

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Bioanálisis Clínico; Molecular, Hematología y Medicina Transfusional*

**“ANÁLISIS DE LOS NIVELES SÉRICOS DE MICRORNAS 29a y 33a EN
MUJERES EMBARAZADAS CON OBESIDAD Y SU RELACION CON
PARAMETROS ANTROPOMETRICOS DEL RECIEN NACIDO”**

Alumno: Luis Ignacio Becerra Chávez

Tutores: Prof. Bárbara Echiburú L. – Prof. Manuel Maliqueo Y.

Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo

Departamento de Medicina Interna

Facultad de Medicina Occidente

Universidad de Chile

16 de octubre 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Bioanálisis Clínico; Molecular, Hematología y Medicina Transfusional*

**“ANÁLISIS DE LOS NIVELES SÉRICOS DE MICRORNAS 29a y 33a EN
MUJERES EMBARAZADAS CON OBESIDAD Y SU RELACION CON
PARAMETROS ANTROPOMETRICOS DEL RECIEN NACIDO”**

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del alumno Luis Ignacio Becerra Chávez.

Alumno: Luis Ignacio Becerra Chávez

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la de la profesora Bárbara Echiburú.

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del profesor Manuel Maliqueo.

Tutores: Prof. Bárbara Echiburú L. – Prof. Manuel Maliqueo Y.

16 de octubre 2023

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El Sr. **Luis Becerra Chávez**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Análisis de los niveles séricos de microRNAs 29a y 33a en mujeres embarazadas con obesidad y su relación con parámetros antropométricos del recién nacido”**, dirigida por el **Prof. Manuel Maliqueo** y la **Profa. Barbara Echiburú**, ambos académicos del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo del Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por el: **Prof. Nelson Varela** académico del Departamento de Oncología Básico Clínico Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el **Prof. Germán Ebensperger**, académico del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Nelson Varela	6.40	25%
Corrector 2 Germán Ebensperger	6.78	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.80	

En consecuencia, el estudiante **Luis Becerra Chávez** aprueba satisfactoriamente el curso.



Profra. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación

Prof. Hernán Torres
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria

A mi madre, hermanos y familia, por ser mi sostén y brindarme su amor incondicional. A mi pareja, por su constante apoyo. Esta tesis está dedicada a ustedes, quienes fueron mi inspiración y fortaleza en cada paso de este camino académico.

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Prof. Manuel Maliqueo y a la Prof. Bárbara Echiburú por su invaluable orientación y apoyo a lo largo de este proceso. Su dedicación, conocimientos y guía fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación, y su apoyo incondicional ante los desafíos fue esencial para alcanzar este logro.

Agradezco profundamente al equipo del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo de la Facultad de Medicina Occidente de la Universidad de Chile. En especial, agradezco a Cristián Flores por su generosidad, apoyo y valiosas enseñanzas en el laboratorio. Su colaboración fue vital en cada etapa de esta investigación.

Finalmente, gracias al apoyo incondicional de mi familia, pareja y amigos. Su constante ánimo, amor y comprensión fueron el sostén emocional que necesitaba durante este arduo pero gratificante camino hacia la culminación de esta tesis.

A todos y cada uno de ustedes, mi más profundo agradecimiento por haber sido parte fundamental en este importante logro académico y personal.

Esta tesis profesional fue financiada por el proyecto FONDECYT regular N° 1201483.

Índice

1.	Lista de Abreviaturas	5
2.	Resumen	6
3.	Introducción	6
4.	Hipótesis	16
5.	Objetivo General	16
7.	Materiales y Métodos	17
	Participantes	17
	Protocolo del estudio	18
	Muestreo de sangre	18
	Determinaciones séricas	19
	Aislamiento de RNA total	19
	Síntesis de cDNA	20
	Amplificación por PCR en tiempo real	21
	Análisis estadístico	22
8.	Resultados	23
8.1	Características de las muestras utilizadas:	23
8.2	Características Antropométricas de Recién Nacido:	24
8.3	Determinaciones séricas:	25
8.4	qPCR:	30
8.5	Correlaciones entre variables:	30
9.	Discusión	35
10.	Conclusión	40
11.	Bibliografía	41
12.	Anexos	46

1. Lista de Abreviaturas

- miRNA: microRNA
- EHGNA: Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico
- ALT/GPT: Alanina Aminotransferasa
- GGT: Gamma-glutamil transferasa
- AST/GOT: Aspartato Aminotransferasa
- RT-qPCR: Transcripción Reversa-cuantitativa de la Reacción de Polimerasa en cadena
- TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa

2. Resumen

Durante la última década, se ha observado que la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) en el embarazo se ha triplicado, constituyendo un problema de salud pública, ya que aumenta el riesgo de desarrollar complicaciones maternas y fetales. Se ha sugerido que una de las posibles causas del aumento de la prevalencia de EHGNA se debe al incremento de la obesidad en la población. Por ello, es importante encontrar biomarcadores específicos de esta patología, dentro de los que han surgido los miRNAs. Por lo tanto, este estudio se enfocó en analizar los niveles séricos de los miRNAs 29a y 33a en mujeres embarazadas con obesidad durante el tercer trimestre de gestación, en comparación con un grupo control de mujeres de peso normal. Se incluyeron sueros de 32 de mujeres de peso normal y 38 de mujeres con obesidad. Se midió la concentración de glucosa, lípidos y transaminasas hepáticas (AST, ALT y GGT). Los niveles séricos de los miRNAs 29a y 33a se evaluaron mediante PCR en tiempo real. Se observó un aumento de las enzimas hepáticas AST/GOT y ALT/GPT en mujeres embarazadas con obesidad en comparación con el grupo control ($P = 0,004$ y $P = 0,020$, respectivamente). Los niveles séricos de los miRNA-29a y 33a fueron comparables entre los grupos. Aunque, en el grupo con obesidad, miRNA-29a se correlacionó positivamente con los niveles de GGT ($r = 0,445$; $P = 0,006$), mientras que, el miRNA33a con ALT/GPT ($r = 0,363$; $P = 0,038$) y con la ganancia de peso ($r = 0,363$; $P = 0,038$). En síntesis, este estudio indica que los miRNAs 29a y 33a se asocian con marcadores de la función hepática en mujeres embarazadas con obesidad. Más investigaciones son necesarias para comprender sus implicaciones en la salud materno-infantil que permitan prevenir alteraciones hepáticas en mujeres embarazadas con obesidad.

PALABRAS CLAVES: obesidad gestacional, microRNAs, enfermedad de hígado graso no alcohólico, microRNA-29a, microRNA-33a

3. Introducción

El embarazo es un estado donde se producen una serie de cambios fisiológicos y hormonales en la madre para permitir el crecimiento y desarrollo del feto. Estos cambios incluyen la formación de la placenta, el aumento del volumen sanguíneo, la expansión del útero y los cambios en los órganos reproductivos. Sin embargo, es importante destacar que sustancias nocivas como el alcohol, el tabaco, ciertos medicamentos e incluso la obesidad, pueden alterar tanto el estado de la madre como el desarrollo del feto, lo que subraya la importancia de llevar un estilo de vida saludable y buscar atención prenatal para garantizar un embarazo adecuado.

Obesidad: Definición e Impacto Poblacional

La obesidad es un estado nutricional caracterizado por una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (1). Esta ha adquirido gran relevancia en el último tiempo, tanto a nivel nacional como a nivel mundial. En nuestro país se ha observado, a través de la última Encuesta Nacional de Salud realizada en 2016-2017, que un 34,8% de la población chilena tiene obesidad y, además, un 64,2% de las gestantes que se atienden en el servicio de atención pública presentan sobrepeso u obesidad transformándose esta situación en una de las principales preocupaciones de salud pública (2). En ese sentido, la obesidad sostenida puede provocar complicaciones tales como enfermedades cardiovasculares, hipertensión (1), diabetes mellitus o enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA).

Se estima que alrededor del 90% de los sujetos en estado de obesidad presenta la condición clínica de EHGNA (3). Ésta se define como una enfermedad en la que existe una acumulación mayor al 5% de grasa en el tejido hepático y en donde existe cierta relación con la presencia de trastornos metabólicos entre los que destacan: la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. La manifestación de EHGNA de forma sostenida supone un riesgo de complicaciones

mayores como la cirrosis hepática llegando a cuadros graves como el carcinoma hepático (4).

La progresión de esta enfermedad se visualiza en la figura 1.



Figura 1. Extraída de Cobbina E. y Akhlaghi F. *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters* (2017).

La figura 1 muestra las etapas progresivas de la EHGNA desde la forma benigna progresando a Esteatohepatitis No Alcohólica que puede presentarse con o sin fibrosis. Posteriormente la Esteatohepatitis No Alcohólica podría progresar a cirrosis y eventualmente al carcinoma hepatocelular. NAFL: Hígado Graso Inicial; NASH: Esteatohepatitis No Alcohólica; NAFLD: Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico.

A pesar de que no se conocen con precisión los mecanismos fisiopatológicos exactos de la EHGNA, los antecedentes sugieren que la presencia de esta enfermedad se relaciona con condiciones que tienen como punto en común la sobrecarga lipídica en el hígado. Una de las causas más comunes de acumulación excesiva de lípidos se debe a una ingesta elevada de triglicéridos, y que tiene como consecuencia un influjo excesivo de ácidos grasos en el hígado los cuales no pueden ser eliminados de forma eficiente (5). Otro factor que podría relacionarse con un mayor transporte y acumulación de lípidos en el hígado es la resistencia a la insulina, ya que esta condición clínica provoca un aumento en la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo. Esta asociación entre la resistencia a la insulina y el incremento en la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo sugiere un vínculo fundamental entre la función metabólica y el desarrollo de enfermedades hepáticas.

Una de las consecuencias que se generan a raíz de la acumulación excesiva de lípidos en el hígado es el estrés oxidativo, ya que bajo esta condición se produce un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del cuerpo para neutralizarlos con antioxidantes. Por otro lado, la acumulación de lípidos hepáticos puede desencadenar una respuesta inflamatoria local, en la cual se reclutan células como macrófagos o linfocitos T que pueden causar daño a las células hepáticas.

En síntesis, tanto el estrés oxidativo como la inflamación constituyen mecanismos de daño de los hepatocitos, llevando a un incremento en la liberación de enzimas hepáticas lo que finalmente provoca un aumento de ellas en la circulación sanguínea (6). Además del daño celular inducido a través de estos mecanismos, puede ocurrir daño indirecto por efectos citotóxicos de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos (7).

A nivel clínico se ha observado que sujetos en estado de obesidad tienen una serie de parámetros bioquímicos sanguíneos alterados. Entre ellos, destacan las transaminasas (ALT, AST, GGT), la fosfatasa alcalina y en ocasiones se pueden ver alterados otros marcadores de función hepática como la bilirrubina, albúmina, o tiempo de protrombina debido al rol del hígado en la síntesis de factores de coagulación (8).

Obesidad en el embarazo: Un factor de riesgo a considerar

Debido al notable aumento en la prevalencia de la obesidad, ha quedado en evidencia el impacto de esta condición durante la gestación tanto en la madre como en su descendencia. De esta manera, se ha descrito que una mujer embarazada en estado de obesidad previo a la gestación tiene propensión a desarrollar morbilidades materno-perinatales como diabetes gestacional, síndrome hipertensivo del embarazo, preeclampsia, infecciones puerperales y recién nacidos prematuros o con malformaciones congénitas (9).

Durante la gestación, producto de los cambios hormonales propios del embarazo, se producen una serie de adaptaciones en el metabolismo hepático materno, caracterizado por un aumento de la gluconeogénesis, de la síntesis de colesterol y de lípidos (10). Además, en el hígado materno, ocurre un aumento de la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en triglicéridos, las cuales son captadas por la placenta para asegurar la transferencia materno-fetal de ácidos grasos (10). Todos estos cambios son necesarios para cumplir con los requerimientos del feto en crecimiento. Sin embargo, implican un importante estrés metabólico para el hígado de la mujer gestante que, en condiciones de riesgo preexistente, como la obesidad, podrían conducir a alteraciones en la transferencia materno-fetal de nutrientes afectando el normal crecimiento fetal principalmente contribuyendo al desarrollo de macrosomía fetal lo que podría vincularse con un aumento del peso, talla o circunferencia craneal del recién nacido (11). De forma interesante, se ha sugerido que el impacto de la obesidad y alteraciones metabólicas maternas es diferente dependiendo del sexo del recién nacido (12).

Se ha observado que durante el tercer trimestre del embarazo ocurre una inhibición fisiológica de la beta oxidación de ácidos grasos lo que, asociado con la mayor síntesis de lípidos, podría generar un ambiente propicio para una mayor acumulación de grasa intrahepática en el hígado materno (13) por lo que, en mujeres con obesidad se ha observado un aumento de ácidos grasos, triglicéridos y VLDL en comparación con mujeres normopeso, lo que sugiere un riesgo de desarrollar esteatosis hepática en estas mujeres.

En esa misma línea, se ha evidenciado que en los últimos 30 años se ha triplicado la prevalencia de EHGNA en el embarazo y algunas investigaciones han demostrado que esta condición se relaciona de forma independiente con complicaciones hipertensivas, hemorragia post-parto o parto prematuro (7). Así entonces, el impacto de esta patología durante el embarazo incentiva el estudio en esa población y a su vez la búsqueda de marcadores precisos que se relacionen con enfermedades hepáticas, sobre todo porque actualmente los

mecanismos fisiopatológicos que relacionan la EHGNA con alteraciones materno-fetales no son conocidos.

En la figura 2 se muestra la variación que hubo entre 2007 y 2016 en la prevalencia de EHGNA en mujeres embarazadas de Estados Unidos y su relación con la tasa de obesidad durante esos mismos años. Se observa que hubo un aumento del 3,5% en la prevalencia de EHGNA en tan solo 8 años, concomitante con un aumento de la tasa de obesidad en el mismo tiempo transcurrido.

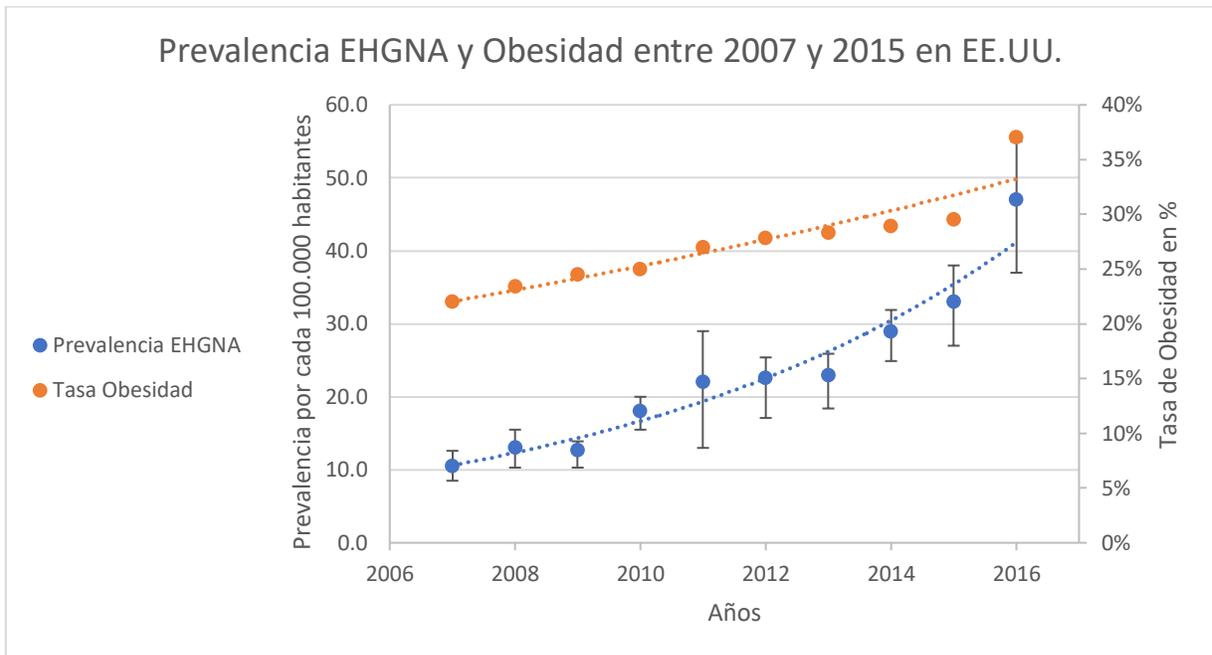


Figura 2. Modificado de Sarkar M. y cols. *Non-alcoholic fatty liver disease in pregnancy is associated with adverse maternal and perinatal outcomes* (2017).

La figura 2 muestra la prevalencia de mujeres embarazadas con EHGNA (por cada 100.000 habitantes) durante los años 2007 y 2016 en la red de hospitales públicos de Estados Unidos. Asimismo, se visualiza la tasa (en porcentaje) de obesidad en la población estadounidense entre los mismos años.

Actualmente en nuestro país, no existen estudios ni cifras oficiales que aborden esta situación y, por lo tanto, su investigación es algo innovador, desde la perspectiva de salud pública y el impacto que genera una alta tasa de obesidad en mujeres embarazadas.

En resumen, el riesgo de presentar esteatosis hepática materna está relacionado con una alteración de la fisiología del organismo y una serie de mecanismos fisiopatológicos conducirían a un aumento de complicaciones materno-fetales (9).

Búsqueda de marcadores predictores de función hepática: Surgimiento de microRNAs

Actualmente uno de los mayores desafíos está en encontrar marcadores específicos que permitan predecir o diagnosticar oportunamente la presencia de distintas enfermedades, entre ellas, se buscan biomarcadores de función hepática en pacientes en estado de obesidad que suponen un mayor riesgo a presentar EHGNA, dado que existe un aumento progresivo de la tasa de obesidad a nivel global y las consecuencias que conlleva esta enfermedad son de relevancia clínica, ya que incluso se ha descrito la progresión de EHGNA puede desencadenar en hepatocarcinoma. En ese sentido, se buscan marcadores que sean más sensibles y específicos a la patología en particular que se está analizando y que sea a través de un procedimiento menos invasivo para el sujeto de estudio.

El último tiempo ha cobrado gran relevancia la participación de los microRNAs como reguladores de la expresión génica en distintos tipos celulares y procesos fisiológicos. Los microRNAs son pequeños segmentos de RNA no codificantes de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos (14), relacionados fundamentalmente con la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (15). Se ha evidenciado que la expresión de miRNA desempeña un papel crucial en las alteraciones metabólicas tales como dislipidemias y alteraciones del metabolismo hepático. Los antecedentes sugieren que los miRNAs participan en la señalización inflamatoria relacionada con alteraciones hepáticas y en su progresión a cuadros más graves (16), ya que varios estudios han revelado que los miRNAs tienen un rol fundamental en el control de la homeostasis metabólica.

Una revisión sistemática publicada en 2016 ordenó los diferentes microRNAs según su rol en los diferentes tipos de metabolismos. En ese sentido, se estableció que modificaciones en los niveles séricos de miRNAs circulantes, incluidos miRNA-29a, miRNA-33a, miRNA-21, miRNA-192, miRNA-221/222, miRNA-375, y miRNA-802 (14)(17), estarían relacionadas de forma directa en el contexto de enfermedades hepáticas, entre ellas la EHGNA, indicando que los cambios en niveles séricos de estos miRNAs pueden ser efectivos biomarcadores de la predicción y de la progresión de la patología. Otra investigación, demostró la importancia de una desregulación de miRNA-148a en el desarrollo de hipercolesterolemia en ratas (18).

Uno de los miRNAs que ha sido bastante estudiado es el miRNA-122, que está presente en el hígado y se ha demostrado que está involucrado en la síntesis de colesterol hepático y en el metabolismo lipídico, presentando altos niveles circulantes en el contexto de la EHGNA. Una investigación con modelos animales estudió la importancia biológica de silenciar ciertos miRNAs, entre ellos el miRNA122, para analizar el rol de este y visualizar cómo se afectaba el metabolismo. De esta manera, demostró que una disminución en su expresión resulta en una reducción significativa de los niveles de colesterol plasmático (19) y, por el contrario, este miRNA presenta mayor nivel de circulación en el contexto de la obesidad y de la EHGNA, lo que se asocia a un marcador eficaz de función hepática.

Otro miRNA que se encuentra estrechamente relacionado con el diagnóstico de ciertas patologías asociadas a disfunción hepática es el miRNA-29a, siendo identificado también como un buen biomarcador en pacientes con EHGNA y reflejo de la progresión de esta patología (18). De manera interesante, en una de las investigaciones que se analizaron en la revisión sistemática mencionada previamente se destaca el efecto protector del miRNA-29a sobre el daño hepático y su acción versátil sobre la regulación epigenética, la homeostasis mitocondrial y la inmunomodulación cuya función puede mejorar la percepción de la patogénesis de la EHGNA. Por esta razón, se esperaría encontrar que en el contexto de la patología este miRNA esté disminuido.

Por otro lado, un estudio realizado en humanos a través de muestras de biopsias hepáticas medidas por la técnica de qPCR donde se realizó un análisis de regresión para determinar la asociación de los niveles séricos de miRNA-33a con esteatosis hepática e inflamación (20), estableció que éste tiene una función crítica en la regulación y homeostasis lipídica en el hígado, ya que cuando está sobreexpresado a nivel hepático hay una progresión rápida de alteraciones hepáticas, por lo tanto, es probable que la expresión sérica de este miRNA esté aumentada tanto en sujetos con obesidad como en el contexto de EHGNA.

Los miRNAs 29a y 33a son elementos cruciales en la regulación del metabolismo hepático. Se ha demostrado que el miRNA29a participa en la modulación de genes implicados en la fibrosis hepática, regulando la expresión de colágeno y contribuyendo así a la salud hepática. En estudios previos en modelo murinos, se ha demostrado que la sobreexpresión de miRNA29a en ratones colestásicos inhibía significativamente el daño hepatocelular y la fibrosis hepática disminuyendo, además, los niveles de proteínas proapoptóticas (21). Por otro lado, el miRNA33a desempeña un papel central en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico en el hígado, influyendo en la síntesis de lípidos, la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa. Estudios previos han demostrado efectos del miR-33a sobre la β -oxidación de ácidos grasos y cómo su inhibición permite un mejor control de los niveles de colesterol (22). Se presume que la variación a nivel sérico de los miRNAs podría estar relacionada con parámetros bioquímicos de función hepática, tales como transaminasas (Alanina Aminotransferasa, Aspartato Aminotransferasa y Gamma-glutamilttransferasa), glicemia o marcadores proinflamatorios (20).

Como ha quedado demostrado, existen numerosos antecedentes que sustentan una estrecha relación entre la obesidad y el desarrollo de daño hepático, particularmente EHGNA. Aunque esta condición tiene una serie de consecuencias deletéreas para la madre y el feto, no es diagnosticada habitualmente durante la gestación, debido a la dificultad de confirmar el hallazgo. De esta manera, los miRNAs han emergido como una forma innovadora de

establecer pronósticos de algunas patologías o de funciones fisiológicas del organismo, cumpliendo un rol de biomarcador que puede ser detectado en circulación, dando cuenta del sitio donde se generan las afecciones, siendo una medición sensible y específica para ciertas patologías, en este caso, de carácter hepático.

4. Hipótesis

- Durante el embarazo las adaptaciones hepáticas maternas son fundamentales para un adecuado suministro de nutrientes para el crecimiento fetal. Por otro lado, la obesidad gestacional podría conducir a alteraciones en la función hepática. Se ha descrito que los niveles séricos de microRNAs son potenciales biomarcadores de la función hepática, siendo el microRNA-29a un factor protector frente a estrés oxidativo en el hígado, mientras que el microRNA-33a un promotor del metabolismo y acumulación de lípidos intrahepáticos. En la presente tesis se postula que los niveles séricos del microRNA-29a se encuentran disminuidos, mientras que los del microRNA-33a se encuentran elevados en mujeres con obesidad gestacional en comparación con mujeres controles normopeso. Además, los niveles séricos de estos microRNAs estarán correlacionados con parámetros bioquímicos maternos y antropométricos del recién nacido.

5. Objetivo General

- Analizar los niveles séricos de los microRNAs 29a y 33a durante el tercer trimestre de gestación en mujeres embarazadas con obesidad y controles normopeso y relacionarlos con parámetros maternos y fetales.

6. Objetivos Específicos

- Estudiar los niveles séricos de los microRNAs 29a y 33a en sueros de mujeres con obesidad gestacional y controles normopeso durante el tercer trimestre de gestación.
- Correlacionar los niveles séricos de los microRNAs 29a y 33a con parámetros bioquímicos séricos maternos tales como: marcadores de función hepática, lipídica y glucídica.

- Asociar los niveles séricos de los microRNAs 29a y 33a con parámetros antropométricos del recién nacido tales como: peso, talla, circunferencia craneal y sexo biológico.

7. Materiales y Métodos

Participantes: Se estudiaron treinta y dos muestras de mujeres con peso normal (IMC 20-25 kg/m²) y treinta y ocho muestras de mujeres obesas (IMC: 30-36 kg/m²) de 18 a 36 años que realizaron sus controles ginecológicos en el Hospital San Juan de Dios. Estas mujeres fueron reclutadas en dos estudios previos titulados: *“Effects of maternal obesity on steroid levels during pregnancy. A relationship between adipose tissue and inflammatory factors on placental steroidogenesis.”* FONDECYT 11130250 y *“Maternal obesity influences placental fatty acid transport. Are there an impact on fatty acid metabolism in the fetal liver?”* FONDECYT 1181798. Las mujeres ingresaron al estudio a las 6 - 8 semanas de embarazo y fueron seguidas hasta el parto. Sólo se incluyeron mujeres con embarazos únicos, de término y sin patologías asociadas, por lo que mujeres con hipertensión, preeclampsia, trastornos tiroideos, parto prematuro o con fetos con malformaciones, aberraciones cromosómicas y aquellas con antecedentes pregestacionales de diabetes, síndrome de ovario poliquístico, infertilidad y fertilización asistida fueron excluidas de este estudio.

Aprobaciones Éticas: El estudio se realizó de acuerdo con los estándares de la Declaración de Helsinki y cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Universidad de Chile (CEISH), Facultad de Medicina (Acta de Aprobación N°044 del Proyecto N° 058-2023). Es importante declarar que a todas las participantes se les solicitó firmar un consentimiento informado al aceptar ingresar en los estudios iniciales (FONDECYT 11130250 y 11817989). Considerando que los nuevos análisis coinciden con los objetivos de los proyectos en donde se consintió el uso de muestras por parte de las participantes y que,

además, las muestras e información es mantenida bajo estricta confidencialidad, el CEISH ha autorizado la dispensa del consentimiento informado para esta investigación en particular. Este documento de aprobación se encuentra disponible en documento anexo para su visualización.

Protocolo del estudio: Para el momento del reclutamiento (6 a 8 semanas de gestación), todas las mujeres fueron sometidas a un examen clínico, anamnesis y mediciones antropométricas. Se calculó el IMC, parámetro que permitió asignar a las voluntarias a los grupos de control u obesas. A las 8 a 12 semanas de gestación (primer trimestre) y a las 28 a 34 semanas de gestación (tercer trimestre), se registraron las variables maternas en las que se incluyen: la altura, el peso, el IMC y la presión arterial. Durante el tercer trimestre, se evaluó además, el estado nutricional materno utilizando curvas de Atalah, de acuerdo con el patrón de referencia adoptado por el Ministerio de Salud (23).

Muestreo de sangre: Se obtuvo una muestra de sangre en ayunas durante el tercer trimestre de gestación, la cual centrifugó y se almacenó el suero a -80°C para medir glucosa y parámetros lipídicos. Una alícuota del suero se procesó para la determinación de enzimas hepáticas y extracción de los miRNAs.

Después del parto, se registraron los datos clínicos de la madre, incluida la paridad y el tipo de parto (vaginal o cesárea), y del recién nacido, incluido el sexo, el peso, talla al nacer y la circunferencia del cráneo. Los recién nacidos se clasificaron como pequeños para la edad gestacional (PEG) (peso al nacer, <percentil 10), adecuados para la edad gestacional (AEG) o grandes para la edad gestacional (GEG) (peso al nacer, > percentil 90) de acuerdo con curvas de crecimiento fetal establecidas por la Organización Mundial de la Salud (24)(25).

La figura 2 del anexo resume lo realizado como metodología para esta investigación.

Métodos analíticos:**Determinaciones séricas:**

Se midieron los perfiles de glucosa y lípidos (colesterol total, triglicéridos y HDL), mediante un kit Spotchem II Kenshin-2 (77188,199, Arkray, Kyoto, Japón) en un analizador SpotChem (Arkray), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, con los parámetros lipídicos obtenidos se realizó el cálculo de los niveles de VLDL y LDL en las muestras de las participantes, a través de las fórmulas de Friedewald. Adicionalmente, se incluyó una caracterización del perfil hepático dentro del estudio bioquímico que incluye la medición de enzimas claves en el metabolismo hepático, entre los parámetros que se miden se encuentran las transaminasas (Alanina Aminotransferasa, Aspartato Aminotransferasa y Gamma-glutamilttransferasa). Estas determinaciones fueron realizadas mediante técnicas colorimétricas mediante el uso de reactivos específicos (Códigos de Referencia: 23520, 12531 y 12533) en un equipo Photometer 5010 V5+ de la marca Riele (Berlín, Alemania). Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron menores de un 5%.

Aislamiento de RNA total:

Todos los procedimientos se realizaron utilizando material esterilizado y libre de nucleasas. La extracción de los RNA se realizó a partir de muestras de 100 uL de suero, estableciendo un protocolo de acuerdo con la estandarización previa de la técnica, donde se evaluaron cuatro protocolos como pruebas para la extracción. El detalle de estas pruebas y los resultados obtenidos se pueden visualizar en la tabla 1 y 2, respectivamente (anexos). El resumen del protocolo seleccionado se muestra a continuación:

Cada una de las muestras fueron tratadas con Proteinasa K a una concentración de 1,8 ug, a una temperatura de 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionó 1 mL de TRIzol y 2 ug de glicógeno, se agitó e incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Seguidamente, se incorporaron 220 uL de cloroformo a la mezcla y se agitó vigorosamente durante 15 segundos,

seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo tubo, y se agregó isopropanol en una proporción 1:1. Finalmente, esta nueva solución se dejó a -20°C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 G durante 10 minutos a 4°C. Al pellet se le añadió 1 mL de etanol al 75%, se agitó utilizando una pipeta y se centrifugó a 7.500 G durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante dejando un volumen residual estándar en el fondo del tubo. El exceso de etanol se evaporó durante 12 minutos a temperatura ambiente bajo campana. Al pellet, se le añadió 35 uL de agua libre de nucleasas para rehidratar el pellet y se incubó a 60°C durante 10 minutos. La concentración y pureza de las muestras de RNA se evaluaron por metodología de espectrofotometría en equipo NanoQuant de la marca Tecan (Untersbergstr, Austria).

Síntesis de cDNA:

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 microgramo de RNA, utilizando el kit miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis de Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos), de acuerdo con las indicaciones del ensayo. El primer paso consistió en la poliadenilación de los miRNAs y el segundo paso en la síntesis de la hebra de cDNA, de acuerdo con siguiente protocolo de reacción:

Tabla N°1: Protocolo de reacción para la poliadenilación del RNA extraído.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	30 minutos	37°C
2	5 minutos	95°C

Luego se sintetizó el cDNA mediante una transcripción reversa, a partir de 4,0 uL del producto obtenido en el paso anterior (miRNA poliadenilado, concentración 1 ug/mL) con los siguientes tiempos y temperaturas de incubación:

Tabla N°2: Protocolo de reacción para la síntesis de cDNA.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 minutos	55°C
2	15 minutos	25°C
3	30 minutos	42°C
4	5 minutos	95°C

Al finalizar este proceso se obtuvo un cDNA listo para ser procesado en una RT-qPCR, el cual se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Amplificación por PCR en tiempo real:

El cDNA sintetizado de acuerdo con el protocolo anterior, se cuantificó mediante PCR en tiempo real en un termociclador Agilent AriaMx utilizando SYBR Green a partir de 5 ng de cDNA en reacciones con los partidores específicos de *MystiCq microRNA qPCR Assay Primer* que se visualizan a continuación en conjunto con el protocolo de ejecución del qPCR según las sugerencias del fabricante:

Tabla N°3: Tabla resumen de los primers utilizados y el protocolo para qPCR

Nombre Primer	Proveedor	Código	Protocolo
hsa-miR-29a-3p	Sigma Aldrich	MIMAT0000086	Pre-incubación (1 Ciclo): - 2 minutos a 95°C Amplificación (48 Ciclos): - 5 segundos a 95°C (Denaturación) - 30 segundos a 60°C (Annealing)
hsa-miR-33a-3p	Sigma Aldrich	MIMAT0004506	
RNU6-1	Sigma Aldrich	MIRCP00001	

Además de lo anterior, se utilizó un *Universal Primer* provisto en el mismo kit *miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* de Agilent Technologies.

A nivel de la RT-qPCR, el control de calidad se realizó a través de duplicados de cada una de las muestras y un blanco sin RNA para evaluar interferentes o contaminación de reactivos.

La cuantificación de los miRNAs 29a y 33a se realizó junto con el gen constitutivo *RNU6-1* y se calculó los niveles séricos de estos miRNAs respecto del gen constitutivo *RNU6-1* de cada muestra, a través de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (26).

Análisis estadístico:

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el software G-Power. Se consideró una varianza de 30% dentro de cada grupo y una diferencia de un 20% entre el grupo normopeso u obeso. Por lo tanto, para obtener un riesgo de 0.05 (error tipo I) con un poder de 0.8 (error tipo II) se necesitó incluir alrededor de 30 sujetos en cada grupo experimental.

La distribución normal en cada una de las variables fue evaluada mediante prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias en las variables continuas se calcularon mediante la prueba T-test o Mann-Whitney dependiendo de la distribución de los datos. Las variables categóricas se

analizaron mediante la prueba de la χ^2 . Las correlaciones entre las variables clínicas, antropométricas (tanto de la madre como del recién nacido) y metabólicas con los niveles séricos de miRNAs 29a y 33a circulantes se calculó mediante la prueba Pearson o Spearman. Para los análisis de correlación los niveles de miRNA fueron Log2-transformed (27). Los valores se expresaron como mediana (rangos intercuartílicos p25-p75) en tablas y gráficos. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS (versión 21.0; SPSS, Chicago, IL) y Prism GraphPad (versión 10.0.2, GraphPad Software, La Jolla, CA). Se consideró estadísticamente como criterio de significación un $p < 0,05$.

8. Resultados

8.1 Características maternas:

Los antecedentes clínicos de la población estudiada durante el primer trimestre de gestación se muestran en la Tabla N°4. Los grupos fueron comparables en edad al momento del reclutamiento. Además, es importante considerar que la diferencia de peso e índice de masa corporal entre ambos grupos es estadísticamente significativa, ya que constituye el parámetro de clasificación por el diseño de este estudio.

Tabla N°4: Datos de las participantes al ingreso del estudio (1° Trimestre)

Parámetros	Controles (n = 32)	Obesas (n = 38)	P - values
Edad (Años)	25 ± 4,6	25,2 ± 4,5	0,8324
Peso (Kg)	56,8 ± 6,6	84,7 ± 8,5	< 0,0001
Talla (m)	1,57 ± 0,1	1,58 ± 0,1	0,4531
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	22,7 ± 1,4	33,7 ± 2,5	0,0010
Edad Gestacional al reclutamiento	10,8 ± 4,0	9,5 ± 3,4	0,3103

Los valores se expresan en promedio ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test o Mann Whitney.

La Tabla N°5 muestra los datos clínicos durante el tercer trimestre de gestación. Se observa que se mantuvo la diferencia de peso e índice de masa corporal entre los grupos. La edad gestacional al momento de la 2° toma de muestra, fueron comparables entre sí. La ganancia de peso entre la primera y segunda toma de muestra (1° trimestre y 3° trimestre), fue mayor en el grupo control en comparación a las obesas.

Tabla N°5: Datos de las participantes al 3° Trimestre de gestación

Parámetros	Controles (n = 32)	Obesas (n = 38)	P - values
Peso (Kg)	62,5 ± 13,7	90,6 ± 8,9	0,0001
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	24,6 ± 6,7	36,1 ± 2,6	<0,0001
Edad Gestacional de la 2° toma de muestra	31,7 ± 2,5	32,6 ± 2,5	0,1501
Ganancia de Peso	8,0 ± 3,9	5,93 ± 4,4	0,0454

Los valores se expresan en promedio ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test.

8.2 Características Antropométricas de Recién Nacido:

Los antecedentes antropométricos de los recién nacidos, obtenidos al momento del parto, se visualizan en la Tabla N°6, donde se muestra que existe una mayor proporción de recién nacidos de sexo masculino en el grupo control comparado al grupo con obesidad, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. No observamos diferencias en los parámetros antropométricos y edad gestacional de los recién nacidos entre los grupos. Sin embargo, hubo una mayor prevalencia de niños nacidos grandes para la edad gestacional en el grupo de mujeres gestantes con obesidad, la que no alcanzó significancia estadística.

Tabla N°6: Datos antropométricos y sexo de Recién Nacidos

Parámetros	Hijos/as de Controles (n = 32)	Hijos/as de Obesas (n = 38)	P - values
Sexo (M / F (%))	66,67 / 33,33	39,47 / 60,53	0,258
Peso (Kg)	3,38 ± 0,4	3,58 ± 0,5	0,375
Talla (cm)	49,56 ± 1,7	50,14 ± 2,7	0,271
Relación Peso/Talla	0,069 ± 0,01	0,071 ± 0,01	0,140
Circunferencia Craneal	34,35 ± 1,5	34,74 ± 1,6	0,398
Edad Gestacional de nacimiento	38,8 ± 1,1	39,0 ± 1,3	0,963
Clasificación (GEG/PEG (%))	0 / 3,1	25 / 6,25	0,580

Los valores se expresan en promedio ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test.

8.3 Determinaciones séricas:

Los niveles de glicemia en ayunas fueron comparables entre los grupos (63,5 ± 11,4 vs 66,7 ± 10,9; $P = 0,321$).

Al analizar los resultados de las mediciones de las enzimas hepáticas (figura 3), se observa que los niveles séricos del aspartato aminotransferasa (AST) fueron significativamente mayores en las mujeres embarazadas con obesidad que en el grupo de mujeres controles (33,32 UI/L vs 28,43 UI/L, $P = 0,004$). De manera similar, los niveles de la alanina aminotransferasa (ALT) también fueron considerablemente más altos en el grupo de obesas en comparación con el grupo control (31,21 UI/L vs 25,38 UI/L, $P = 0,020$). Sin embargo, en el caso de la gamma-glutamilttransferasa (GGT) no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (19,03 UI/L vs 17,63 UI/L, $P = 0,347$). Estos resultados se visualizan en el siguiente gráfico (figura 3).

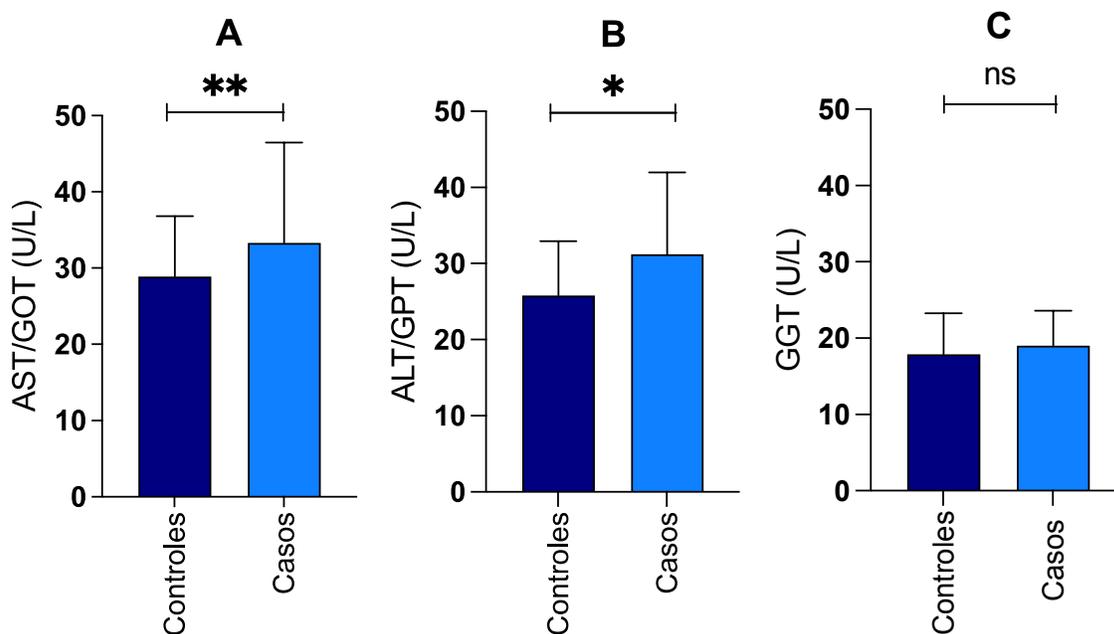


Figura 3. Niveles de Transaminasas en suero en mujeres embarazadas controles y con obesas, durante 3er trimestre de gestación. A. Concentración sérica de aspartato aminotransferasa (AST/GOT). B. Concentración sérica de alanina aminotransferasa (ALT/GPT) C. Concentración sérica de gamma-glutamil transferasa (GGT). Los valores se expresan en promedio \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$ y ns no significativo.

Se realizó una subdivisión de los grupos de estudio por sexo de los recién nacidos, lo que permitió un análisis más detallado de los niveles de transaminasas en cada grupo. En términos generales, tanto en el grupo de recién nacidos de sexo masculino como en el de sexo femenino, se observó un aumento en los niveles de ALT en el grupo de mujeres con obesidad en comparación al grupo control, sin embargo, esta diferencia sólo fue significativa para el grupo de recién nacidos de sexo masculino (24,24 UI/L vs 31,73 UI/L, $P = 0,031$). En el caso de las concentraciones de AST y GGT no mostraron diferencias entre los grupos, de acuerdo con el sexo del recién nacido. Estos resultados, se observan en los siguientes gráficos.

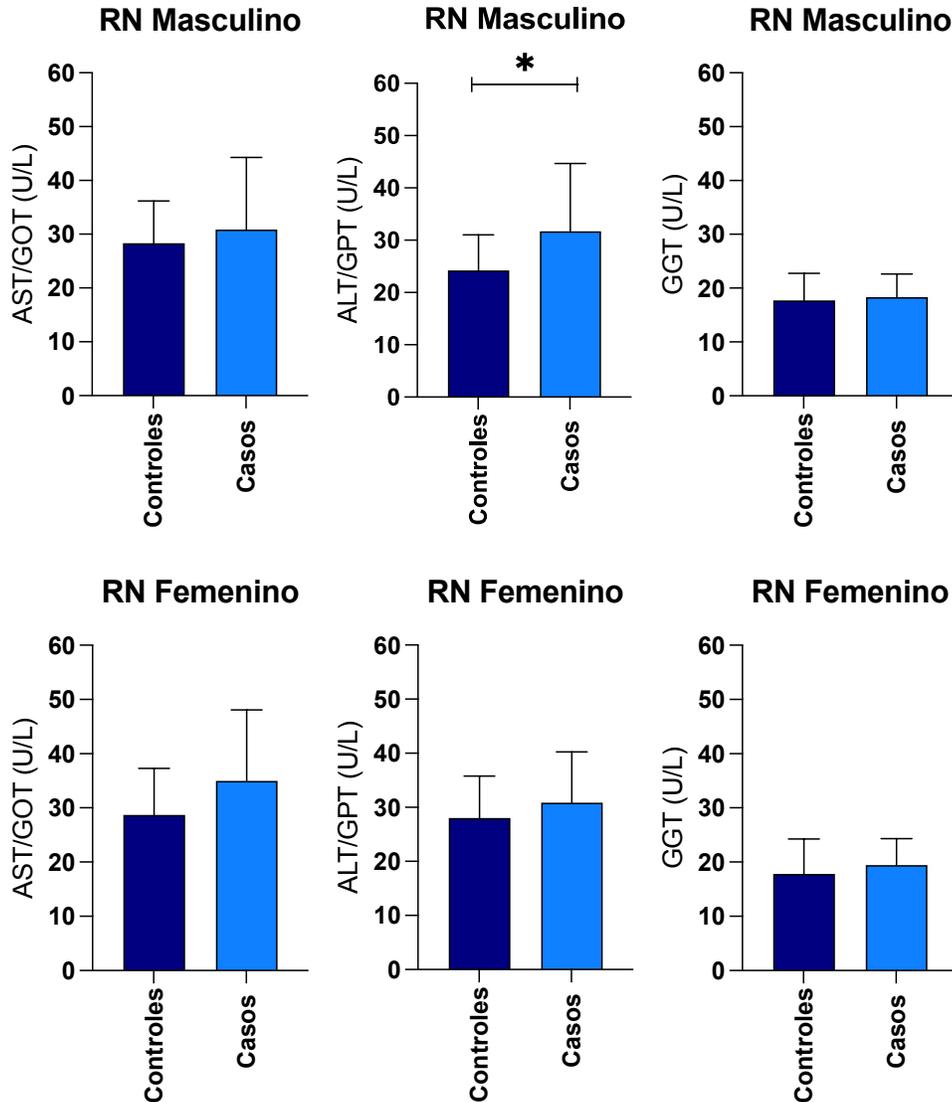


Figura 4. Niveles de transaminasas en suero en mujeres embarazadas y normopeso durante 3er trimestre de gestación, diferenciadas por sexo de los recién nacidos (RN). Los tres gráficos superiores reflejan los resultados de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST/GOT), alanina aminotransferasa (ALT/GPT) y gamma-glutamilttransferasa (GGT) para los recién nacidos de sexo masculino. Los tres gráficos inferiores reflejan los resultados de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST/GOT), alanina aminotransferasa (ALT/GPT) y gamma-glutamilttransferasa (GGT) para los recién nacidos de sexo femenino. Los valores se expresan en promedio \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$.

Los resultados de las mediciones de parámetros lipídicos no mostraron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos ($P = 0,6241$), HDL ($P = 0,1023$), colesterol total ($P = 0,4246$), LDL ($P = 0,5527$) y VLDL ($P = 0,8716$) entre el grupo de mujeres controles y las mujeres embarazadas con obesidad. Los detalles de los resultados se presentan en la figura 5.

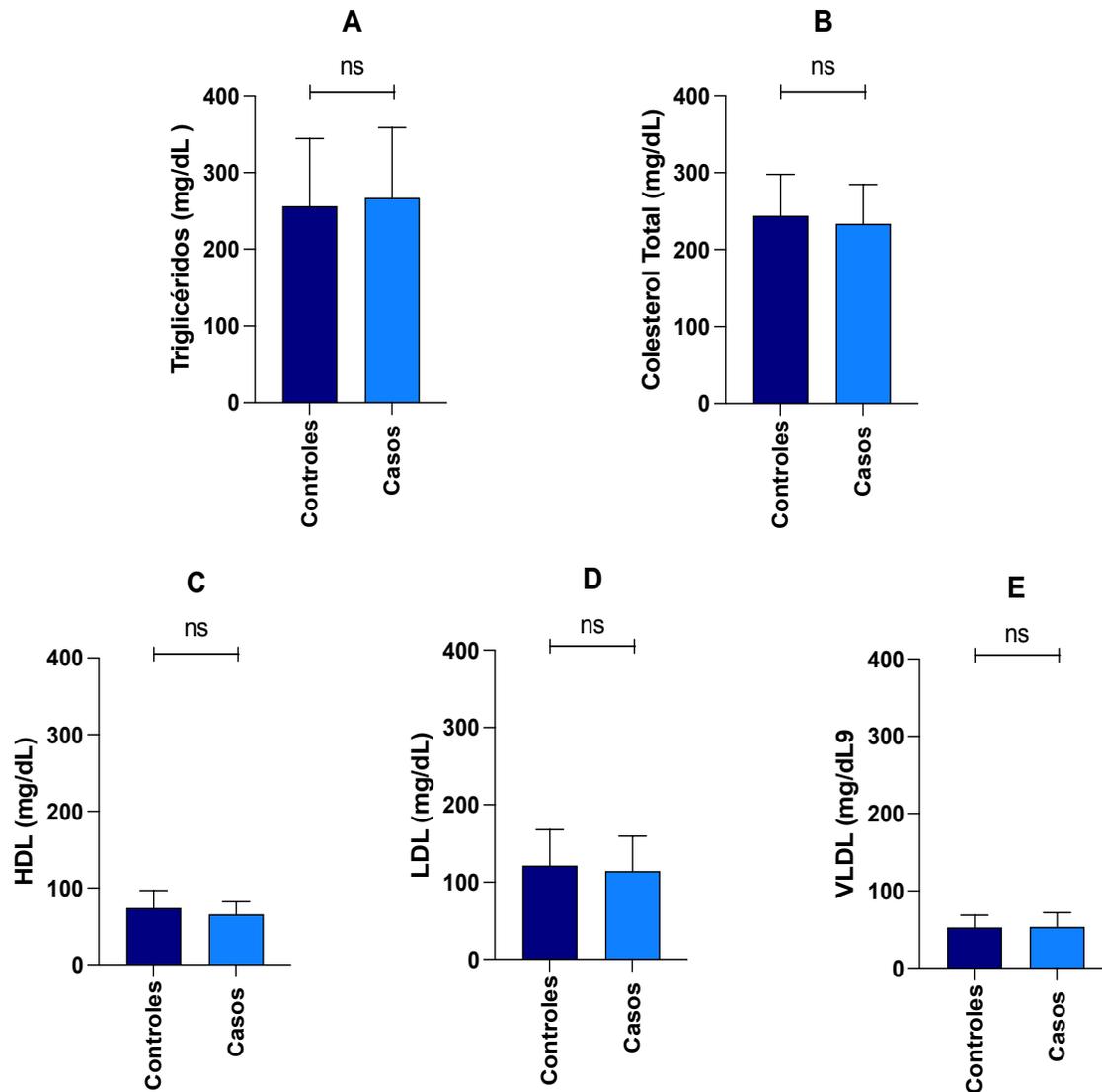


Figura 5. Niveles de Triglicéridos (A), Colesterol Total (B), HDL-colesterol (C), LDL-colesterol (D) y VLDL-colesterol (E) en suero de mujeres embarazadas. Los valores se expresan en promedio \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$ y ns no significativo.

Al analizar por sexo del recién nacido, no se observaron diferencias en ningún parámetro del perfil lipídico en aquellas madres con fetos de sexo masculino. Sin embargo, en el caso de la concentración de triglicéridos de recién nacidos de sexo femenino se observó una tendencia a un aumento en las mujeres con obesidad en comparación al grupo control (237,9 mg/dL vs 294,7 mg/dL, $P = 0,051$). Estos resultados, se observan en los gráficos de la figura 6.

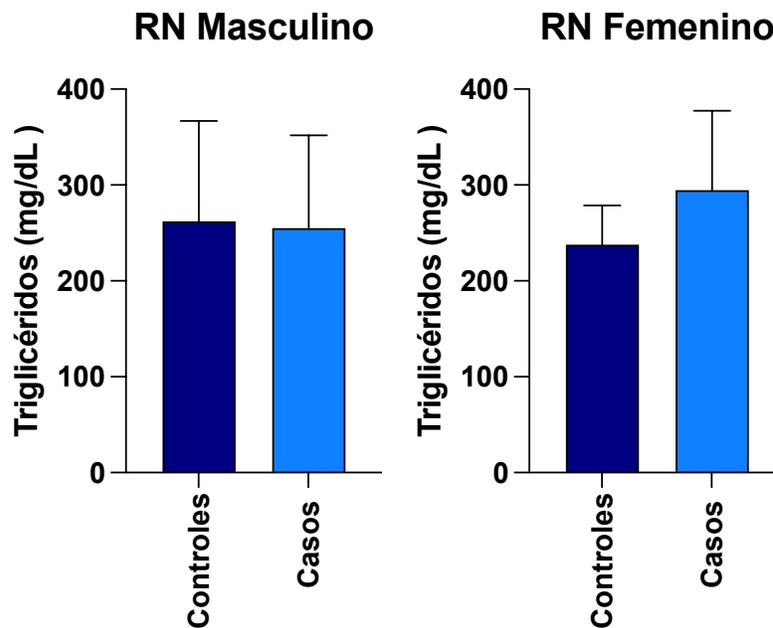


Figura 6. Niveles de triglicéridos en suero de mujeres embarazadas durante 3er trimestre de gestación, diferenciadas por sexo de los recién nacidos (RN). El gráfico a la izquierda refleja la concentración de triglicéridos para los recién nacidos de sexo masculino. El gráfico de la derecha refleja la concentración de triglicéridos para los recién nacidos de sexo femenino. Los valores se expresan en promedio \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test.

8.4 qPCR:

No se observaron diferencias significativas en los niveles séricos del miRNA-29a y miRNA-33a entre mujeres controles y con obesidad. Estos resultados se muestran en la figura 7.

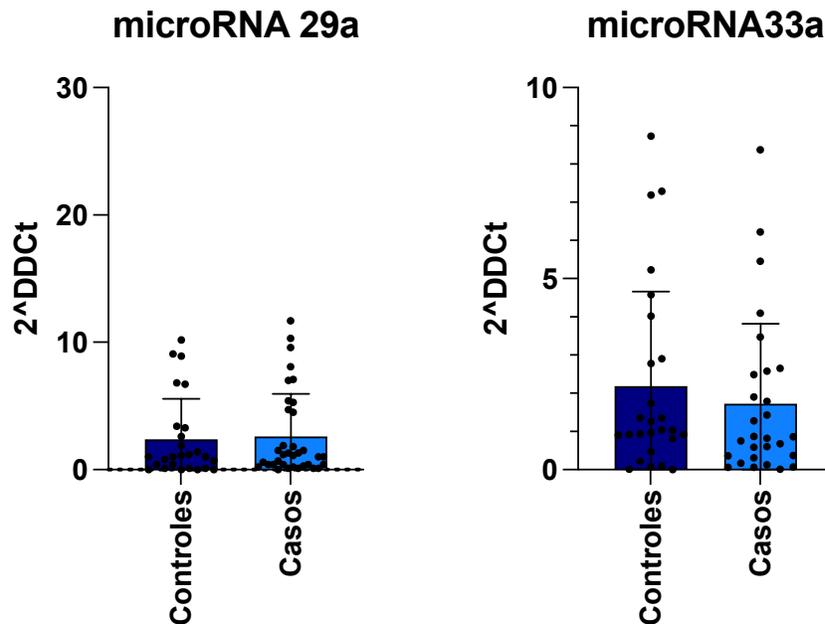


Figura 7. Niveles séricos de miRNA-29a y miRNA-33a en suero de mujeres embarazadas durante 3er trimestre de gestación. El gráfico a la izquierda refleja los niveles de miRNA-29a obtenidos respecto del gen constitutivo RNU6-1 a través de la fórmula 2^{-DDCt} . El gráfico de la derecha refleja los niveles de miRNA-33a obtenidos respecto del gen constitutivo RNU6-1 a través de la fórmula 2^{-DDCt} . Los valores se expresan en promedio \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante pruebas de t-test.

8.5 Correlaciones entre variables:

Se observó una correlación negativa entre los niveles de AST/GOT de las madres y la relación peso/talla de los recién nacidos en el grupo control ($r = -0,377$, $P = 0,033$), lo que no se observó en el grupo de mujeres con obesidad (figura 8).

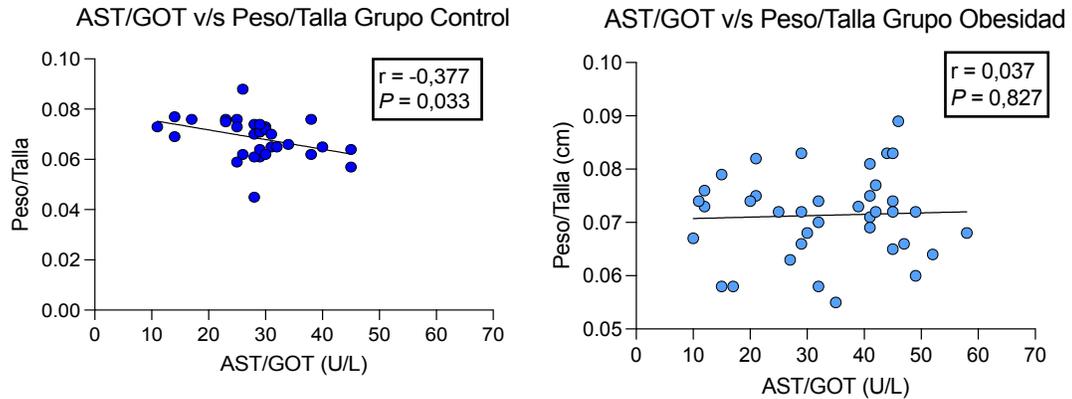


Figura 8. Correlación entre los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST/GOT) en mujeres embarazadas vs la relación peso/talla de los recién nacidos. El gráfico a la izquierda refleja la correlación del grupo de mujeres control. El gráfico a la derecha refleja la correlación del grupo de mujeres con obesidad. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

En el grupo de madres con obesidad se encontró una correlación positiva, estadísticamente significativa ($r = 0,363$, $P = 0,038$) entre los niveles séricos de miRNA-33a y la actividad de la transaminasa ALT, lo que no fue observado en el grupo de mujeres control (figura 9).

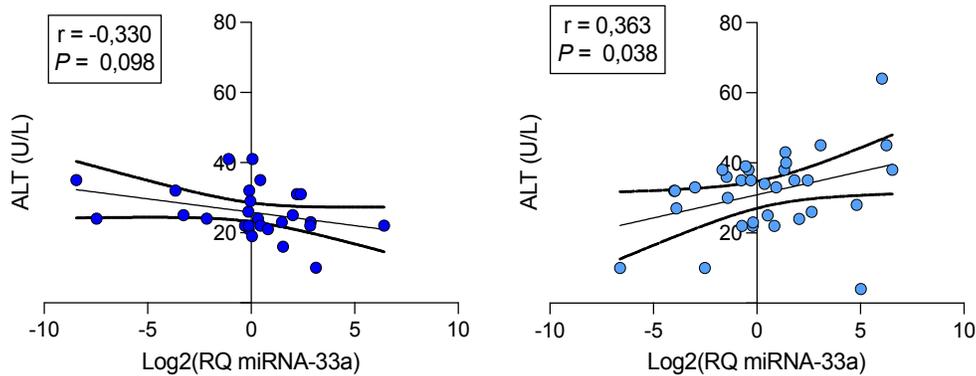


Figura 9. Correlación entre los niveles séricos de miRNA-33a con los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT/GPT) en mujeres embarazadas. El gráfico a la izquierda refleja la correlación del grupo de mujeres control. El gráfico a la derecha refleja la correlación del grupo de mujeres con obesidad. Los niveles de miRNA fueron log2-transformed. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

Además, se evaluaron las correlaciones entre los niveles de miRNA-29a y las concentraciones de transaminasas (AST/GOT, ALT/GPT y GGT). Se identificó una correlación positiva de los niveles de miRNA-29a con AST ($r = 0,143$, $P = 0,036$) (figura 10) y ALT ($r = 0,132$, $P = 0,044$) (figura 11) en el grupo control y con GGT ($r = 0,445$, $P = 0,006$) en el grupo de mujeres con obesidad (figura 12).

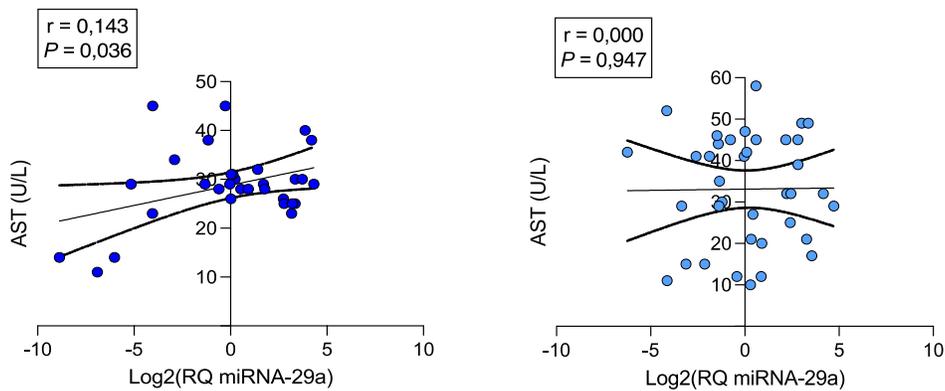


Figura 10. Correlación entre los niveles séricos de miRNA-29a con los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST/GOT) en mujeres embarazadas. El gráfico a la izquierda refleja la correlación del grupo de mujeres control. El gráfico a la derecha refleja la correlación del grupo de mujeres con obesidad. Los niveles de miRNA fueron log2-transformed. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

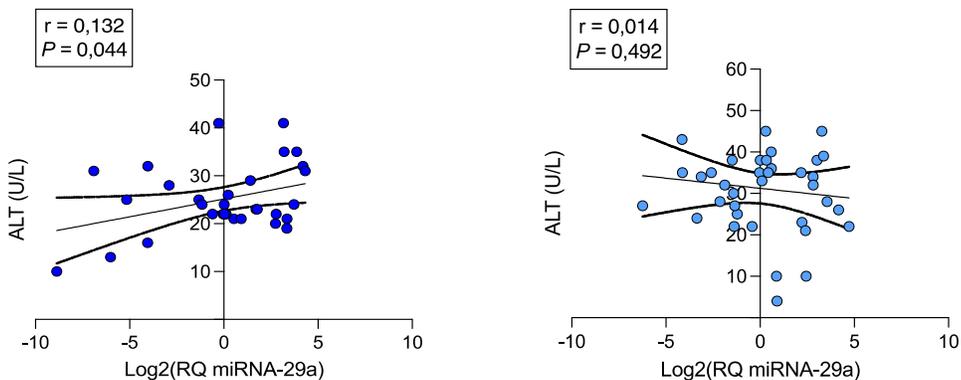


Figura 11. Correlación entre los niveles séricos de miRNA-29a con los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT/GPT) en mujeres embarazadas. El gráfico a la izquierda refleja la correlación del grupo de mujeres control. El gráfico a la derecha refleja la correlación del grupo de mujeres con obesidad. Los niveles de miRNA fueron log2-transformed. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

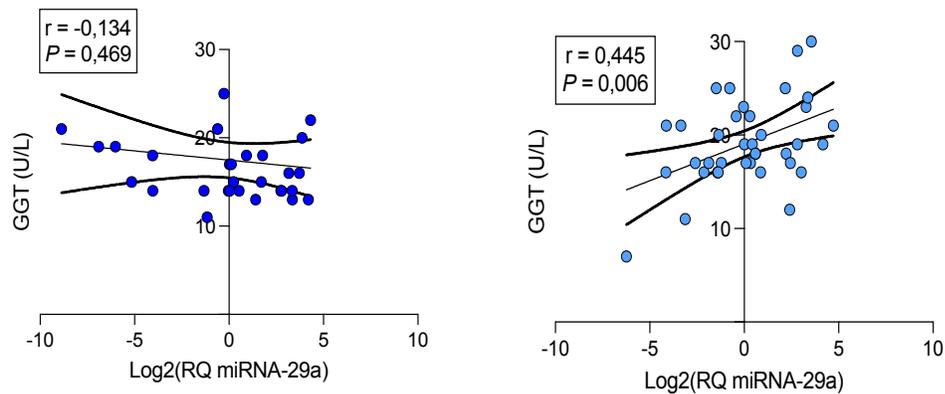


Figura 12. Correlación entre los niveles séricos de miRNA-29a con los niveles séricos de gamma glutamiltransferasa (GGT) en mujeres embarazadas. El gráfico a la izquierda refleja la correlación del grupo de mujeres controles. El gráfico a la derecha refleja la correlación del grupo de mujeres con obesidad. Los niveles de miRNA fueron log2-transformed. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

Finalmente, el miRNA-33a se correlacionó positivamente con la ganancia de peso materna entre el primer y tercer trimestre de gestación solo en el grupo de mujeres con obesidad ($r = 0,363$, $P = 0,038$) (Figura 13). Mientras que el miRNA-29a no se asoció a ganancia de peso en ninguno de los dos grupos estudiados (Tabla N°7).

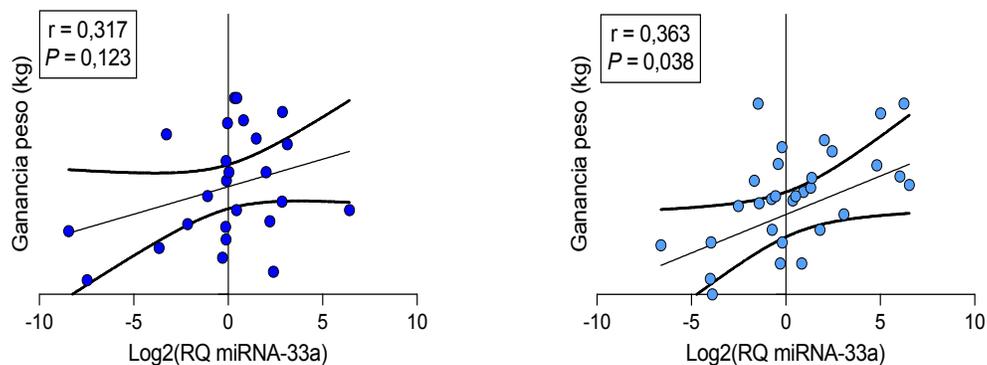


Figura 13. Correlación entre los niveles séricos de miRNA-33a con la ganancia de peso entre el primer y tercer trimestre de gestación. El gráfico a la izquierda refleja la correlación del grupo de mujeres controles. El gráfico a la derecha refleja la correlación del grupo de mujeres con obesidad. Los niveles de miRNA fueron log2-transformed. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

Además de las correlaciones estadísticamente significativas mostradas en las figuras anteriores, se incluye en la siguiente tabla un resumen de aquellas asociaciones que no alcanzaron significancia estadística. Estos hallazgos, aunque no presentaron una relación estadísticamente significativa ($P > 0,05$), aportan información relevante sobre la ausencia de una conexión directa entre las variables estudiadas.

Tabla N°7: Correlaciones entre variables no significativas estadísticamente ($P > 0,05$)

Variables Correlacionadas	Valores r	P – values
Niveles de ALT/GPT v/s Peso/Talla del grupo control	0,014	0,519
Niveles de ALT/GPT v/s Peso/Talla del grupo obesidad	0,013	0,490
Niveles de GGT v/s Peso/Talla del grupo control	0,021	0,420
Niveles de GGT v/s Peso/Talla del grupo obesidad	0,001	0,843
Niveles de AST/GOT v/s Niveles de miRNA-33a grupo control	0,001	0,860
Niveles de AST/GOT v/s Niveles de miRNA-33a grupo obesidad	0,026	0,366
Niveles de GGT v/s Niveles de miRNA-33a grupo control	0,008	0,657
Niveles de GGT v/s Niveles de miRNA-33a grupo obesidad	0,004	0,733
Niveles de AST/GOT v/s Niveles de miRNA-29a grupo obesidad	0,000	0,947
Niveles de ALT/GPT v/s Niveles de miRNA-29a grupo obesidad	0,014	0,492
Niveles de GGT v/s Niveles de miRNA-29a grupo control	-0,134	0,469
Niveles de miRNA-33a v/s Ganancia de peso grupo control	0,317	0,123
Niveles de miRNA-29a v/s Ganancia de peso grupo control	0,000	0,992
Niveles de miRNA-29a v/s Ganancia de peso grupo obesidad	0,002	0,776

El valor r corresponde al coeficiente de correlación que cuantifica la intensidad de la relación lineal entre las dos variables en el análisis de correlación. El P – value representa probabilidad de observar un coeficiente de correlación distinto a cero en los datos de la muestra analizada. La correlación se evaluó mediante prueba de Pearson.

9. Discusión

El objetivo principal de esta investigación fue estudiar los niveles séricos de los miRNAs 29a y 33a durante el tercer trimestre de gestación en mujeres con obesidad en comparación a mujeres de peso normal, y correlacionarlos con parámetros bioquímicos de función hepática maternos y datos antropométricos del recién nacido. Además, se evaluó la concentración de transaminasas hepáticas (AST/GOT, ALT/GPT y GGT) y del perfil lipídico materno, de acuerdo con el dimorfismo sexual del recién nacido.

Los resultados muestran un aumento de AST/GOT y ALT/GPT en mujeres embarazadas con obesidad, comparadas a las de peso normal (figura 3). Estos hallazgos podrían asociarse con algún grado de alteración o estrés hepático en las mujeres con obesidad, ya que los niveles de estas enzimas aumentan cuando ocurre destrucción de los hepatocitos, provocando la liberación de dichas enzimas a la circulación. Este fenómeno podría ser consecuencia de un aumento del estrés oxidativo e inflamación debido a los desórdenes metabólicos asociados con la obesidad.

Por otro lado, los niveles de GGT, que fueron similares entre los grupos (figura 3), podría sugerir que no hay diferencias en la función biliar y del metabolismo de las grasas producto de la obesidad en esta etapa de la gestación. En este sentido, podríamos inferir que la obesidad no induce cambios en la concentración de GGT durante la gestación, o bien que los posibles efectos estén atenuados por los cambios fisiológicos propios de este periodo (28). Estos resultados poseen importantes implicancias, tanto en el contexto del embarazo como en la salud hepática materna, ya que las posibles consecuencias de un estrés hepático durante el embarazo podrían manifestarse en la etapa posterior al parto, evolucionando hacia una progresión de esta alteración hepática, asociada a inflamación sostenida del hígado en la madre y posibles patologías relacionadas.

Sin embargo, no podemos descartar que la relación entre la obesidad y elevados niveles de transaminasas se asocien a alteraciones relacionadas con otros factores metabólicos o inflamatorios que no se analizaron en el presente proyecto, y que deberían ser incluidos en futuras investigaciones. En este sentido, estudios previos han reportado que adiponectina y TNF-alfa varían su concentración en circulación en presencia de daño hepático. La adiponectina, cuya acción es antiinflamatoria, interactúa con los receptores en el hepatocito para inhibir la respuesta a los ácidos grasos, lo que deriva en la inhibición de la acumulación de grasa intrahepática. El TNF-alfa, molécula proinflamatoria, ejerce un efecto contrario, participando en el reclutamiento de células inflamatorias con consecuencias en daño tisular (29).

Los niveles séricos del miRNA-29a y 33a no mostraron diferencias significativas debido a la obesidad en mujeres gestantes, en comparación al grupo de mujeres de peso normal (figura 7). En el grupo con obesidad, la correlación positiva de los niveles séricos del miRNA-33a con los niveles de ALT/GPT (figura 9), y de los niveles séricos de miRNA-29a con GGT (figura 12), sugieren una posible asociación entre los niveles circulantes de estos miRNAs como marcadores de la función del hígado materno, en condiciones de obesidad. A pesar de que GGT no es un marcador específico de daño hepático, se ha observado que un aumento de su actividad predice el desarrollo de EHGNA. Por su parte, el miRNA-29a posee un efecto protector, pues su sobreexpresión inhibe la metilación del DNA y participa en la neutralización del estrés oxidativo (18), aliviando la progresión de la EHGNA. Por lo tanto, se propone la utilidad del miRNA29a como un biomarcador, tanto del diagnóstico de EHGNA como de la progresión de la enfermedad (14).

Por el contrario, se ha descrito que el miRNA-33a tiene un rol deletéreo en el contexto de la EHGNA, ya que se relaciona estrechamente con factores de transcripción que participan en la regulación de la homeostasis de ácidos grasos y colesterol (20). Antecedentes han demostrado que la expresión del miRNA-33a se asocia con la expresión de SREBP-1 y -2 que

son factores de transcripción que regulan la síntesis de lípidos y esteroides en el metabolismo. SREBP-1 se centra más en la síntesis de ácidos grasos, mientras que SREBP-2 está más vinculado a la biosíntesis del colesterol. Esto es regulado, entre otros factores, por la presencia de resistencia a la insulina, condición que tiene un papel causal en la patogénesis de la EHGNA y del estado metabólico (22). En el grupo con obesidad, la asociación positiva entre miRNA-33a y la ganancia de peso materna sugiere que, a pesar del control metabólico que tienen durante el embarazo, las mujeres con obesidad son más susceptibles al daño hepático que las controles, dado su estado nutricional previo a la gestación.

Aunque numerosos estudios indican que la obesidad se asocia con cambios en el metabolismo lipídico, en el presente estudio no encontramos diferencias en el perfil lipídico entre las mujeres gestantes con obesidad y de peso normal. En este sentido, es interesante notar que el grupo con obesidad tuvo una menor ganancia de peso durante la gestación que el grupo control (tabla N°5), lo que podría explicar que los perfiles lipídicos sean comparables entre los grupos (figura 5). La menor ganancia de peso de las mujeres con obesidad podría deberse a una mayor supervisión y consejería nutricional en esas pacientes. Esta observación destaca la importancia de un seguimiento prenatal adecuado, independientemente del peso inicial de la madre, para garantizar un embarazo saludable y, así evitar empeorar condiciones metabólicas que provoquen complicaciones materno-fetales, tal como lo sugieren las guías de nutrición y alimentación en las gestantes, propuestas por el Departamento de Nutrición y Alimentos del Ministerio de Salud de Chile (30).

En los últimos años, múltiple evidencia ha mostrado que el sexo del recién nacido podría incidir en el control metabólico materno. Por esta razón, los datos se analizaron considerando el sexo del recién nacido. Se observó que las madres con obesidad y fetos de sexo masculino presentaron niveles de ALT/GPT más elevados que su contraparte del grupo control (figura 4). Por otro lado, observamos que las madres de fetos de sexo femenino del grupo con obesidad mostraron una fuerte tendencia a presentar mayores niveles de triglicéridos que las madres

controles con fetos de sexo femenino (figura 6). Este fenómeno podría estar relacionado a un control metabólico diferente de las mujeres de acuerdo, asociado a un dimorfismo sexual de sus hijos, ya que se ha visto que, durante la mitad de la gestación, las mujeres con fetos femeninos manifiestan una mayor resistencia a la insulina que las madres de fetos masculinos (31). Mientras que, otro estudio plantea todo lo contrario, es decir, ha expuesto que al inicio de la gestación las mujeres con fetos femeninos presentan menor resistencia a la insulina (32). Aunque aparentemente estos antecedentes parecen discordantes, destacan la importancia del sexo del feto en el desarrollo de la condición metabólica de la madre.

Finalmente, la asociación entre los niveles séricos de AST/GOT en las madres controles y el peso/talla de sus recién nacidos (figura 8) revelan una estrecha relación entre los marcadores bioquímicos hepáticos de las madres y el estado nutricional de sus bebés al nacer, subrayando la importancia de comprender cómo la salud materna puede influir en el crecimiento y desarrollo fetal. Este vínculo entre los niveles de AST/GOT y los parámetros antropométricos de los recién nacidos evidencia la participación de posibles factores determinantes en el contexto de la salud materna y la salud neonatal en la población estudiada.

Limitaciones

Nuestro estudio analizó los niveles séricos de miRNA en un solo momento de la gestación, por lo que sería valioso realizar estudios longitudinales para comprender mejor la dinámica de los cambios en los niveles de miRNAs y otros marcadores a lo largo del embarazo. Esto podría proporcionar información más precisa sobre cuándo y cómo estos marcadores podrían ser más útiles en la predicción y el monitoreo de la EHGNA. Por otro lado, sólo se incluyeron dos miRNAs. En este sentido, se podría incluir otros que han mostrado una alta expresión en el hígado como es miRNA-122a, el cual se podría utilizar como control en futuras investigaciones.

Fortalezas

Este estudio abordó múltiples aspectos de la salud materno-infantil, incluyendo parámetros antropométricos de los recién nacidos, marcadores bioquímicos maternos y niveles de miRNAs. Esta aproximación integral proporciona una visión completa y detallada de la relación entre la salud materna y el desarrollo fetal. Al utilizar los niveles de miRNAs como un marcador de función hepática, esta investigación podría servir como antecedente para un futuro análisis con aplicaciones clínicas, ya que proporciona una herramienta potencialmente útil para la detección temprana de problemas hepáticos en mujeres embarazadas y, en consecuencia, una atención prenatal más precisa.

10. Conclusión

Se observó un aumento significativo en las enzimas hepáticas, AST y ALT, en el grupo con obesidad en comparación con las mujeres normopeso, indicando posibles signos de estrés hepático. Esta elevación puede estar relacionada con la destrucción de hepatocitos, inflamación y estrés oxidativo, lo que subraya la necesidad de una atención prenatal más precisa y seguimiento de la función hepática en este grupo de mujeres.

En cuanto a los miRNAs 29a y 33a, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, se observó una correlación positiva entre sus niveles y las enzimas hepáticas GGT y ALT en el grupo con obesidad. Lo anterior, sugiere una posible asociación entre estos miRNAs y la función hepática materna en condiciones de obesidad.

Además, se observaron diferencias significativas en las enzimas hepáticas y los triglicéridos en función del sexo del feto. Las madres con obesidad y un feto de sexo masculino presentaron niveles más altos de ALT, mientras que las madres de fetos de sexo femenino en el grupo de mujeres con obesidad manifestaban niveles de triglicéridos más elevados, independientemente del peso o talla del recién nacido. Este fenómeno enfatiza el papel del sexo fetal en las adaptaciones metabólicas de la madre.

En resumen, esta investigación destaca la importancia de evaluar la función hepática materna y su impacto en la salud materno-infantil, particularmente en el contexto de la obesidad gestacional. Los resultados demuestran la necesidad de un monitoreo temprano y preciso de la función hepática en mujeres embarazadas con obesidad siguiendo pautas nutricionales y ginecológicas de nuestro país y sugieren el potencial de los miRNAs 29a y 33a como marcadores clínicos útiles. Estos hallazgos ofrecen una base sólida para futuras investigaciones y la posibilidad de mejorar la atención médica de mujeres embarazadas y sus recién nacidos.

11. Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. OMS, cop. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/health-topics/obesity>
2. Ministerio de Salud de Chile [Internet]. Minsal, 2019. Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf
3. Prensa SCHGE. Asociación Chilena de Hepatología advierte sobre los riesgos del hígado graso en Chile [Internet]. Sociedad Chilena de Gastroenterología, 2021. Disponible en: <http://www.sociedadgastro.cl/gastroweb/index.php/prensa/prensa-schge/494-asociacion-chilena-de-hepatologia-advierete-sobre-los-riesgos-del-higado-graso-en-chile>
4. Journal-of-hepatology.eu. Disponible en: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(20\)30385-8/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(20)30385-8/fulltext)
5. Ferramosca A. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. World J Gastroenterol [Internet]. 2014;20(7):1746. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i7.1746>
6. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimipoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. EJSS (Champaign) [Internet]. 2019;19(7):994–1003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/17461391.2019.1571114>
7. Sarkar M, Grab J, Dodge JL, Gunderson EP, Rubin J, Irani RA, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in pregnancy is associated with adverse maternal and perinatal outcomes. J Hepatol [Internet]. 2020; 73(3):516–22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32531415/>

8. Faris M, Jahrami H, Abdelrahim D, Bragazzi N, BaHammam A. The effects of Ramadan intermittent fasting on liver function in healthy adults: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2021;178(108951):108951. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108951>
9. Hagström H, Höjjer J, Ludvigsson JF, Bottai M, Ekbom A, Hultcrantz R, et al. Adverse outcomes of pregnancy in women with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* [Internet]. 2016;36(2):268–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12902>
10. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2014;15(1):24–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1389201015666140330192345>
11. Aguilar-Cordero MJ, Baena García L, Sánchez-López AM. Obesidad durante el embarazo y su influencia en el sobrepeso en la edad infantil. *Nutr Hosp* [Internet]. 2016; 33(5):18–23. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112016001100003
12. Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol Metab* [Internet]. 2018;15:8–19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007>
13. Grimbert S, Fromenty B, Fisch C, Letteron P, Berson A, Durand-Schneider AM, et al. Decreased mitochondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice: Possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy. *Hepatology* [Internet]. 1993;17(4):628–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840170417>
14. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol (Oxf)* [Internet]. 2017 [citado el 14 de septiembre de 2023];219(2):346–61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5297868/>

15. Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Miranda MJ, Pérez-Cano R. ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Rev Osteoporos Metab Miner* [Internet]. 2016;8(1):40–4. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2016000100007
16. Lin H-Y, Yang Y-L, Wang P-W, Wang F-S, Huang Y-H. The emerging role of MicroRNAs in NAFLD: Highlight of MicroRNA-29a in modulating oxidative stress, inflammation, and beyond. *Cells* [Internet]. 2020;9(4):1041. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32331364/>
17. Fang Z, Dou G, Wang L. MicroRNAs in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2021;17(7):1851–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.59588>
18. Li L, Hu W, Liu K, Zhang D, Liu M, Li X, et al. miR-148a/LDLR mediates hypercholesterolemia induced by prenatal dexamethasone exposure in male offspring rats. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2020;395(114979):114979. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32234517/>
19. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* [Internet]. 2005;438(7068):685–9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature04303>
20. Erhartova D, Cahova M, Dankova H, Heczkova M, Mikova I, Sticova E, et al. Serum miR-33a is associated with steatosis and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver disease after liver transplantation. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(11):e0224820. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0224820>
21. Huang Y-H, Yang Y-L, Wang F-S. The role of miR-29a in the regulation, function, and signaling of liver fibrosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018;19(7):1889. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29954104/>

22. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriier NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2011;108(22):9232–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102281108>
23. Gobierno de Chile [Internet]. Gob.cl, 2019. Disponible en: <https://www.crececontigo.gob.cl/wp-content/uploads/2016/04/Agenda-Salud-de-la-Mujer-2019-FINAL.pdf>
24. Public Library of Science (PLoS); 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002220.t014>
25. Public Library of Science (PLoS); 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002220.t015>
26. Bio-rad. Applications Guide Real-Time PCR Applications Guide. (2006)
27. Biomedcentral.com. Disponible en: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-7-85>
28. Cocucci SE, Di Carlo MB, Touzón MS, Santacruz MG, Payalef SN, Reyes AP, et al. Biochemical profiling study in umbilical cord blood in mothers with metabolic disorders. J Matern Fetal Neonatal Med [Internet]. 2022;35(25):8317–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/14767058.2021.1973994>
29. Zhao S, Jiang J, Jing Y, Liu W, Yang X, Hou X, et al. The concentration of tumor necrosis factor- α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity. Cell Death Dis [Internet]. 2020;11(1):1–13. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41419-020-2264-z>
30. Ministerio de Salud de Chile. Disponible en: <https://diprece.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/06/2019.05.27-VC-Nutrici%C3%B3n-y-alimentaci%C3%B3n-gestante.pdf>

31. Yamashita H, Yasuhi I, Koga M, Sugimi S, Umezaki Y, Fukuoka M, et al. Fetal sex and maternal insulin resistance during mid-pregnancy: a retrospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2020;20(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12884-020-03242-x>
32. Walsh JM, Segurado R, Mahony RM, Foley ME, McAuliffe FM. The effects of fetal gender on maternal and fetal insulin resistance. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(9):e0137215. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137215>

12. Anexos

Tabla N°1

Protocolo N°1	Protocolo N°2	Protocolo N°3	Protocolo N°4
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Extracción en Columnas (Kit Marca Zymo)</u> - Se utilizó una proporción 1:3 de suero y TRIzol y 60 uL de cloroformo para conseguir la fracción líquida de la mezcla que contiene el RNA. - Luego a través de la columna se hicieron lavados con etanol y con los Buffers de Pre-lavado y Lavado. Además, se usó DNAsa I previo a la elución de los microRNAs con agua libre de nucleasas. - Finalmente, se midió la concentración en Espectrofotómetro NanoQuant. 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Extracción en Columnas (Kit Marca Thermofisher)</u> - Se utilizó una proporción 1:9 de suero y TRIzol con 200 uL de cloroformo para conseguir la fracción líquida que contiene el RNA. - Luego se hizo lavado con etanol puro y se llevó a las columnas para realizar lavados con un Buffer de lavado y posteriormente eluir el contenido retenido con Buffer de Elución provisto en el kit. - Finalmente, se midió la concentración en Espectrofotómetro NanoQuant. 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Extracción Mixta (Columnas + Método Convencional)</u> - Se realizó la extracción combinando el método de extracción convencional agregando 10 uL Proteinasa K a 100 uL de suero, 1.000 uL de TRIzol y 220 uL de cloroformo para conseguir la fracción líquida de la mezcla que contiene el RNA y se añadió el mismo volumen de isopropanol, dejando la solución a -20°C. - El segundo día se realizaron lavados con alcohol al 75% utilizando columnas y eluyendo el RNA con agua libre de nucleasas. - Finalmente, se midió la concentración en Espectrofotómetro NanoQuant. 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Extracción con Método Convencional (Dos días)</u> - Se utilizó una proporción 1:10 de suero y TRIzol junto con 10 uL de Proteinasa K y 220 uL de cloroformo para conseguir la fracción líquida de la mezcla que contiene el RNA y se añadió el mismo volumen de isopropanol, dejando la solución a -20°C. - El segundo día se realizaron lavados con alcohol al 75% y se rehidrató el pellet obtenido con agua libre de nucleasas. - Finalmente, se midió la concentración en Espectrofotómetro NanoQuant.

Tabla N°2

Los resultados promedios de concentraciones y ratios obtenidos a través de cada protocolo fueron:

Parámetro	Protocolo N°1 (n=10)	Protocolo N°2 (n = 4)	Protocolo N°3 (n = 10)	Protocolo N°4 (n = 20)
Concentración Ng/uL)	4,82 ± 8,75	12,69 ± 16,52	9,89 ± 5,19	438,74 ± 240,42
Ratio	1,10 ± 0,74	2,61 ± 4,44	1,51 ± 0,32	1,26 ± 0,06

Para poder cuantificar la abundancia de los miRNAs presentes en las muestras, se midió el RNA extraído del suero sanguíneo de las pacientes controles y obesas. En ese sentido, se recuperó 1.006 ng de RNA [462 – 1.550] de las muestras de controles y 948,8 ng de RNA [483,8 – 1.483,8] de las muestras de obesas. El resumen de los resultados obtenidos respecto de concentración de RNA y su relación 260/280 de absorbancias se muestran en la Tabla N°3.

Tabla N°3

Los Valores obtenidos en la medición espectrofotométrica del RNA extraído siguiendo el protocolo seleccionado fueron:

Parámetros	Controles	Obesas
Absorbancia 260	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,6
Absorbancia 280	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,5
Concentración de RNA (ng/uL)	1.006 ± 544	984,8 ± 501
Relación 260/280	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1

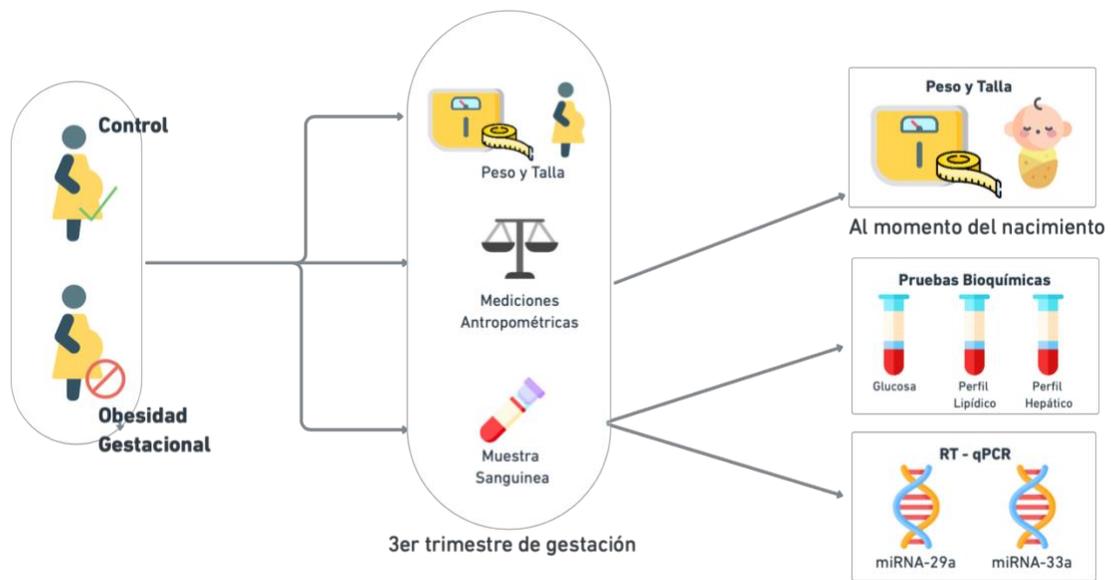


Figura 1. Se muestra un esquema resumen de la metodología realizada en esta investigación. Se estudiaron mujeres embarazadas con obesidad gestacional y de peso normal, en todas ellas se consignaron determinaciones antropométricas y se tomó una muestra sanguínea en el tercer trimestre de la gestación. La muestra sanguínea se procesó para el análisis bioquímico (glucosa, perfil lipídico y perfil hepático) y para el análisis molecular (miRNA-29a y miRNA-33a) a través de RT-qPCR. También se registraron los datos del recién nacido al término del embarazo.



ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

(Documento en versión 3.1 corregida 17.11.2020)

Con fecha 01 de agosto de 2023, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista, Profesor Titular, Presidenta
Dra. María Angela Delucchi B., Médico Pediatra Nefrólogo, Profesor Titular
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad
Dra. Grisel Orellana V., Médico Neuropsiquiatra, Profesor Asociado
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular, Profesor Asociado
Dra. María Luz Bascuñán R., Psicóloga PhD, Profesor Asociado
Sra. Karima Yarmuch G., Abogada, Dirección Jurídica, Facultad de Medicina
Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaria Ejecutiva
Prof. Verónica Aliaga C., Kinesióloga, Magíster en Bioética, Profesor Asociado
Dr. Dante Cáceres L., Médico Veterinario, Doctor en Salud Pública, Profesor Asociado
Dra. Yalda Lucero, Médico Pediatra, Doctorada en Ciencias Médicas, Profesor Ayudante

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"ANÁLISIS DE LOS NIVELES SÉRICOS DE MICRORNAS 29a y 33a EN MUJERES EMBARAZADAS CON OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS DEL RECIÉN NACIDO"**. Cuyo investigador Responsable es el Dr. Manuel Maliqueo, quien desarrolla labores en el Departamento de Medicina Interna Occidente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto de pregrado de la carrera de Tecnología Médica
- Curriculum Vitae de los investigadores
- Carta Compromiso del investigador
- Carta de autorización para uso de laboratorio, Dr. Nicolás Crisosto, Jefe Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile, de fecha 22 de mayo de 2023

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

01|AGO|2023

Teléfono: 29789536 - Email: ceish.1





UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) **Carácter de la población a estudiar:** Se analizarán muestras de suero de mujeres gestantes, que fueron obtenidas en los proyectos 033-2013 FONDECYT N°11130250 "Effects of maternal obesity on steroid levels during pregnancy. A possible relationship between adipose tissue and inflammatory factors on placental steroidogenesis" y 201-2017 FONDECYT N°1181798 "Maternal obesity influences placental fatty acid transport. Are there an impact on fatty acid metabolism in the fetal liver?", cuyo investigador responsable es el Dr. Manuel Maliqueo.
- b) **Utilidad del proyecto:** Evaluar niveles de microRNAs en muestras de suero de mujeres gestantes, los que pueden ser útiles como biomarcadores de enfermedad de hígado graso en mujeres embarazadas y/o de sus efectos sobre variables antropométricas del recién nacido. Es una temática relevante considerando el aumento de la obesidad en la población y el desconocimiento de los efectos que esta condición puede tener sobre el embarazo.
- c) **Riesgos y beneficios:** Riesgos mínimos.
- d) **Protección de los participantes (asegurada por el consentimiento informado):** Considerando que los nuevos análisis coinciden con los objetivos de los proyectos en que las participantes consintieron la toma de muestras, que han transcurrido entre 5 y 8 años desde el reclutamiento y que la información es mantenida en estricta confidencialidad, y las muestras de suero y datos clínicos se encuentran anonimizados (códigos numéricos) que no permiten identificar el nombre de las participantes, se autoriza la dispensa al consentimiento informado.
- e) **Notificación oportuna de reacciones adversas:** No aplica.
- f) **Compromiso del investigador responsable en la notificación de los resultados del estudio al finalizar el proyecto:** Si.
- g) **Requiere seguimiento o visita en terreno:** Si ___ No X
N.º de vistas: _____

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Sin perjuicio de lo anterior, según lo establecido en el artículo 10 bis del D.S N° 114 de 2011, del Ministerio de Salud que aprueba el reglamento de la ley N° 20.120; es preciso recordar que

01|AGO|2023





UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

toda investigación científica en seres humanos deberá contar con la autorización expresa del o de los directores de los establecimientos dentro de los cuales se efectúe, la que deberá ser evacuada dentro del plazo de 20 días hábiles contados desde la evaluación conforme del CEISH, siendo de responsabilidad del investigador enviar a este Comité una copia de la misma dentro del plazo señalado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de **01 año** a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio:

- Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile.

**JAVIERA DE LOS
ANDES COBO RIVEROS**

Nta. Javiera Cobo Riveros
Secretaria Ejecutiva CEISH

Santiago, 01 de agosto 2023

Proyecto: N° 058-2023
Archivo acta: N° 044

01|AGO|2023

