma Gene Manía eligiendo el resultado del interactoma de forma circular (figura 5), donde se observa que todos los nodos están

en constante interacción, realizando una función con otros nodos. Además se realizaron las gráficas con cada una de las interacciones entre los nodos de cada proteína (figura 6) y el porcentaje del tipo de redes de interacción (figura 7).

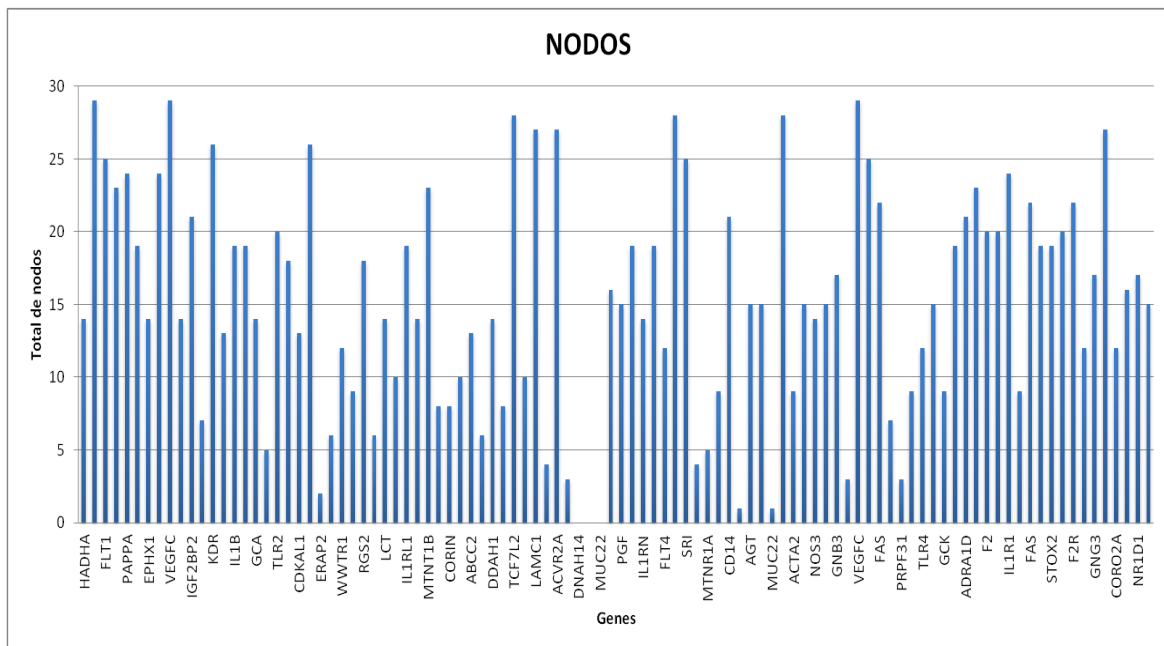


Figura 6: Total de interacción de los nodos por GeneOntology entre los genes para PE.

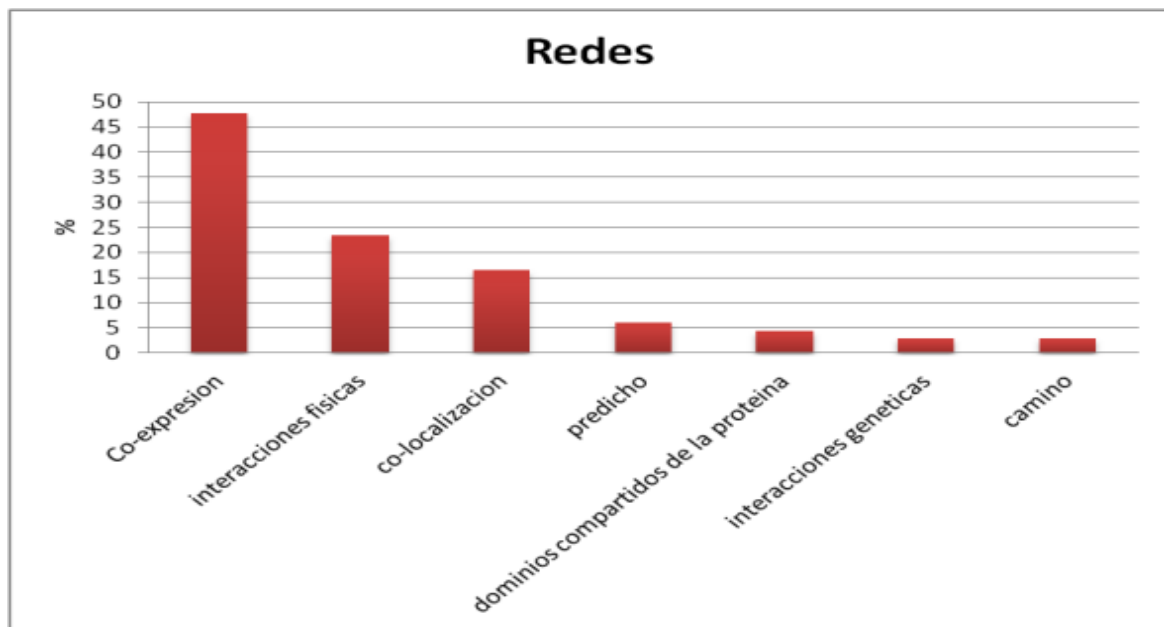


Figura 7: Porcentaje de redes en GeneOntology para las proteínas de preeclampsia.

Se identifica que existen proteínas que no tienen interacción con otra proteína y que la mayor parte de las redes de interacción está a cargo de la co-expresión de proteínas representadas con un 47%.

Para identificar que patologías están asociadas con los genes de PE, se introdujeron los genes de PE en la plataforma de PathwayStudio, arrojando como resultado las 5 enfermedades asociadas a los genes de PE (figura 8).

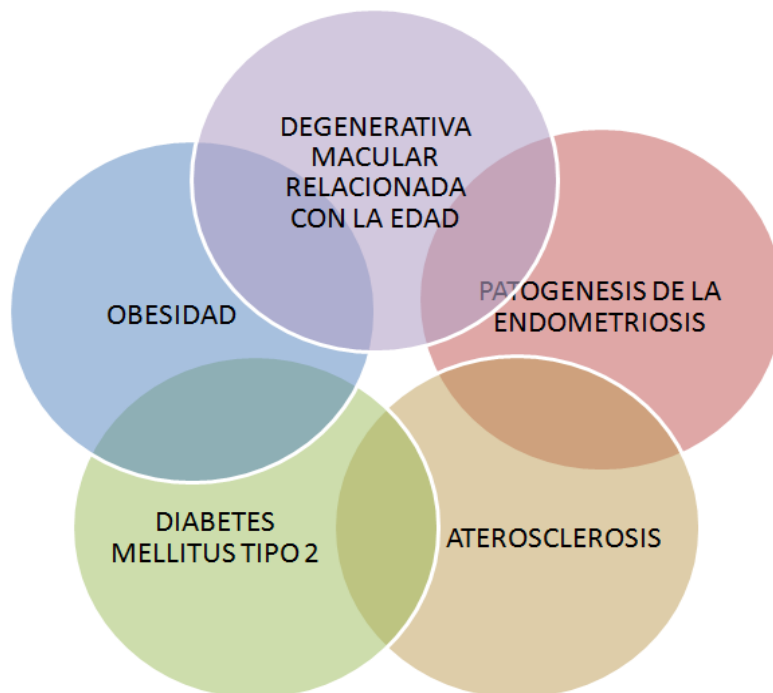


Figura 8: Patogénesis asociadas a PE por PathwayStudio

Se puede identificar que la mayoría de estos padecimientos asociadas con los genes de PE, si corresponden a los factores de riesgo identificados en la historia clínica de las pacientes preeclámplicas. PathwayStudio dio como resultado para cada padecimiento sus respectivos mapas de interacción con la participación del tipo de proteínas, para

endometriosis (Figura 9), diabetes tipo II (Figura 10), aterosclerosis (Figura 11), Degenerativa macular relacionada con la edad (Figura 12) y Obesidad (Figura 13.)

ENDOMETRIOSIS

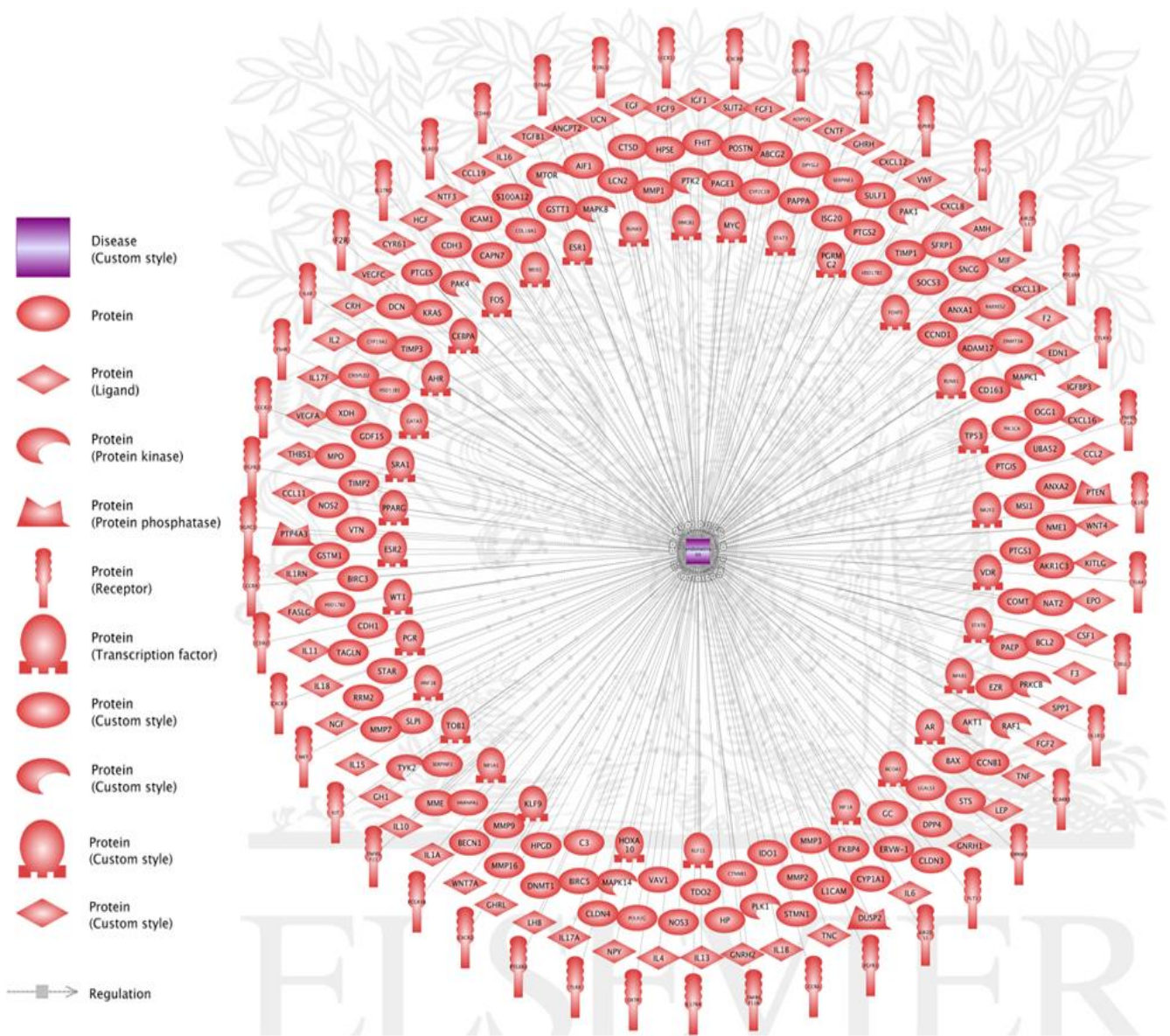


Figura 9: Mapa de interacción de la patogénesis de endometriosis asociada a los genes de PE

DIABETES MELLITUS TIPO II

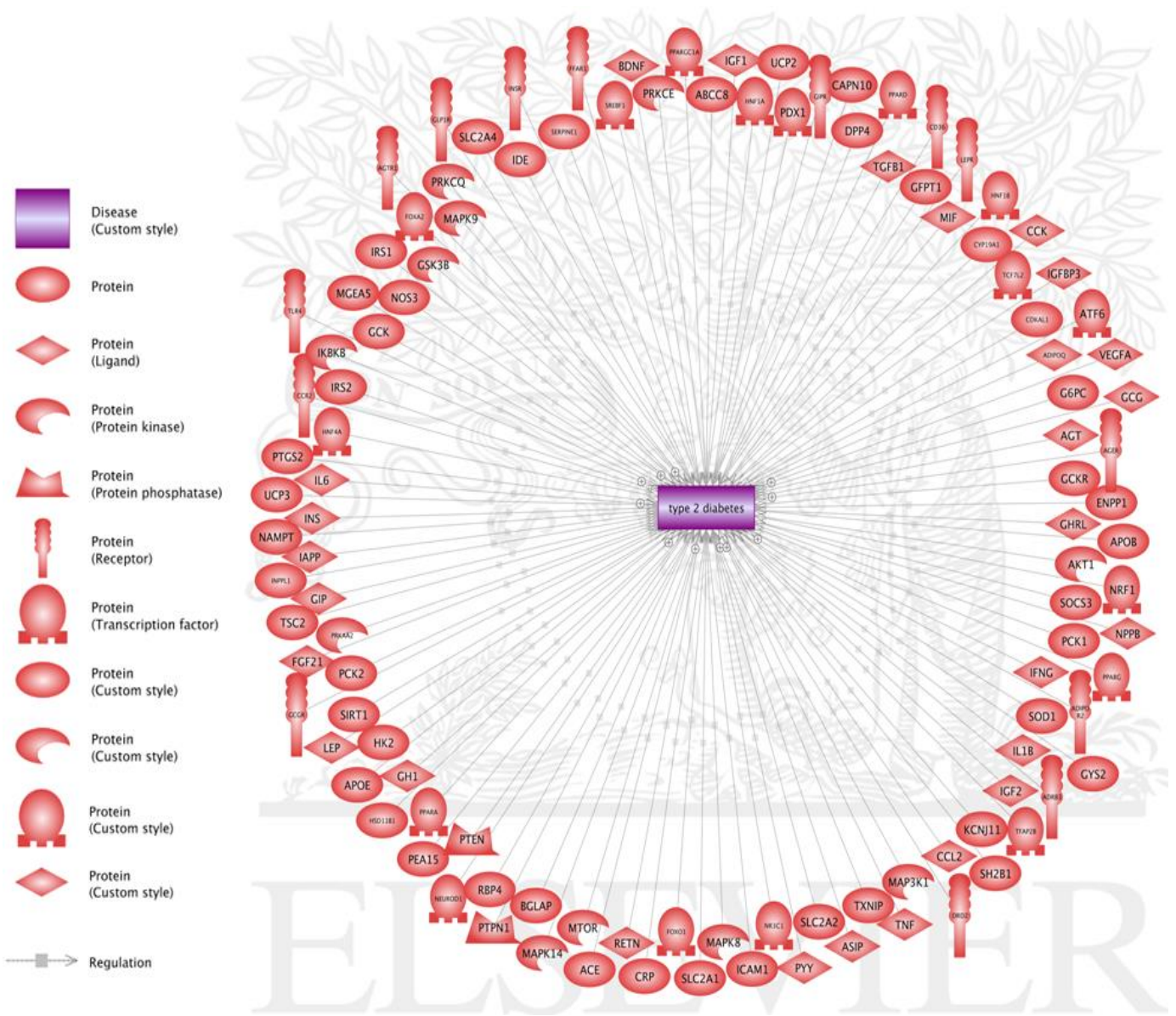


Figura 10: Mapa de interacción de la patogénesis de diabetes mellitus tipo II asociada a los genes de PE

ATEROSCLEROSIS

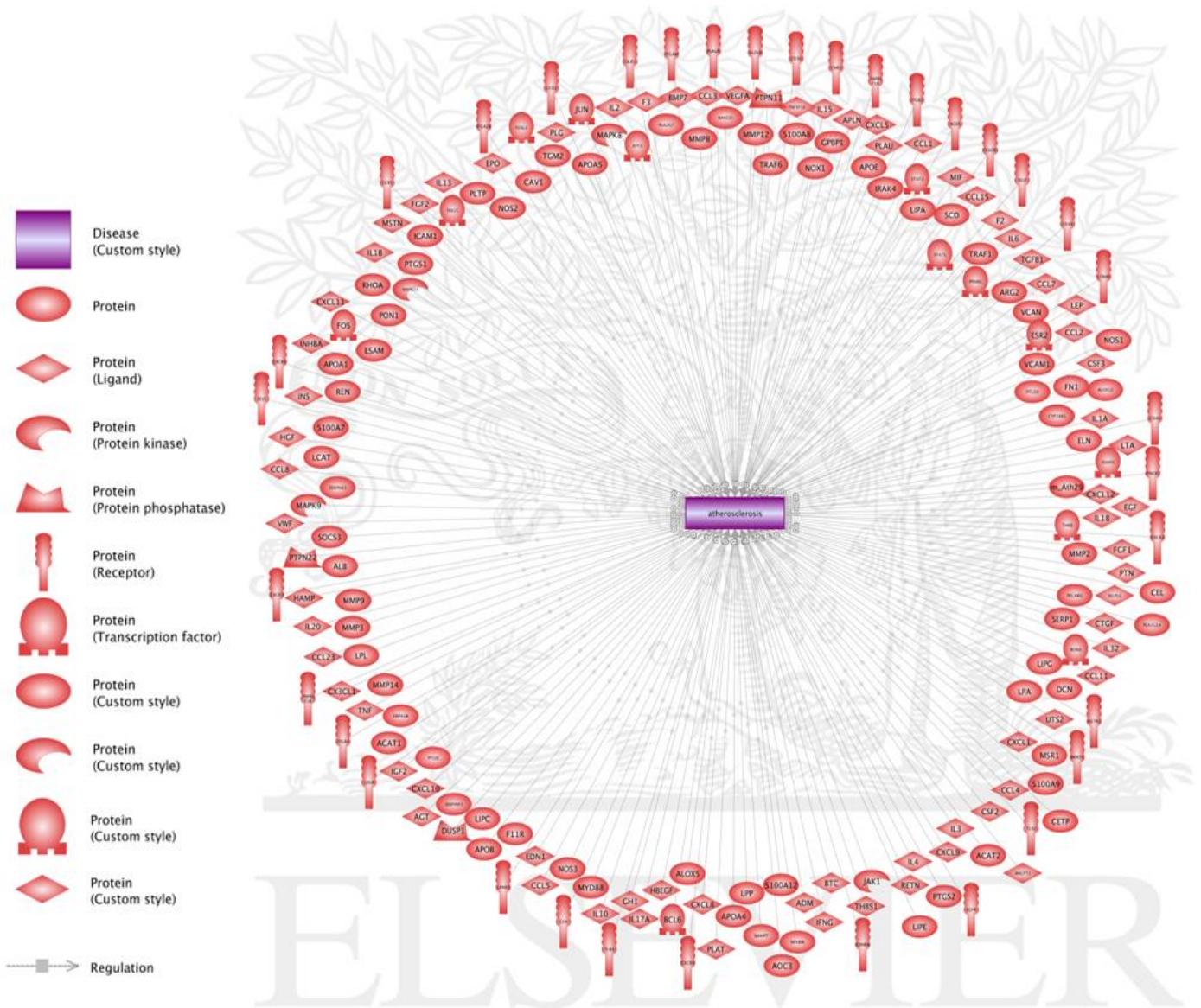


Figura 11: Mapa de interacción de la patogénesis de aterosclerosis asociada a los genes de PE

DEGENERATIVA MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD

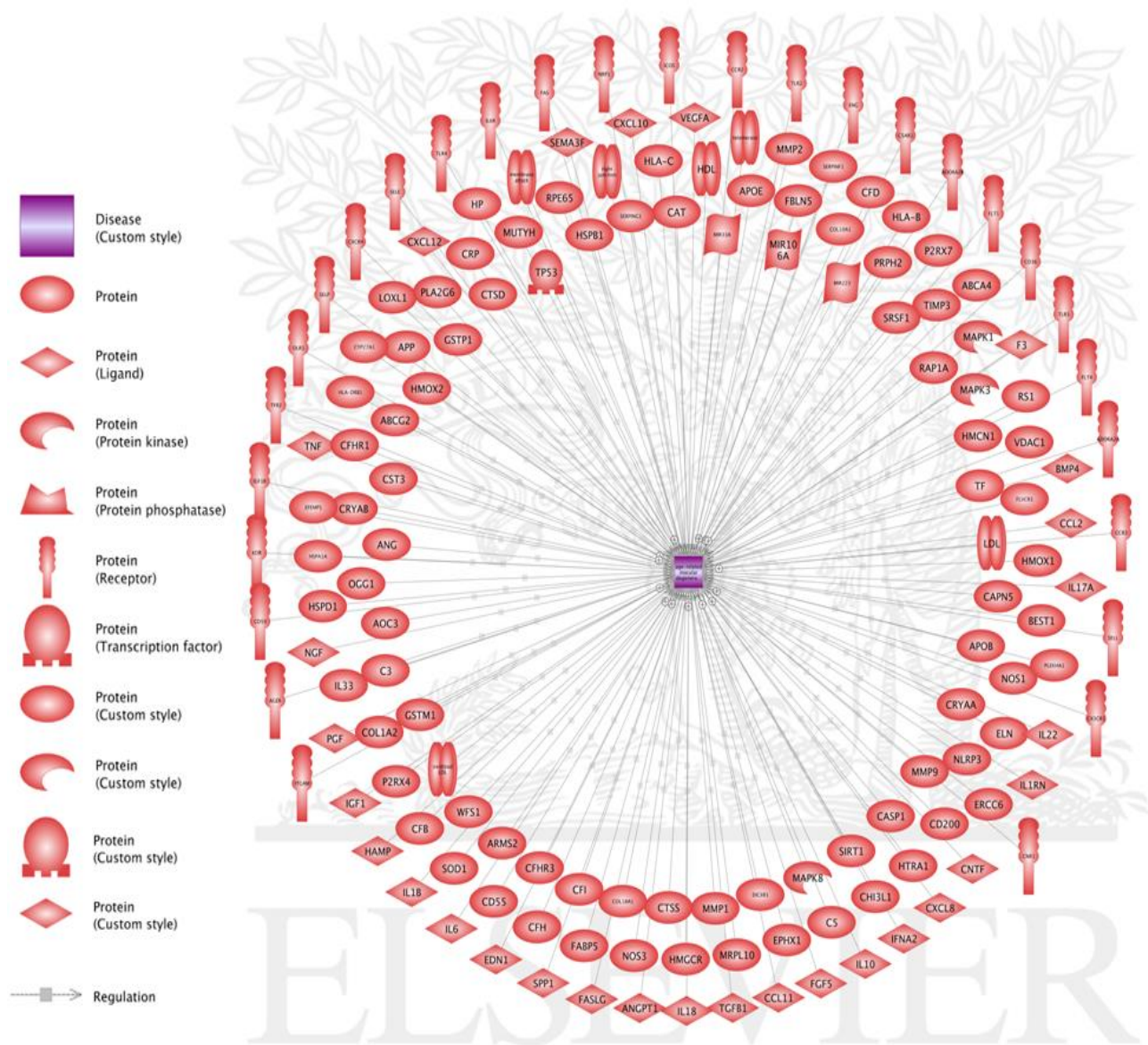


Figura 12: Mapa de interacción de la patogénesis de degenerativa macular relacionada con la edad asociada a los genes de PE

OBESIDAD

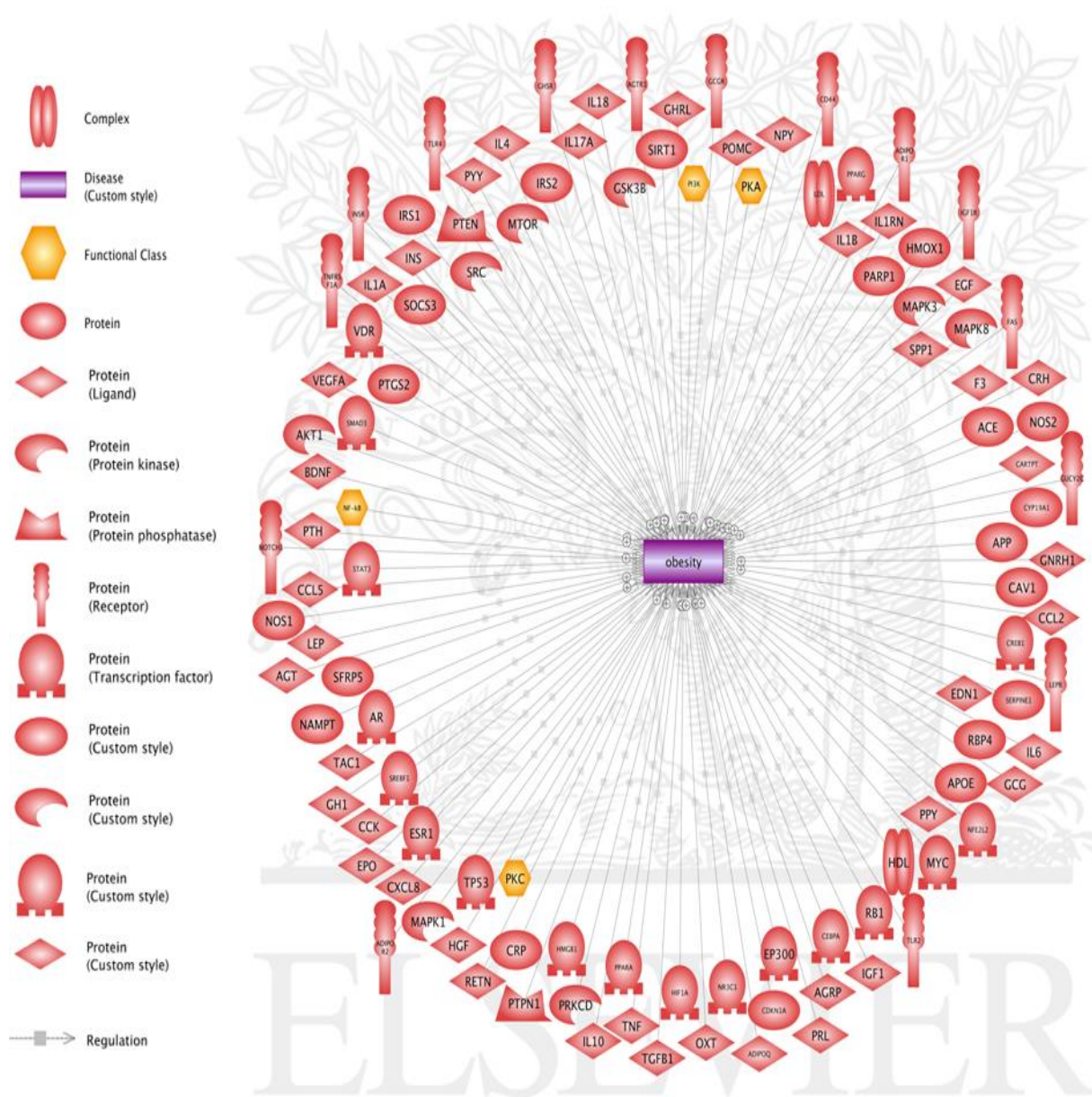


Figura 13: Mapa de interacción de la patogénesis de obesidad asociada a los genes de PE.

Para conocer las zonas en las que están localizados los SNPs se realizó la búsqueda de la posición en la que actúan los SNPs de acuerdo con la clasificación propuesta por Ramírez-Bello et al, 2013 (Ver figura 3); Donde el autor menciona que algunos SNPs están localizados en zonas que codifican proteínas y otros en zonas no codificantes. Muchos SNPs no tienen efecto sobre la función de la célula, pero otros podrían influir en la predisposición a enfermedades y en la respuesta a bacterias, virus o toxinas y en la respuesta a diferentes drogas y tratamientos. Los SNP funcionales se dividen en tres grupos: a) los cSNP sinónimos (el nucleótido no cambia aminoácido) y no sinónimos (el nucleótido cambia aminoácido) que se encuentran en los exones, (b) en rSNP si afectan a la expresión génica, y c) los srSNP si afectan a la estructura y función de los ARNm de genes que sintetizan proteínas. Para la clasificación de nuestros SNPs de estudios se encuentran en la siguiente figura (Figura 14).

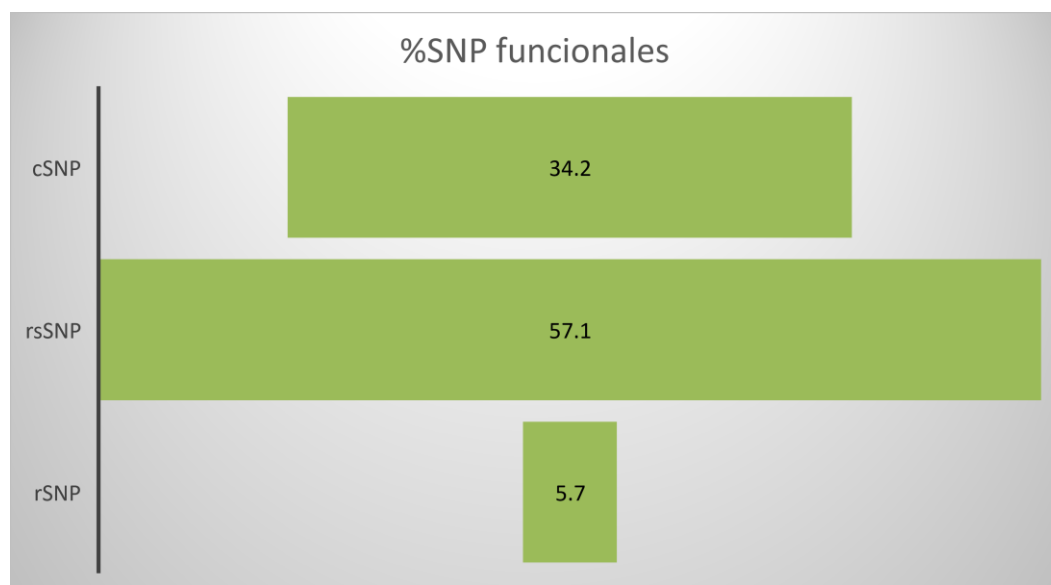


Figura 14: Distribución de SNPs funcionales para PE: cSNP. rsSNP y rSNP.

Para conocimiento del efecto funcional de los rSNP, siguiendo con la propuesta de Ramírez-Bello et al, 2013 (figura 15); menciona que los rSNP ubicados en el ADN pueden afectar a los niveles de expresión si están en el promotor (a). Si los SNP

funcionales se encuentran en la estructura de los ARNm pueden afectar al corte y empalme si se encuentran en los intrones-exones (b), la traducción del ARNm a proteínas (c) si se encuentran en la región 5'UTR, y aunque existen pocos reportes se ha observado que SNP funcionales ubicados en regiones codificantes y que no cambian aminoácidos tienen un papel importante en la función de la proteína (d); Por último, SNP ubicados en la región 3'UTR pueden afectar a la estructura y estabilidad del ARNm (e). Nuestra identificación de SNPs de acuerdo con el efecto funcional se muestran en las siguientes figuras (figura 16 y Figura 17).

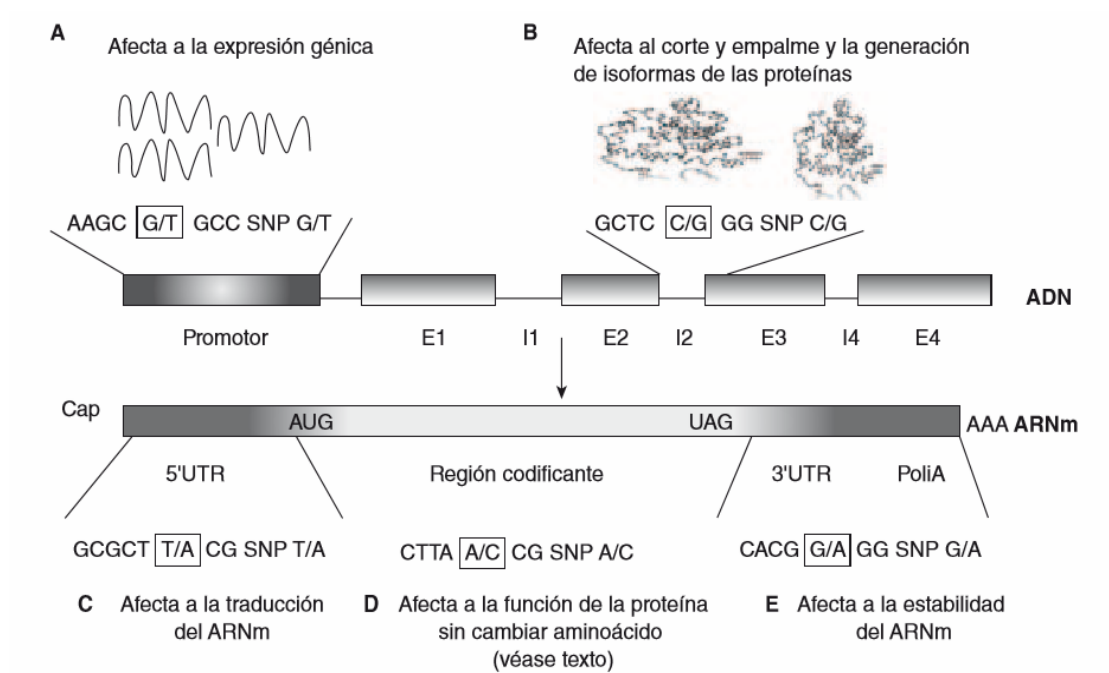


Figura. 15: Efecto funcional de los rSNP propuesto por Ramírez-Bello et al, 2013. UTR: región no traducida.

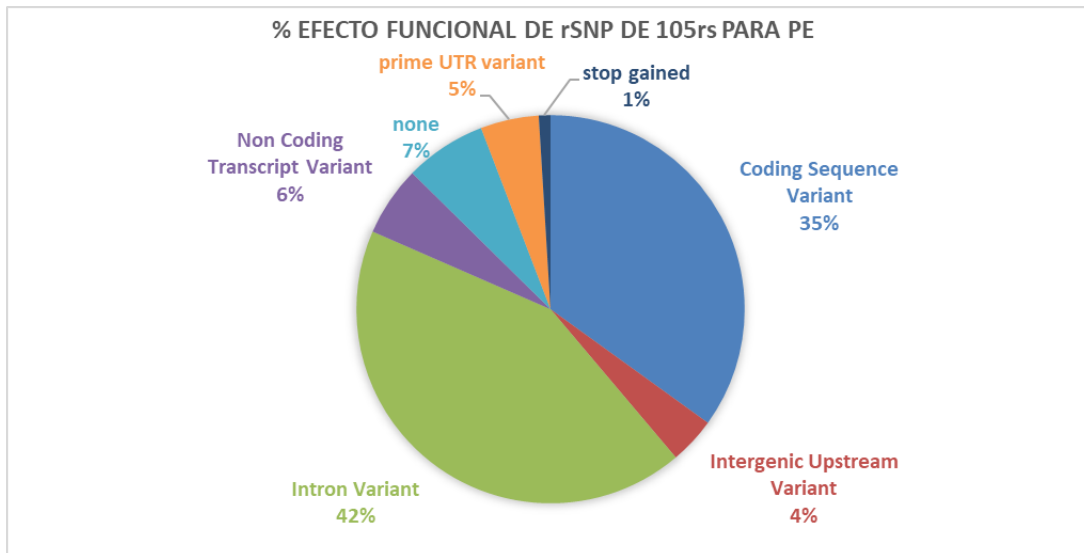


Figura 16: Distribución del efecto funcional de rSNP de 105rs para PE.

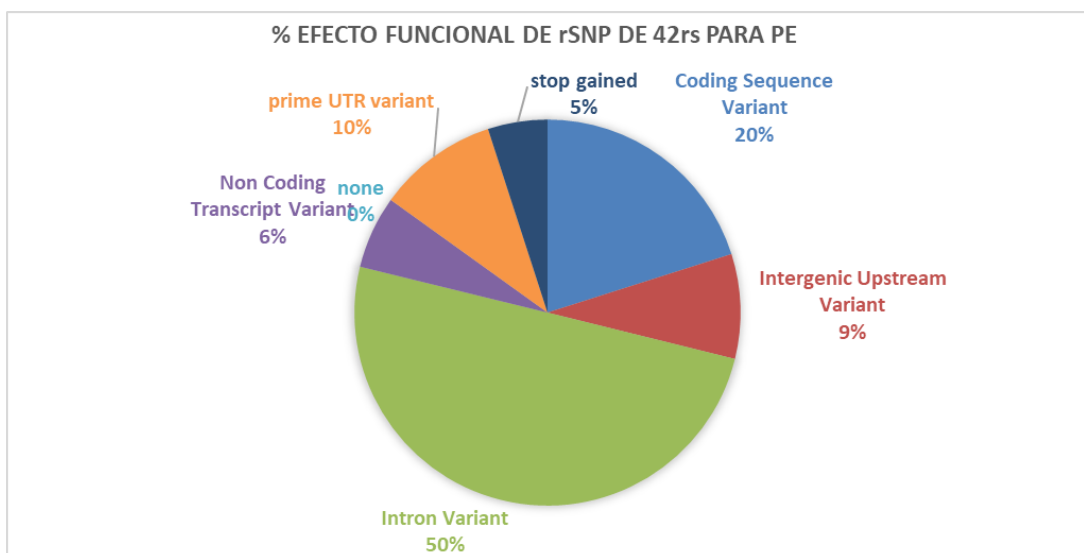


Figura. 17: Distribución del efecto funcional de rSNP de 42rs para PE

Para el diseño de los 42 pares de primers, se descargaron de la página de NCBI todas las secuencias para los SNPs reportadas para PE. La estrategia del diseño de dichos primers se realizó bajo la tecnología de innovación desarrollada por el laboratorio de diagnóstico molecular Grupo QUAE (tabla 16

Tabla 16: Primers diseñados por grupo QUAE.

SNP	Tam	Orientación	SNP	Tam	Orientación
10830963_PF3'	27	Reverse	1024323_PF3'	31	Reverse
10830963_PF5'	26	Forward	1024323_PF5'	28	Forward
1556832_PF3'	24	Reverse	1051740_PF3'	26	Reverse
1556832_PF5'	27	Forward	1051740_PF5'	31	Forward
1799884_PF3'	22	Reverse	1387153_PF3'	28	Reverse
1799884_PF5'	24	Forward	1387153_PF5'	30	Forward
1801058_PF3'	20	Reverse	1799963_PF3'	27	Reverse
1801058_PF5'	27	Forward	1799963_PF5'	20	Forward
1801278_PF3'	21	Reverse	2305948_PF3'	22	Reverse
1801278_PF5'	24	Forward	2305948_PF5'	24	Forward
20563_PF3'	26	Reverse	2322659_PF3'	25	Reverse
20563_PF5'	31	Forward	2322659_PF5'	27	Forward
4402960_PF3'	28	Reverse	3734016_PF3'	24	Reverse
4402960_PF5'	26	Forward	3734016_PF5'	31	Forward
4746822_PF3'	31	Reverse	4696480_PF3'	30	Reverse
4746822_PF5'	28	Forward	4696480_PF5'	30	Forward
5186_PF3'	30	Reverse	4815879_PF3'	32	Reverse
5186_PF5'	27	Forward	4815879_PF5'	32	Forward
5219_PF3'	20	Reverse	4841132_PF3'	35	Reverse
5219_PF5'	22	Forward	4841132_PF5'	25	Forward
560887_PF3'	28	Reverse	4986790_PF3'	27	Reverse
560887_PF5'	27	Forward	4986790_PF5'	25	Forward
699_PF3'	24	Reverse	4986791_PF3'	21	Reverse
699_PF5'	25	Forward	4986791_PF5'	26	Forward
7664413_PF3'	27	Reverse	7754840_PF3'	28	Reverse
7664413_PF5'	24	Forward	7754840_PF5'	32	Forward
7903146_PF3'	31	Reverse	8187710_PF3'	26	Reverse
7903146_PF5'	30	Forward	8187710_PF5'	28	Forward
4606_PF3'	30	Reverse	12255372_PF3'	25	Reverse
4606_PF5'	32	Forward	12255372_PF5'	27	Forward
4680_PF3'	32	Reverse	17121510_PF3'	26	Reverse
4680_PF5'	35	Forward	17121510_PF5'	29	Forward
5442_PF3'	25	Reverse	17222723_PF3'	32	Reverse
5442_PF5'	28	Forward	17222723_PF5'	31	Forward
5443_PF3'	29	Reverse	17408150_PF3'	30	Reverse
5443_PF5'	31	Forward	17408150_PF5'	29	Forward
6025_PF3'	25	Reverse	17636747_PF3'	25	Reverse
6025_PF5'	27	Forward	17636747_PF5'	27	Forward
6269_PF3'	27	Reverse	28360974_PF3'	28	Reverse

6269_PF5'	21	Forward	28360974_PF5'	27	Forward
16944_PF3'	24	Reverse	137852769_PF3'	25	Reverse
16944_PF5'	26	Forward	137852769_PF5'	27	Forward

Amplificación por Reacción de la cadena de la polimerasa

Las reacciones de PCR fueron realizadas de acuerdo con el protocolo de amplificación, en el software de miniPCR 1.6, (figura 18). Para comprobar el funcionamiento de los primers diseñados para los SNPs seleccionados, el resultado de la PCR de 3 SNPs elegidos al azar (rs699, rs5219 y rs560887), evaluados en 17 muestras sanguíneas elegidas al azar, se visualizaron en gel agarosa al 1% (figura 19).

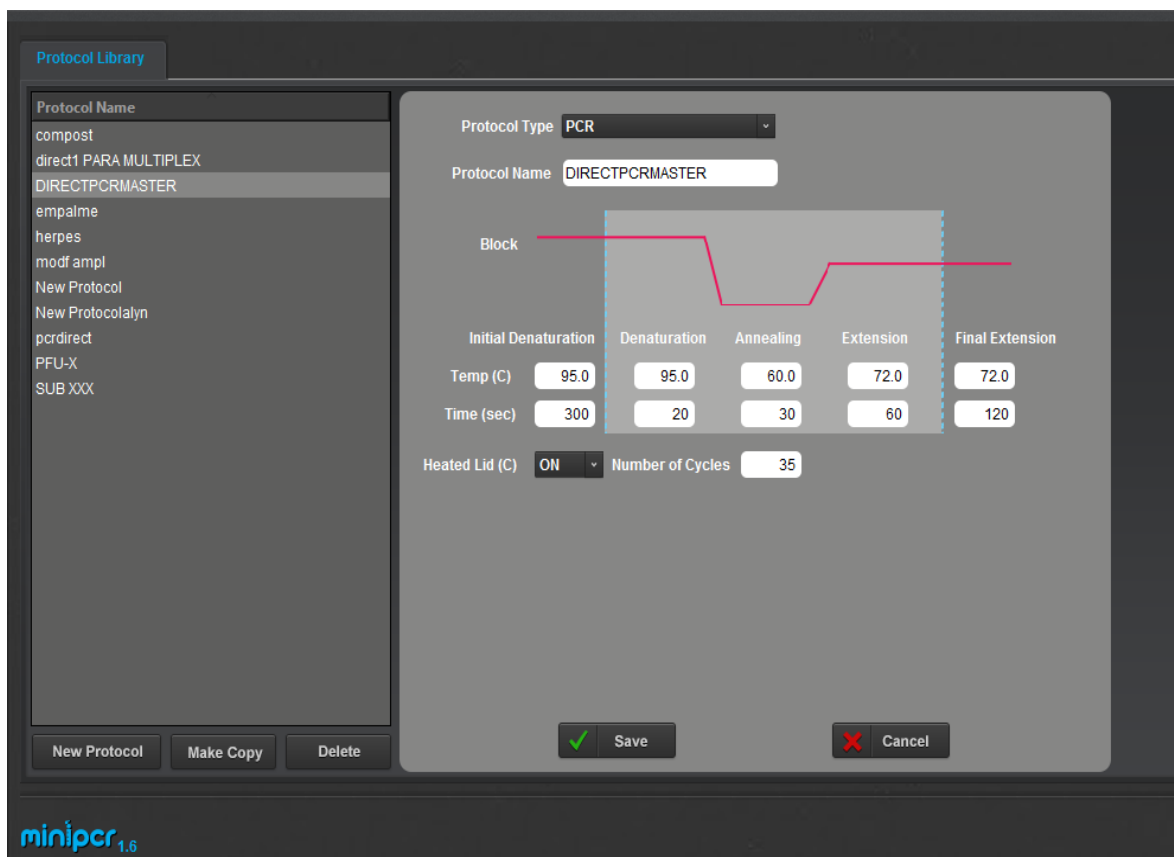


Figura 18: Protocolo en el software de miniPCR 1.6.

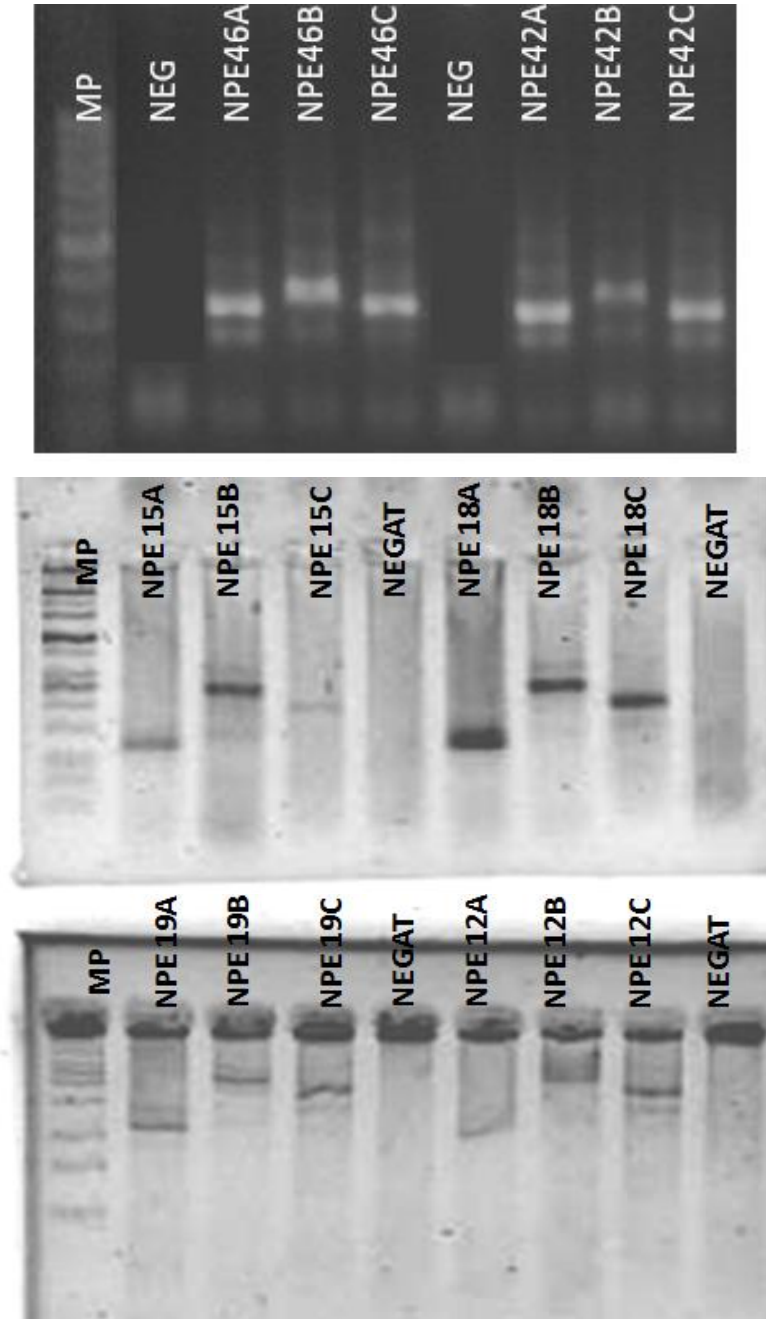


Figura. 19: geles de agarosa 1% con 3rs. *NPE*: No PE *NEGAT/NEG*: Negativo. El Número indica el Número de paciente registrado.

En el gel de agarosa se puede observar el MP (marcador de Peso), los 3rs (A: rs699, B: rs5919 y C: rs560887), identificados en las pacientes elegidas al azar, registradas como NPE (no PE) y su correspondiente número de paciente.

Las bandas identificadas fueron correspondientes al tamaño de diseño de los rs elegidos, para rs699 el tamaño esperado es 200bp, para rs5919 el tamaño esperado es de 400pb, y para rs560887 es 350pb. (figura 20, 21, 22, y 23).

MP	Marcador de peso
A	Rs699
B	Rs4762
C	Rs 560887

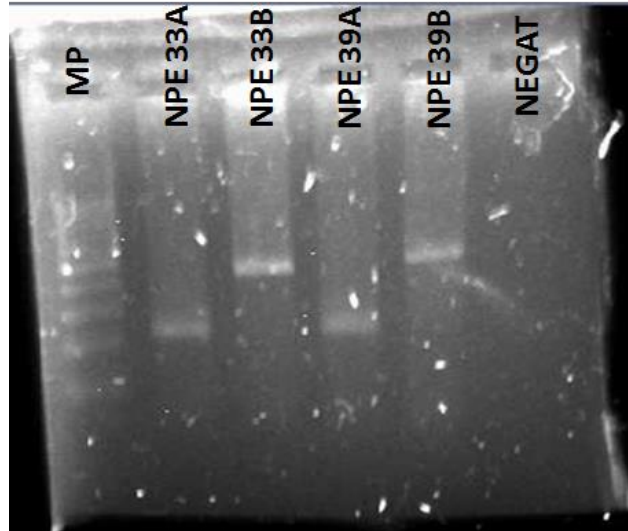


Figura 20: gel 1 de agarosa 1% con 3rs. NPE: No PE NEGAT: Negativo el Número indica el Número de paciente registrado.

MP	Marcador de peso
A	Rs699
B	Rs4762
C	Rs 560887

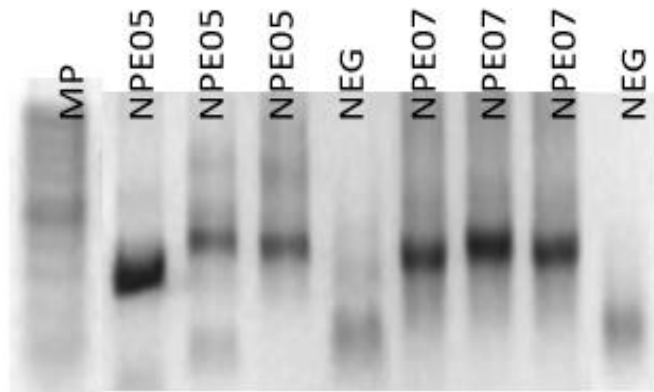


Figura 21: gel 2 de agarosa 1% con 3rs. NPE: No PE NEG: Negativo el Número indica el Número de paciente registrado

MP	Marcador de peso
A	Rs699
B	Rs4762
C	Rs 560887

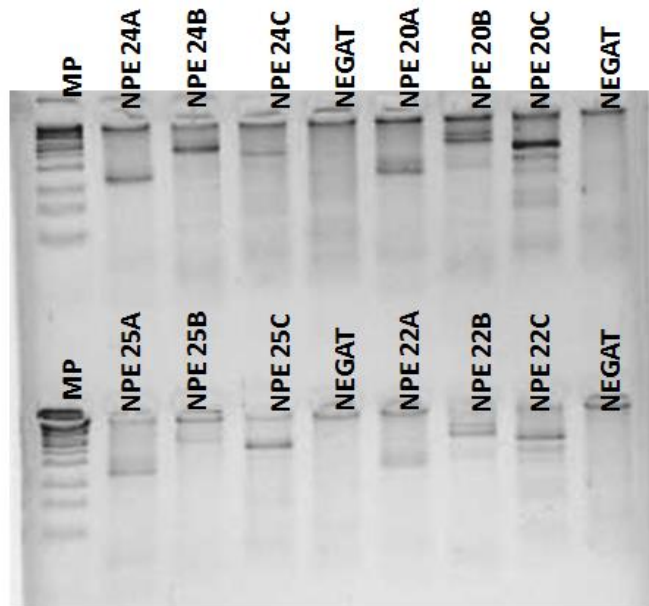


Figura 22: gel 3 de agarosa 1% con 3rs. NPE: No PE NEGAT: Negativo el Número indica el Número de paciente registrado.

MP	Marcador de peso
A	Rs699
B	Rs4762
C	Rs 560887

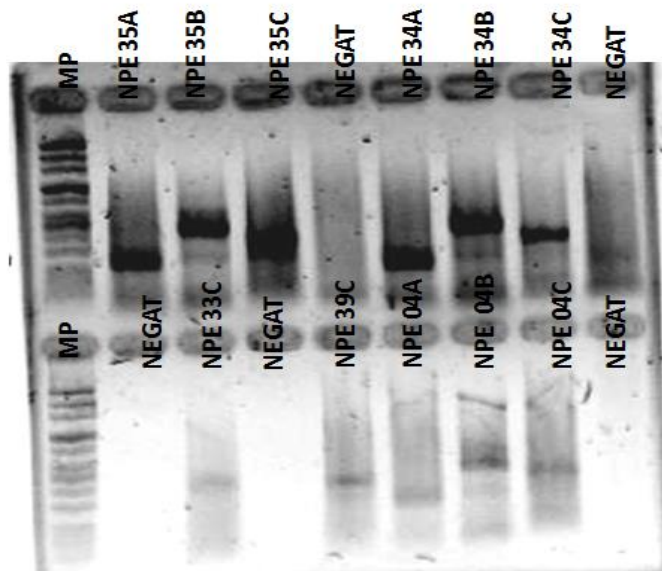


Figura 23: gel 4 de agarosa 1% con 3rs. NPE: No PE NEGAT: Negativo el Número indica el Número de paciente registrado

Para la realización del multiplex con los 50rs, se observó que de acuerdo con el protocolo de amplificación se observaron de manera individual los tamaños esperados de los 3rs analizados. (Figura 24).

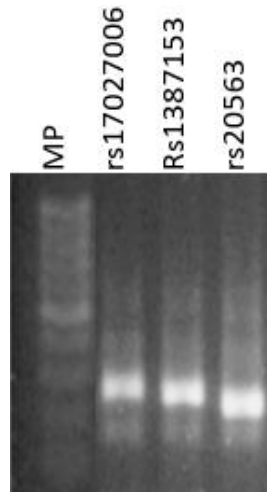


Figura 24: geles de agarosa 1% con productos de PCR multiplex con 3rs.

De acuerdo con el marcador de referencia, los tamaños fueron los siguientes para rs17027006 un peso esperado de 273pb, rs1387153 un peso esperado de 191pb y por último el rs20563 con un peso esperado de 120pb, observándose dicho comportamiento en el gel.

Por lo tanto, la verificación comprueba que la amplificación de los productos y la verificación por medio de geles nos asegura que estamos obteniendo los tamaños esperados por lo que se prosiguió a analizar todas las muestras para dar paso a la secuenciación.

Secuenciación y alineamiento

Posteriormente se realizó la purificación de los productos de PCR con AMPure XP, de acuerdo con el protocolo con beads, para poder introducir las muestras en el secuenciador *MinION™ nanopore DNA sequencer*, donde se obtuvieron mediante su software las secuencias de nuestras muestras, estas secuencias se analizaron en formato “FASTA” para ser alineadas o comparadas con las secuencias obtenidas anteriormente en NCBI, una vez identificados por códigos de barra nuestras pacientes de estudio, se capturaron las secuencias y se copiaron en EXCEL, con el registro de los alelos en cada rs de interés en PE, se realizó la determinación de los SNPs en nuestras pacientes control y pacientes con preeclampsia, identificando los alelos y genotipos de 42 rs , calculando la frecuencia absoluta, frecuencia relativa y porcentaje de cada grupo (obtenidas por recuento directo), encontrando los valores en las siguientes tablas (tabla 17 y tabla 18).

Además, posteriormente se procedió al cálculo de la razón de momios (RM) e intervalos de confianza (IC) del 95% (tabla 19), estos valores se calculan de acuerdo con Altman, 1991. El análisis estadístico se realizó con un software estándar (MedCalc statistical software para servidores de Windows). Sin embargo, se puede notar que algunas asociaciones entre los datos de las variables no resultaron estadísticamente significativas, en efecto de que antes del cálculo del RM se registró la inexistencia de casos en algunas de las posiciones de la tabla de contingencia. Además los resultados obtenidos de RM se puede usar para determinar si una exposición en particular es un factor de riesgo para un resultado en particular, y para comparar la magnitud de varios factores de riesgo para ese resultado, según Szumilas M, 2010, describe lo siguiente: $RM = 1$ La exposición no afecta las probabilidades de resultado, $RM > 1$ Exposición asociada con mayores probabilidades de resultado y $RM < 1$ Exposición asociada con menores probabilidades de resultado; En nuestro análisis de 42 datos obtenidos, se consiguieron 11 datos con una exposición menor de probabilidad de riesgo de PE con

un 26.19%, y el resto de los 31 datos presenta un comportamiento de mayor probabilidad de obtener resultados de PE con un 74%.

Tabla 17: Frecuencias alélicas de los rs en pacientes control

rs	ALELO	F. ABSO	F. RELATIVA	F. RELATI. %	GENOTIPO	rs	ALELO	F. ABSO	F. RELATIVA	F. RELATI. %	GENOTIPO
1024323	A	9	0.10843373	10.8433735	AA	4402960	A	15	0.15625	15.625	AA
	G	38	0.45783133	45.7831325	GG		G	35	0.36458333	36.4583333	GG
	R	36	0.43373494	43.373494	AG ó GA		R	46	0.47916667	47.9166667	AG ó GA
	n	83	1	100			n	96	1	100	
1051740	A	33	0.34375	34.375	AA	4606	A	41	0.43157895	43.1578947	AA
	G	8	0.08333333	8.33333333	GG		T	12	0.12631579	12.6315789	TT
	R	55	0.57291667	57.2916667	GA ó GA		W	42	0.44210526	44.2105263	AT ó TA
	n	96	1	100			n	95	1	100	
10830963	C	54	0.5625	56.25	CC	4680	A	12	0.12765957	12.7659574	AA
	G	4	0.04166667	4.16666667	GG		G	35	0.37234043	37.2340426	GG
	S	38	0.39583333	39.5833333	CG ó GC		R	47	0.5	50	AG ó GA
	n	96	1	100			n	94	1	100	
12255372	A	4	0.04166667	4.16666667	AA	4696480	A	42	0.4375	43.75	AA
	C	59	0.61458333	61.4583333	CC		T	12	0.125	12.5	TT
	M	33	0.34375	34.375	AC ó CA		W	42	0.4375	43.75	AT ó TA
	n	96	1	100			n	96	1	100	
137852769	C	84	0.96551724	96.5517241	CC	4746822	A	19	0.2	20	AA
	S	3	0.03448276	3.44827586	CG ó GC		G	22	0.23157895	23.1578947	GG
	n	87	1	100			R	54	0.56842105	56.8421053	AG ó GA
						n	95	1	100		
1387153	A	4	0.04166667	4.16666667	AA	4815879	G	93	0.96875	96.875	GG
	G	55	0.57291667	57.2916667	GG		R	3	0.03125	3.125	AG ó GA
	R	37	0.38541667	38.5416667	AG ó GA		n	96	1	100	
	n	96	1	100							
1556832	A	17	0.17894737	17.8947368	AA	4841132	A	7	0.07291667	7.29166667	AA
	G	26	0.27368421	27.3684211	GG		G	62	0.64583333	64.5833333	GG
	R	52	0.54736842	54.7368421	AG ó GA		R	27	0.28125	28.125	AG ó GA
	n	95	1	100			n	96	1	100	
16944	A	22	0.22916667	22.9166667	AA	4986790	A	92	0.95833333	95.8333333	AA
	G	33	0.34375	34.375	GG		R	4	0.04166667	4.16666667	AG ó GA
	R	41	0.42708333	42.7083333	AG ó GA		n	96	1	100	
	n	96	1	100							
17121510	A	2	0.02222222	2.22222222	AA	4986791	G	93	0.96875	96.875	GG
	R	88	0.97777778	97.7777778	AG ó GA		R	3	0.03125	3.125	AG ó GA
	n	90	1	100			n	96	1	100	
17222723	A	89	0.92708333	92.7083333	AA	5186	A	42	0.44210526	44.2105263	AA
	T	1	0.01041667	1.04166667	TT		C	15	0.15789474	15.7894737	CC
	W	6	0.0625	6.25	AT ó TA		M	38	0.4	40	AC ó CA
	n	96	1	100			n	95	1	100	
17408150	A	79	0.89772727	89.7727273	AA	5219	A	16	0.16842105	16.8421053	AA
	W	9	0.10227273	10.2272727	AT ó TA		G	30	0.31578947	31.5789474	GG
	n	88	1	100			R	49	0.51578947	51.5789474	AG ó GA
						n	95	1	100		
17636747	G	92	0.9787234	97.8723404	GG	5442	G	90	0.9375	93.75	GG
	R	2	0.0212766	2.12765957	AG ó GA		R	6	0.0625	6.25	AG ó GA
	n	94	1	100			n	96	1	100	
1799884	A	2	0.02631579	2.63157895	AA	5443	A	11	0.11458333	11.4583333	AA
	G	44	0.57894737	57.8947368	GG		G	49	0.51041667	51.0416667	GG
	R	30	0.39473684	39.4736842	AG ó GA		R	36	0.375	37.5	AG ó GA
	n	76	1	100			n	96	1	100	
1799963	G	81	0.94186047	94.1860465	GG	560887	A	2	0.02105263	2.10526316	AA
	R	5	0.05813953	5.81395349	AG ó GA		G	63	0.66315789	66.3157895	GG
							R	30	0.31578947	31.5789474	AG ó GA
	n	86	1	100			n	95	1	100	

1801058						6025					
	A	17	0.29310345	29.3103448	AA		G	82	0.97619048	97.6190476	GG
	G	41	0.70689655	70.6896552	GG		R	2	0.02380952	2.38095238	AG ó GA
	R	42	0.72413793	72.4137931	AG ó GA						
	n	58	1	100			n	84	1	100	
1801278						6269					
	E	1	0.01086957	1.08695652			A	55	0.57291667	57.2916667	AA
	G	82	0.89130435	89.1304348	GG		G	9	0.09375	9.375	GG
	R	9	0.09782609	9.7826087	AG ó GA		R	32	0.33333333	33.3333333	AG ó GA
	n	92	1	100			n	96	1	100	
20563						699					
	G	80	0.85	85	GG		A	12	0.125	12.5	AA
	R	15	0.15	15	AG ó GA		G	42	0.4375	43.75	GG
							R	42	0.4375	43.75	AG ó GA
	n	95	1	100			n	96	1	100	
2305948						7664413					
	A	1	0.01041667	1.04166667	AA		A	15	0.15625	15.625	AA
	G	90	0.9375	93.75	GG		G	34	0.35416667	35.4166667	GG
	R	5	0.05208333	5.20833333	AG ó GA		R	47	0.48958333	48.9583333	AG ó GA
	n	96	1	100			n	96	1	100	
2322659						7754840					
	G	66	0.6875	68.75	GG		C	8	0.08333333	8.33333333	CC
	R	30	0.3125	31.25	AG ó GA		G	58	0.60416667	60.4166667	GG
							S	30	0.3125	31.25	CG ó GC
	n	96	1	100			n	96	1	100	
28360974						7903146					
	A	4	0.04210526	4.21052632	AA		A	5	0.05263158	5.26315789	AA
	C	61	0.64210526	64.2105263	CC		G	55	0.57894737	57.8947368	GG
	M	30	0.31578947	31.5789474	AC ó CA		R	35	0.36842105	36.8421053	AG ó GA
	n	95	1	100			n	95	1	100	
3734016						8187710					
	C	55	0.57291667	57.2916667	CC		A	1	0.01075269	1.07526882	AA
	G	9	0.09375	9.375	GG		G	83	0.89247312	89.2473118	GG
	S	32	0.33333333	33.3333333	CG ó GC		R	9	0.09677419	9.67741935	AG ó GA
	n	96	1	100			n	93	1	100	

Tabla 18: Frecuencias alélicas de los rs en pacientes con preeclampsia

rs	ALELO	F. ABSO	F. RELATIVA	F. RELATI. %	GENOTIPO	rs	ALELO	F. ABSO	F. RELATIVA	F. RELATI. %	GENOTIPO
1024323	G	4	0.66666667	66.6666667	GG	4402960	C	1	0.16666667	16.6666667	CC
	R	2	0.33333333	33.3333333	AG o GA		M	5	0.83333333	83.3333333	AC o CA
	n	6	1	100			R	0	0	100	
1051740	G	0	0	0	GG	4606	n	6			
	R	6	1	100	AG o GA		C	6	1	100	CC
	n	6	1	100			W	0	0	0	AT o TA
10830963	C	4	0.66666667	66.6666667	CC	4680	n	6	1	100	
	S	2	0.33333333	33.3333333	CG o GC		G	6	1	100	GG
	n	6	1	100			R	0	0	0	AG o GA
12255372	C	6	1	100	CC	4696480	n	6	1	100	
	M	0	0	0	AC o CA		T	0	0	0	TT
	n	6	1	100			W	6	1	100	AT o TA
137852769	C	6	1	100	CC	4746822	n	6	1	100	
	S	0	0	0	CG o GC		A	1	0.16666667	16.6666667	AA
	n	6	1	100			G	1	0.16666667	16.6666667	GG
1387153	G	4	0.66666667	66.6666667	GG	4815879	R	4	0.66666667	66.6666667	AG o GA
	R	2	0.33333333	33.3333333	AG o GA		n	6	1	100	
	n	6	1	100			G	6	1	100	GG
1556832	G	5	0.83333333	83.3333333	GG	4841132	R	0	0	0	AG o GA
	R	1	0.16666667	16.6666667	AG o GA		n	6	1	100	
	n	6	1	100			A	0	0	0	AA
16944	A	1	0.2	20	AA	4986790	G	4	0.66666667	66.6666667	GG
	G	2	0.4	40	GG		R	2	0.33333333	33.3333333	AG o GA
	R	2	0.4	40	AG o GA		n	6	1	100	
	n	5	1	100			A	5	0.83333333	83.3333333	AA
17121510	A	4	0.8	80	AA	4986791	R	1	0.16666667	16.6666667	AG o GA
	R	1	0.2	20	AG o GA		n	6	1	100	
	n	5	1	100			G	2	1	100	GG
17222723	A	5	1	100	AA	5186	R	0	0	0	AG o GA
	W	0	0	0	AT o TA		n	2	1	100	
	n	5	1	100			A	2	0.33333333	33.3333333	AA
17408150	A	5	0.83333333	83.3333333	AA	5219	C	4	0.66666667	66.6666667	CC
	W	1	0.16666667	16.6666667	AT o TA		M	0	0	0	AC o CA
	n	6	1	100			n	6	1	100	
17636747	G	6	1	100	GG	5442	A	4	0.66666667	66.6666667	AA
	R	0	0	0	AG o GA		G	2	0.33333333	33.3333333	GG
	n	6	1	100			R	0	0	0	AG o GA
1799884	G	6	1	100	GG	5443	n	6	1	100	
	R	0	0	0	AG o GA		A	0	0	0	AA
	n	6	1	100			G	5	0.83333333	83.3333333	GG
1799963	G	4	1	100	GG	560887	R	1	0.16666667	16.6666667	AG o GA
	R	0	0	0	AG o GA		n	6	1	100	
	n	4	1	100			A	0	0	0	AA
1801058	G	1	0.16666667	16.6666667	GG	6025	G	6	1	100	GG
	R	5	0.83333333	83.3333333	AG o GA		R	0	0	0	AG o GA
	n	6	1	100			n	6	1	100	
1801278	G	5	0.83333333	83.3333333	GG	6269	A	0	0	0	AA
	R	1	0.16666667	16.6666667	AG o GA		G	2	0.33333333	33.3333333	GG
	n	6	1	100			R	4	0.66666667	66.6666667	AG o GA
2305948	G	6	1	100	GG	699	n	6	1	100	
	R	0	0	0	AG o GA		A	0	0	0	AA
	n	6	1	100			G	3	0.75	75	GG
17636747	G	6	1	100	GG	71A	R	1	0.25	25	AG o GA
	R	0	0	0	AG o GA		n	4	1	100	
	n	6	1	100							
28360974	G	6	1	100	GG						
	M	0	0	0	AC o CA						
	n	6	1	100							

3734016						7664413					
	G	5	0.83333333	83.3333333	GG		A	5	0.83333333	83.3333333	AA
	R	1	0.16666667	16.6666667	AG o GA		G	0	0	0	GG
	n	6	1	100			R	1	0.16666667	16.6666667	AG o GA
4746822							n	6	1	100	
	R	4	0.66666667	66.6666667	AG o GA	7754840					
	G	1	0.16666667	16.6666667	GG		C	0	0	0	CC
	A	1	0.16666667	16.6666667	AA		G	1	0.33333333	33.3333333	GG
	n	6	1	100			S	2	0.66666667	66.6666667	CG o GC
17636747							n	3	1	100	
	G	6	1	100	GG	7903146					
	R	0	0	0	AG o GA		A	0	0	0	AA
	n	6	1	100			G	6	1	100	GG
8187710							R	0	0	0	AG o GA
	A	0	0	0	AA		n	6	1	100	
	G	6	1	100	GG						
	R	0	0	0	AG o GA						
	n	6	1	100							

Tabla 19: Razón de momios para los polimorfismos genéticos de PE.

rs	ALELO	OR	IC 95%	nivel de significancia
699	C	2.16	0.1043 to 44.7316	0.62
4606	T	0.23	0.0122 to 4.3532	0.33
4680	G	16.03	0.8757 to 293.7553	0.06
5186	C	5.05	0.8464 to 30.2354	0.08
5219	G	0.08	0.1324 to 4.4275	0.7655
5442	G	0.35	0.0152 to 8.1083	0.51
5443	A	0.38	0.0198 to 7.3690	0.52
6025	A	2.54	0.1099 to 58.6279	0.56
6269	G	31.32	1.3930 to 704.0177	0.03
16944	G	1.31	0.1126 to 15.3447	0.83
20563	G	0.18	0.0035 to 9.4829	0.40
560887	A	2.05	0.0884 to 47.3420	0.66
1024323	G	2.60	0.4460 to 15.1560	0.29
1051740	T	21.54	1.1753 to 394.6777	0.04
1387153	T	7.38	1.0218 to 53.2308	0.05
1556832	T	0.31	0.0328 to 2.8515	0.30
1799884	G	0.73	0.0314 to 16.9748	0.84
1799963	G	0.50	0.0230 to 10.7272	0.66
1801058	T	0.66	1.3093 to 111.0594	0.03
1801278	A	1.82	0.1912 to 17.3700	0.60
2305948	T	2.85	0.1233 to 65.6817	0.51
2322659	T	2.31	0.0448 to 119.2038	0.68
3734016	G	28.00	2.9511 to 265.6672	0.00
4402960	T	12.67	1.3638 to 117.6457	0.03
4696480	T	4.33	0.2297 to 81.7440	0.33
4746822	T	25.00	1.2002 to 520.7629	0.0377
4815879	G	278.78	13.4987 to 5757.3824	0.00
4841132	G	1.05	0.0512 to 21.4027	0.98
4986790	G	700.33	25.4700 to 19256.6584	0.0001
4986791	T	4.29	0.1783 to 103.1491	0.37
7664413	T	17.63	0.9622 to 323.0201	0.05
7754840	T	0.01	0.0001 to 0.4569	0.02
7903146	T	0.82	0.0405 to 16.5389	0.90
8187710	G	96.65	5.1013 to 1831.2437	0.00
10830963	C	1.17	0.2039 to 6.7428	0.86
12255372	T	1.02	0.0490 to 21.0912	0.99
17121510	G	11.00	0.8160 to 148.2850	0.07
17222723	T	2013.00	36.3810 to 111381.4835	0.00
17408150	T	43.89	4.6024 to 418.5275	0.00
17636747	T	2.14	0.0997 to 46.0584	0.63
28360974	G	1599.00	29.2140 to 87519.5954	0.00
137852769	G	313.86	14.5877 to 6752.6907	0.0002

Discusión

Uno de los principales problemas de salud pública en áreas obstétricas, es la preeclampsia principalmente afectando los países menos desarrollados, siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad materna y perinatal, esta enfermedad se desarrolla específicamente durante el embarazo, diagnosticada tradicionalmente mediante la presentación combinada de hipertensión y proteinuria llegando a afectar otros órganos, por lo que se considera que es multiorgánica y también multifactorial, cabe destacar que la etiología de la preeclampsia es aún desconocida y además su prevención y la predicción efectiva no ha sido posible, por lo tanto cuando no se trata, la preeclampsia puede ser letal actualmente solo los tratamientos clínicos pueden ser dirigidos principalmente a prevenir la morbilidad materna como por ejemplo la Eclampsia y la mortalidad³¹, sin embargo en las últimas décadas se han identificado algunos de los principales factores de riesgo y la probable manipulación de estos factores podría resultar en una disminución en la frecuencia para la preeclampsia⁷, a principios de la década de los 90's se creía que ciertos fármacos eran los grandes prometedores de la prevención de la preeclampsia por ejemplo, la aspirina y los suplementos de calcio, entre otros, pero hoy en día se sabe que tales fármacos solo muestran un beneficio con bajo potencial por lo tanto solo ayudan como tratamientos durante la preeclampsia⁴⁰, en este trabajo fue importante desarrollar una estrategia experimental con el fin de establecer un método confiable de predicción de preeclampsia como enfermedad multifactorial, con el principal objetivo de detectar a la población de riesgo, a través de la detección de las alteraciones del DNA que causan la enfermedad, por medio de la integración de marcadores moleculares que participan en el desarrollo y progresión de la preeclampsia por medio del estudio de los SNPs ya registrados para la preeclampsia, desarrollándose de manera bioinformática la investigación a través de plataformas específicas en línea, con la finalidad de estimar la diversidad de los caracteres distintivos de la población en riesgo de padecerla y tener un perfil genético de las pacientes el cual sería una herramienta efectiva para el médico para poder dar un tratamiento a tratar de manera más eficaz, disminuyendo la gravedad y las tasas de morbimortalidad de la PE. Esto es basado de acuerdo con lo que se conoce como a la era post-genómica que dio paso a la Proteómica teniendo como fin,

el estudio de todas las proteínas expresadas en el tiempo, estructuras, interacciones, función y propiedades bioquímicas²⁰, este tipo de investigación favorablemente es llevada a cabo por los avances en la genómica y la bioinformática. Sin embargo; el análisis de las interacciones se lleva a cabo a nivel proteína con proteína, proteína con ácidos nucleicos, proteína con metabolitos y son representados a través de nodos conectados entre enlaces que representan interacciones al menos entre dos componentes². Durante la primera etapa del proyecto se logró realizar un análisis con herramientas bioinformáticas identificando los procesos celulares en los que participan los marcadores moleculares para la preeclampsia donde se encontró que de los 105 polimorfismos distribuidos en 95 genes, tienen asignado un proceso biológico según “Gene Ontology”, analizando a su vez la interacción molecular entre los marcadores genéticos, mediante una elaboración de un interactoma, lo que se pudo determinar que la mayoría de los nodos están interactuando entre sí, y que la gran parte de ellos están participando en la coexpresión, y que además algunos tienen interacción para converger en algunas rutas de expresión, por lo que se hace aún más interesante poder estudiar las funciones de acuerdo a su clasificación en tres aspectos: Función molecular (actividades moleculares de los productos génicos), componente celular (donde los productos de genes están activos) y proceso biológico (vías y procesos más amplios de las actividades de múltiples productos de genes). Donde el proceso biológico tiene participación de sus proteínas y genes en procesos celulares, procesos metabólicos y regulación biológica. La construcción de estas redes tiene la finalidad de visualizar los mecanismos moleculares de funciones biológicas de acuerdo con las interacciones dinámicas presentes entre las biomoléculas que existen en la célula, para poder tener conocimiento de estas interacciones se requiere de tecnologías de alto rendimiento que ofrecen una plataforma para trazar relaciones en escala de proteoma y del genoma³³, sin embargo, es importante destacar que los métodos computacionales no poseen gran exactitud en las uniones e interacción de proteínas.

De acuerdo con la plataforma PathwayStudio, se pudo identificar 5 patologías asociadas a los genes de la Preeclampsia, y además analizando las sintomatologías e historial clínico que presentan las pacientes con Preeclampsia, podemos identificar que

si corresponden a los factores de riesgo y que están muy asociadas con nuestros resultados coincidiendo con lo dicho por el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC) y la Guía Práctica Clínica de Trastornos Hipertensivos del Embarazo del 2013 (GPC) y también con las descripciones de Duley *et al*, 2006.

Durante la segunda etapa del proyecto, se realizó de manera estratégica el diseño de primers de acuerdo con lo estandarizado por la tecnología de innovación por el laboratorio de diagnóstico molecular QUAE, primero se descargaron las secuencias ya reportadas en NCBI para preeclampsia. Este padecimiento es importante en la investigación ya que predice tasas elevadas de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en etapas posteriores de la vida, lo que podría ser motivo de una posterior educación e intervención sobre el estilo de vida³¹.

Mientras, en el desarrollo de la tercera etapa del proyecto se desarrolló estratégicamente *in silico* logrando identificar las enfermedades asociadas con los genes de PE, la distribución de los SNPs funcionales y su efecto²³, logrando además de manera reproducible y económica mediante herramientas moleculares el desarrollo del paquete tecnológico con PCR multiplex, la cual ha sido en los últimos años una muy prometedora técnica utilizada en áreas de enfermedades infecciosas y microbiología clínica con extensas y variadas aportaciones¹⁶, cabe destacar que la técnica de PCR multiplex en este proyecto fue llevada a cabo mediante la estrategia desarrollada y establecida en Grupo QUAE (2016), existiendo cambios en los procedimientos convencionales a nivel de concentraciones de componentes, programa de protocolo (temperaturas y tiempos), anexo de códigos de barra y tecnología para la experimentación y comprobación de productos (miniPCR y electroforesis blueGelTM).

Conclusiones

- La plataforma SNPedia es una herramienta bioinformática que ofrece excelente información referente a los SNPs encontrados en el desarrollo de la Preeclampsia.
- Las plataformas elegidas como PathwayStudio, Genemania y GenOntology, son herramientas que ayudan a comprender el funcionamiento celular y la interacción de los genes asociados a la Preeclampsia
- Los oligonucleótidos de 42 marcadores asociados a preeclampsia para la amplificación de la región del Polimorfismo de un solo nucleótido fueron diseñados de manera satisfactoria de acuerdo con la tecnología de innovación del laboratorio de Diagnóstico molecular grupo QUAE.
- Se usó la prueba paramétrica t de Student agrupadas de dos colas para analizar las variables continuas y con homocedasticidad como resultado de varianzas iguales, de acuerdo con criterios estadísticos: coeficiente de simetría y la evaluación de homocedasticidad con su correspondiente nivel de significancia, requeridos para aplicar la prueba T de Student en muestras independientes.
- Se realizó un metaanálisis de búsqueda de Razón de momios (RM) de los 42rs y en la población en la que se ha estudiado, así como la condición o padecimiento en la que se ha estudiado.
- Se desarrolló el paquete tecnológico de Diagnóstico molecular con sangre de 96 personas de las cuales 6 eran pacientes de PE.
- Evaluación por frecuencias alélicas y RM en 96 pacientes, aun con 6 pacientes con PE se evaluó la presencia de la mayoría de los 42rs con un 95.2%.
- Se identificaron las enfermedades asociadas con los genes de PE, la distribución de los SNPs funcionales y su efecto.
- Se logró de manera reproducible y económica mediante herramientas moleculares el desarrollo del paquete tecnológico con PCR.

Referencias bibliográficas

1. Ananth V & Vintzileos M. Medically indicated preterm birth: Recognizing the importance of the problem. *Clin Perinatol* (2008)., 35, pp. 53-67.
2. Barabási A-L., Oltvai Z N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature* (2004). 5: 101-113.
3. Becerra V & Paredes M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc.* (2000), 60, pp. 270-281.
4. Chien PF, Arnott N, Gordon A, Owen P, Khan KS. How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of preeclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? *BJOG.* (2000)., 107, pp. 196-208.
5. Clark, A.G., Hubisz, M.J., Bustamante, C.D., Williamson, S.H. & Nielsen, R. Ascertainment bias in studies of human genomewide polymorphism. *Genome Research* (2005)., 15, pp. 1496–1502.
6. Dadelszen, P., Payne, B., Li, J., Ansermino, J., Broughton, F., Côté A., Douglas, J., Gruslin, A., Hutcheon, J., Joseph, K., Kyle, P., Lee, T., Loughna, P., Menzies, J., Merialdi, M., Millman, A., Moore, P., Mountquin, J., Magee, L.. *Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: development and validation of the fullPIERS model.* *The Lancet* (2011)., 377, pp. 219-227.
7. Dekker G, & Sibai B. Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. (2001) 15, pp 209-357.
8. Duley L, Henderson-Smart DJ, & Meher S. Drugs for treatment of very high blood pressure during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* (2006). p19.
9. Gibson & Muse. *A Primer of Genome Science 2da Edición* (2004)., Estados Unidos *Asociados Sinauer.*
10. Hood, L., Heath, J.R., Phelps, M.E. & Lin, B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* (2004)., 306, pp. 640–643.

11. Kenyon GL., Marini DM., Fuchs E., Galas DJ., Kirsch JF., Leyh TS., La definición del mandato de la proteómica en la era post-genómica: informe del taller *Mol Cell Proteómica* (2002), 1 pp. 763-780.
12. Lala P., & Chakraborty C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury, *Elsevier* (2003)., 24,6. pp. 575-587.
13. Lista Varela Alvaro. Biología molecular de la depresión “alteraciones intraneuronales y desarrollo de nuevas oportunidades terapéuticas., *Tendencias en Medicina*. (2008). pp 85-96.
14. López C, Vico Z, Santalla H & Carrillo B, Predicción de preeclampsia en primer trimestre (2003)., p 20.
15. Mattar F & Sibai BM. Prevention of Pre-eclampsia. *Semin Perinatol* (1999).; 23, pp. 58-64.
16. Méndez-Álvarez & Pérez-Roth. Multiplex PCR in clinical microbiology, *Elsevier* (2004)., 22. 3. pp 129-200.
17. Mora, F, Secretaria de Salud, prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia, *lineamiento técnico* (2002).. pp 1-36.
18. Myers, J & Baker, P. Hypertensive diseases and eclampsia. *Curr Opin Obstet Gynecol*. (2002). 14, pp.7-33.
19. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. (No authors listed) *Am J Obstet Gynecol*, (2000); 183. 1, S1-S22.
20. Neet KE, Lee JC Caracterización biofísica de proteínas en la era post-genómica de la Proteómica. *Mol Cell Proteómica*, 1 (2002), pp. 415-420.
21. Nielsen, R. & Signorovitch, J. Correcting for ascertainment biases when analyzing SNP data: applications to the estimation of linkage disequilibrium. *Theoretical Population Biology* (2003)., 63, pp. 245–255.
22. Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*. (2001). 409, pp. 211-215.

23. Ramírez, J., Vargas, G., Tovilla, C., & Fragoso, J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rsNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México* (2012)., 149, p. 220., De NCBI Base de datos.
24. Romero A, Tena A. Epidemiología, clasificación y factores de riesgo en preeclampsia: Preeclampsia. Enfermedades hipertensivas del embarazo. *McGrawHill* (2009). 1, pp.1-15.
25. Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S. Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. & Altshuler, D. International SNP Map Working Group.. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, (2001). 409, pp. 928–933.
26. Sáez, O., Carvajal C Jorge. Tamizaje y prevención de preeclampsia guiado por Doppler de arterias uterinas: revisión sistemática de la literatura *Rev Chil. Obstet Ginecol* (2012); 77. 3, pp. 235 – 242.
27. Sanchez, E. simposio “Epidemiología de la preeclampsia” *Rev Per Ginecol Obstet.* (2006). 52. 4, pp 213-218.
28. Sánchez-Rodríguez, E., Nava, S., Morán, J., Romero, A., Cerbón, C., Estado actual de la preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Hospital de Ginecología Número 4. IMSS. *Revista de Investigación Clínica.* (2010) 62.3, pp 252-260.
29. Secretaría de Salud. Lineamiento Técnico. Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia. 4a. (2007). Ed. México

30. Simpson J. Amplified fragment length polymorphisms. México, *Bol. Soc. Bot.*. (1997). 60. pp. 73-76.
31. Steegers, A., Daddszen, P., Duvekot, J., Pijnenborg, R. Pre-eclampsia. *The Lancet*. (2010). 376, pp. 631-634.
32. Szumilas M, Explaining Odds Ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* (2010). 19. 3. pp. 227–229.
33. Uzoma I, Zhu H, Interactome Mapping: Using Protein Microarray Technology to Reconstruct Diverse Protein Networks *Genomic Proteomics Bioinformatics* (2013). pp 1-27.
34. Vargas-Hernández. Enfermedad hipertensiva durante el embarazo. *Rev Hosp Jua.* (1999)., 6. pp. 125-34.
35. Velasco M, & Navarrete H. Mortalidad materna en el IMSS, 1991-2005. Un periodo de cambios. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (2006), 44. S121-S128.
36. Velasco V, Navarrete E, Cardona J, & Madrazo M. Mortalidad materna por preeclampsia-eclampsia en el Instituto Mexicano del Seguro Social 1987-96. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (1997). 35, pp. 451-455.
37. Villanueva Egan L. A., & Collado Peña S. P., Medigraphic Artemisa, *Rev Fac Med UNAM* (2007).. 2, p50.
38. Villar M, & Sibai B. Clinical significance of elevated mean arterial blood pressure in second trimester and threshold increase in systolic or diastolic blood pressure during third trimester. *Am J Obstet Gynecol* (1989). 160, 2. pp. 419–423.
39. Von Daddszen P, & Magee L. What matters in preeclampsia are the associated adverse outcomes. Canada. *Curr Opin Obstet Gynecol* (2008).. 20, pp 110-115.
40. WJ, Ben., Roberts, C., Thangaratinam, S., Magee, L., Christianne, J., Justus, G.. Pre-eclampsia. *The Lancet* (2016)., 387, pp. 999-1011.
41. Zhang J, Meikle S, & Trumble A. Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens Pregnancy* (2003). 22,2. pp. 203-12.

ANEXOS

1. Encuesta para pacientes

Datos generales

- Edad:
- Ocupación:
- Talla (cm):
- Peso (Kg):
- Nivel socioeconomico (ingresos por mes \$)

\$<1000 ()	1000-3000 ()	\$>3000 ()

Afecciones médicas

- Hipertensión crónica
- Diabetes mellitus
- Enfermedad del tejido conectivo
- Infecciones en vías urinarias
- Otros

SI ()	NO ()
SI ()	NO ()
SI ()	NO ()
SI ()	NO ()

Habitos nocivos

- Consumo de alcohol
- Consumo de tabaco
- Otros

SI ()	CANTIDAD X SEMANA:	NO ()
SI ()	CANTIDAD X SEMANA:	NO ()
		CANTIDAD X SEMANA:

Historia medica

- Antecedentes personales de PE o enfermedad cardiovascular, etc
- Antecedentes familiares de PE o enfermedad cardiovascular, etc.

Historia obstetrica

- Número de gestaciones
- Partos a termino
- Partos prematuros
- Abortos
- Numero de fetos en la gestación actual
- Control pre-natal (consultas)

1. Carta de consentimiento del paciente



Cuernavaca, Mor., a _____ de _____ del 2016.

Proyecto de investigación: “*Detección de múltiples marcadores moleculares para el diagnóstico de la pre-eclampsia*”.

IBT. Alyn Flores Herrerías

Investigador-analista.

A través de esta carta, quiero dar mi consentimiento para utilizar la(s) muestra(s) tomada(s), solo con fines de investigación, mis datos personales no podrán utilizarse por ningún motivo en los documentos que se deriven de esta investigación, ni utilizarlos con fines comerciales.

Atentamente:

(nombre y firma del paciente)

Testigo 1

nombre y firma

Testigo 2

nombre y firma

Toda Investigación médica que se realiza en el laboratorio de Diagnóstico Molecular “Grupo QUAe” se apega en forma estricta a los principios vertidos en la Declaración de Helsinki. Todos los protocolos son revisados en forma independiente y libre de conflicto de intereses y que cada estudio cumpla con los principios éticos de RESPETO al individuo, BENEFICENCIA (reducir al mínimo los riesgos y buscando siempre el bienestar del individuo) y JUSTICIA (participación equitativa de todos los sujetos candidatos a un estudio de investigación).

Asesores del Proyecto:

¹Dra. Vera Lucia Petricevich
Facultad de Medicina UAEM
Lab. Inflamación y toxicología

²Dr. Gabriel Guillen Solís
Grupo QUAe Lab.
Diagnóstico Molecular

¹Calle la Luz núm. 44, Col. Chapultepec, CP 62450. Dentro del hospital Morelos.

²Leñeros S/N, Los Volcanes, 62350 Cuernavaca, Mor.



Cuernavaca, Mor., 31 de octubre de 2018.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Detección de múltiples marcadores moleculares para el diagnóstico de la preeclampsia", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alyn Flores Herrerías. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Jesús Santa Olalla Tapia



Cuernavaca, Mor., 31 de octubre de 2018.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Jefa de Posgrado
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Detección de múltiples marcadores moleculares para el diagnóstico de la preeclampsia**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alyn Flores Herrerías. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



Dr. David Martínez Dulcero Ramírez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 31 de octubre de 2018.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Detección de múltiples marcadores moleculares para el diagnóstico de la preeclampsia**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alyn Flores Herrerías. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. María Angélica Santana Calderón