

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL DE LA REGIÓN – UNIDAD DURANGO**

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN PLAC9 ASOCIADO A INVASIÓN
TROFOBLÁSTICA COMO PROBABLE MARCADOR PREDICTIVO PARA EL
DESARROLLO DE PREECLAMPSIA ECLAMPSIA**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

ALUMNO:

Q.F.B. CAROLINA TOVALÍN RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EN C. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ

Co DIRECTOR DE TESIS

DRA. EN C. VERONICA LOERA CASTAÑEDA

Victoria de Durango, Dgo., Junio de 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:40 horas del día 8 del mes de Junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:

"Estudio molecular del gen PLAC9 asociado a invasión trofoblástica como probable marcador predictivo para el desarrollo de preeclampsia-eclampsia."

Presentada por el alumno:

TOVALÍN
Apellido paterno

RODRÍGUEZ
Apellido materno

CAROLINA
Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	5	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Carlos Galaviz Hernández

Dra. Verónica Loera Castañeda

Dr. Isaías Cháirez Hernández

Dra. Martha Rodríguez Morán

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. JOSÉ BERNARDO PROAL NAJERA



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 19 de junio del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN en su sesión Unidad Durango ordinaria No. 5 celebrada el día 12 del mes de Mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

TOVALÍN
Apellido paterno

RODRÍGUEZ
Apellido materno

CAROLINA
Nombre (s)

Con registro:

A	0	8	0	0	5	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Biomedicina

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Estudio Molecular del Gen PLAC9 Asociado a Invasión Trofoblástica como Probable Marcador Predictivo para El Desarrollo de Preeclamsia-Eclamsia"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Dr. Carlos Galaviz Hernández, Dra. Verónica Loera Castañeda

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Dr. Carlos Galaviz Hernández

Dra. Verónica Loera Castañeda

El Aspirante

El Presidente del Colegio

Carolina Tovalín Rodríguez.
Tovalín Rodríguez Carolina

Dr. José B. Proal Nájera C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **8** del mes **JUNIO** del año **2010**, el (la) que suscribe **CAROLINA TOVALÍN RODRÍGUEZ** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA** con número de registro **A080051**, adscrito a **CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ** y de la **DRA. VERÓNICA LOERA CASTAÑEDA** y cede los derechos del trabajo intitulado **ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN PLAC9 ASOCIADO A INVASIÓN TROFOBLÁSTICA COMO PROBABLE MARCADOR PREDICTIVO PARA EL DESARROLLO DE PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **carola475@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Carolina Tovalín Rodríguez

CAROLINA TOVALÍN RODRÍGUEZ

Nombre y firma

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO

EL TRABAJO SE REALIZÓ EN EL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD DURANGO Y DEL CENTRO OFTALMOLÓGICO CONDE DE VALENCIANA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. EN C. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS. Que puso los medios para entrar a la maestría; me dio la fortaleza espiritual y física

A mi mamá. Que con su apoyo y esfuerzo me ha ayudado en las dificultades y retos que se me han presentado.

A mis hermanas Dalia y Laura. Por apoyarme y desearme siempre lo mejor.

A mi novio Hugo. Por tu apoyo, buenos consejos y ánimos que me dabas para que terminara mi maestría amor. Por tu amor y confianza mil gracias!!!!

A mi asesor Dr Carlos Galaviz. Que me permitió estar en éste proyecto de tesis, así como todo su apoyo incondicional, por su tiempo y dedicación en la revisión del trabajo. "Gracias por todo Dr".

A mis maestros. Les doy las gracias son ustedes los que me dieron las herramientas para terminar mi maestría y de ustedes aprendí lo mejor

A todos ustedes mil gracias de todo corazón, que Dios los bendiga

DEDICATORIA

A mi mamá. Ofelia Rodriguez Carmona. Le dedico esta tesis por todo el amor y apoyo que me ha dado siempre para seguir superandome sin usted no hubiera sido posible terminar mi maestría; nunca terminaré de agradecerle todo lo que hace para que yo salga adelante.

QUE DIOS LA BENDIGA

TU HIJA QUE TE ADMIRA Y TE QUIERE MUCHO

Carolina Tovalín Rodriguez

ÍNDICE

GLOSARIO	I
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VI
RELACIÓN DE CUADROS	VIII
RELACIÓN DE FIGURAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Clasificación de trastornos hipertensivos del embarazo.....	4
2.1.1 Eclampsia.....	8
2.1.2 Síndrome HELLP.....	9
2.2 Placenta.....	9
2.3 Factores de riesgo.....	10
2.4 Complicaciones.....	11
2.4.1 Complicaciones maternas.....	11
2.4.2 Complicaciones fetales.....	12
2.5 Etiología.....	12
2.5.1 Fisiopatología de la preeclampsia.....	13
2.5.2 Invasión trofoblástica.....	14
2.5.3 Fisiopatología y clínica.....	18
2.5.4 Factores angiogénicos.....	19
2.5.5 Receptores membranales.....	20
2.5.6 Factores angiogénicos y antiangiogénicos en la PEE.....	20
2.6 Enfermedad trofoblástica gestacional.....	21
2.7 Modelos animales en el estudio de la preeclampsia.....	21
2.8 Gen PLAC9.....	23
2.9 Métodos de identificación de mutaciones.....	24
2.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	24

2.9.2 Secuenciación.....	27
III. JUSTIFICACIÓN.....	29
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	30
V. HIPÓTESIS.....	30
VI. OBJETIVOS.....	30
6.1 Objetivo General.....	30
6.2 Objetivos Específicos.....	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1 Diseño Metodológico.....	31
7.1.1 Grupos de estudio.....	31
7.1.2 Universo de estudio.....	31
7.1.3 Tamaño de muestra.....	31
7.1.4 Aspectos éticos.....	31
7.2 Criterios de selección.....	32
7.2.1 Criterios de inclusión.....	32
7.2.2 Criterios de exclusión.....	32
7.2.3 Criterios de eliminación.....	32
7.3 Variables de estudio.....	32
7.3.1 Variable dependiente.....	32
7.3.2 Variable independiente.....	32
7.3.3 Variables intervienientes.....	33
7.4 Procedimientos.....	35
7.5 Análisis estadístico.....	42
VIII. RESULTADOS.....	43
IX. DISCUSIÓN.....	65
X.CONCLUSIONES.....	67

XI. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES.....	68
XII. BIBLIOGRAFIA.....	69
XIII. ANEXOS.....	80
1. Extracción de DNA.....	80
2. Preparación de Gel de agarosa.....	82
3. Preparación de muestras para PCR.....	83
4. Corte de bandas de Gel de agarosa.....	84
5. Purificación de bandas (QIAquick Gel Extraction Kit Protocol).....	85
6. Preparación de PCR con BigDye.....	87
7. Purificación del producto de PCR con columnas Centri-Sep™.....	88
8. Preparación de soluciones de trabajo.....	89
9. Cuestionario de recolección de datos.....	92
10. Carta de consentimiento informado.....	93

GLOSARIO

ADN (ácido desoxirribonucleico). Molécula que codifica los genes que forman la estructura y función de los organismos vivos y permite la transmisión de información genética de una generación a otra.

ADN genómico. Secuencia de ADN cromosómico de un gen o un segmento génico, que incluye la secuencia de ADN de regiones codificadoras y no codificadoras. También, ADN que se ha aislado directamente de las células.

ADN polimerasa. Enzima que puede sintetizar una nueva cadena de ADN utilizando como modelo una cadena de ADN previamente sintetizada.

Alelo. Una de las versiones alternativas de un gen que puede ocupar un determinado locus.

Aminoácidos. Unidades elementales constitutivas de las moléculas denominadas Proteínas.

ARN (ácido ribonucleico). Ácido nucleico formado a partir de un modelo de ADN, que contiene ribosa, en lugar de desoxirribosa.

Cadena antisentido de ADN. Cadena de ADN no codificadora que es complementaria al ARNm y sirve de molde para la síntesis de ARN. También denominada cadena transcrita.

Casos-Controles. Estudio observacional de factor de riesgo.

Código Genético. Tripletes de bases que codifican ó se expresan en los 20 aminoácidos hallados en las proteínas.

Codón. Triplete de bases en una molécula de ADN o ARN que codifica para un aminoácido específico en la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas.

Codón de terminación. Uno de los tres codones (UAG, UAA, UGA) que termina la síntesis de un polipéptido.

Consentimiento informado. Documento legal que se basa en la habilidad de los investigadores para comunicarse honesta y claramente con sus pacientes. Establece el espacio comunicativo destinado a informar en forma oral o escrita los propósitos, beneficios y riesgos del estudio

Cromosoma. Estructura en forma de hebra contenida en el núcleo celular, formado por cromatina y portadora de información genética.

Desnaturalización. Conversión de ADN del estado de doble cadena al de una sola cadena, generalmente mediante calentamiento para destruir los enlaces químicos que participan en el apareamiento de bases.

Desviación Estándar. El valor absoluto de diferencia de media de los valores individuales con respecto a la media.

dNTPs. Son las unidades básicas de construcción para la nueva molécula de ADN y son utilizados en múltiples ensayos basados en la PCR.

Electroferograma. Es un gráfico realizado con los resultados de un análisis de electroforesis. Muestra la secuencia de datos producida por una máquina automática de secuenciación de DNA.

Electroforesis. Es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Ética. Ciencia que estudia la bondad o maldad de los actos humanos.

Exón. Región transcrita de un gen que está presente en un ARN mensajero maduro.

Factores de riesgo. Condiciones ó situaciones que están asociados con un riesgo aumentado de contraer la enfermedad.

Fenotipo. Características bioquímicas, fisiológicas y/o morfológicas que expresa un individuo, determinadas por su genotipo y el ambiente en el que se expresa

Gen. Unidad hereditaria. En términos moleculares, secuencia de ADN cromosómico que se requiere para el origen de un producto funcional.

Gen estructural. Gen que codifica cualquier producto proteico o de ARN pero no un factor regulador.

Genoma. Secuencia de ADN completa que contiene la información genética total de un gameto, un individuo, una población o una especie.

Genotipo. Constitución genética (genoma). Los alelos presentes en un locus.

Heterocigoto. Individuo o genotipo con dos alelos diferentes en un locus determinado en un par de cromosomas homólogos. Típicamente, un alelo es la forma normal y el otro es el mutante, pero el término también se emplea para referirse a la heterocigosis para diferentes alelos normales o para referirse a diferentes alelos en cada hebra de una molécula de ADN.

Homocigoto. Individuo a genotipo con alelos idénticos en un determinado locus en un par de cromosomas homólogos o en cada hebra de una molécula de ADN.

Intrón. Segmento de un gen que inicialmente se transcribe, pero que a continuación se retira de la transcripción del ARN primario por medio del ensamblaje de las secuencias situadas (exones) a cada lado de dicho ARN.

Loci. Plural de locus.

Locus. Posición de un gen en un cromosoma. Diferentes formas del gen (alelos) pueden ocupar el locus.

Media. Herramienta estadística obtenida de la suma de todos los valores de las variables, dividida entre el número total de elementos.

Mediana. Herramienta que representa el punto donde el número de observaciones superiores es igual al de las inferiores

Muestra. Es un subgrupo de una población, que es seleccionada para estudio o representación de la misma.

Mutación. Cualquier cambio hereditario en la secuencia de ADN genómico.

Mutación puntual. Cambio en un par de bases de un solo nucleótido en el ADN.

Nucleótido. Molécula compuesta de una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato.

Oligonucleótidos. Molécula corta de ADN (habitualmente de 8 a 50 pares de bases) sintetizada para utilizarse como sonda

Población. Es un grupo de personas en un ambiente dado.

Polimorfismo. Es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

Preeclampsia. Complicación médica del embarazo.

Promotor. Secuencias de ADN localizadas en el extremo 5' de un gen que determinan el lugar de inicio de la transcripción y algunas veces también la distribución en los tejidos del ARNm.

q. En citogenética, brazo largo de un cromosoma en genética poblacional, frecuencia del menos común de los alelos de un par.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica en la que una secuencia corta de ADN o ARN puede amplificarse $>10^6$ veces por medio de dos iniciadores de oligonucleótidos próximos y ciclos repetidos de amplificación con ADN-polimerasa, a partir de una plantilla o molde de ADN.

Recesivo. Rasgo o gen que se expresa sólo en estado homocigoto o hemocigoto.

Secuenciación. Es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G, T) en un oligonucleótido de DNA

SNP. Polimosrfismo de nucleótido simple

Trombocitopenia. Disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales (150,000 a 400,000 plaquetas por microlitro)

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácido
C	Citosina
°C	Grados centígrados
DMSO.	Dimetil Sulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
Eng	Endoglina
Flt	Fms-like tirosina kinasa
FGF	Factor de crecimiento fibroblastos
G	Guanina
gr	Gramos
HELLP	Hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia
HLA-G	Gen expresado en placenta
KIR	Celulas Killer
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MPM	Marcador de peso molecular
µL	Microlitros
mL	Mililitro
mM	Milimolar

min.	Minutos
M	Molar
MMP	Metaloproteinasas
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
ng	Nanogramos
NK	Natural Killer
pb	Pares de Bases
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PM	Peso molecular
PE	Preeclampsia
PEE	Preeclampsia-Eclampsia
PP	Proteína Placenta
rpm	Revoluciones por minuto
seg.	Segundos
T	Timina
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
V	Volts
X²	Chi cuadrada

RELACIÓN DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores del Gen PLAC9.....	37
Cuadro 2. Condiciones de amplificación para PCR.....	37
Cuadro 3. Amplificación de PCR con BigDye.....	41
Cuadro 4. Características de la población estudiada y significancia de la diferencia de medias con t de Student.....	44
Cuadro 5. Porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia y significancia de la diferencia de proporciones con la prueba t de Student Exón 2.....	45
Cuadro 6. Porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia y significancia de la diferencia de proporciones con la prueba t de Student Exón 3.....	46
Cuadro 7. Porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia y significancia de la diferencia de proporciones con la prueba t de Student Exón4.....	46
Cuadro 8. Números de individuos por sexo que presentarán variaciones nucleótídicas.....	47
Cuadro 9. Cambios encontrados por exón y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2. Exón 2.....	48
Cuadro 10. Cambios encontrados por exón y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2. Exón 3.....	48
Cuadro 11. Cambios encontrados por exón y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2. Exón 4.....	49
Cuadro 12. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 2. Casos.....	50

Cuadro 13. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 2. Controles.....	51
Cuadro 14. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 3. Casos.....	54
Cuadro 15. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 3. Casos.....	55
Cuadro 16. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 3. Controles.....	56
Cuadro 17. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 4. Casos.....	60
Cuadro 18. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas. Exón 4. Controles.....	61
Cuadro 19. Diferencia entre Alelos y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2.....	63
Cuadro 20. Diferencia entre Alelos y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2.....	64

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Arterias espirales en la placentación normal y anormal.....	17
Figura 2. Conformación exonica del Gen PLAC9.....	24
Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	26
Figura 4. Secuenciación automática.....	28
Figura 5. Electroforesis de DNA.....	36
Figura 6. Electroforesis de PCR. Exón 1.....	38
Figura 7. Electroforesis de PCR. Exón 2.....	38
Figura 8. Electroforesis de PCR. Exón 3.....	39
Figura 9. Electroforesis de PCR. Exón 4.....	39
Figura 10. Producto de PCR purificado.....	40
Figura 11. Diagrama de flujo. Muestras secuenciadas.....	41
Figura 12. Diagrama de flujo. Selección de participantes.....	43
Figura 13. Electroferogramas de los cambios nucleotidicos del exón 2.....	52
Figura 14. Electroferogramas de los cambios nucleotidicos del exón 3.....	57
Figura 15. Electroferogramas de los cambios nucleotidicos del exón 4.....	62

RESUMEN

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN PLAC9 ASOCIADO A INVASIÓN TROFOBLÁSTICA COMO PROBABLE MARCADOR PREDICTIVO PARA EL DESARROLLO DE PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA

OBJETIVO. Identificar las variaciones nucleotídicas exónicas del gen PLAC9 de las pacientes con y sin preeclampsia-eclampsia y su pareja.

MATERIAL Y MÉTODOS. Diseño de casos y controles. El grupo de casos se integró por 20 mujeres embarazadas con preeclampsia-eclampsia y su pareja y el grupo control por 20 mujeres con embarazo normoevolutivo y su pareja. Los criterios de exclusión fueron hipertensión arterial crónica, hipertensión arterial crónica más preeclampsia o hipertensión transitoria. Se obtuvieron datos clínicos de la población estudiada. Se realizó extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación automatizada de los 4 exones del Gen PLAC9

RESULTADOS. En el grupo de casos la presión arterial sistólica y diastólica fue mas alta (158.5 ± 16.31 vs 112.5 ± 6.57 , $p < 0.0000$), (105.3 ± 13.71 vs 70.4 ± 4.76 , $p < 0.0000$) respectivamente. En las semanas de gestación se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos (34.3 ± 4.72 vs 39.7 ± 1.07 , $p < 0.000015$). Se encontraron variaciones nucleotídicas en los exones 2, 3, 4 en 29 sujetos presentandose mayor número de variaciones en el grupo de casos con respecto al grupo control así como también mayor número de mujeres en el grupo de casos con variaciones nucleotídicas que su pareja y el grupo control y su pareja. Se encontraron un total de 43 variaciones 13 en el exón 2, 17 en el exón 3 y 13 en el exón 4 de las cuales 33 se encuentran en el grupo de casos y 10 en el grupo de controles con diferencias significativas entre los grupos para cada exón. Solo se obtuvieron 2 variaciones repetidas, el resto de las variaciones solo se presentó una vez.

CONCLUSIONES. Se encontraron 43 variaciones no descritas previamente. Estas variaciones serán depositadas en la base de datos del NCBI. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados en relación al número de cambios nucleotídicos para los exones 2 y 3. De los pacientes analizados solo dos sujetos compartieron una variación; las variaciones restantes fueron únicas por lo que no se puede atribuir la presencia de la enfermedad a estos cambios

Palabras claves: Preeclampsia-eclampsia, Gen PLAC9, Variaciones nucleotídicas

ABSTRACT

MOLECULAR STUDY OF PLAC9 GENE ASSOCIATED TO TROPHOBLAST INVASIVENESS, AS A PROBABLE PREDICTIVE MARKER FOR PREECLAMPSIA- ECLAMPSIA DEVELOPMENT

AIM. To identify PLAC9 gene nucleotide exonic variations on affected and unaffected patients with preeclampsia-eclampsia.

METHODS AND MATERIALS. Case-control design. Cases group was integrated by 20 preeclamptic patients and their respective couple, control group by 20 women with normoevolutive pregnancy and their respective couple. Exclusion criteria included chronic hypertension, chronic hypertension plus preeclampsia and transient hypertension. Clinical data from studied population were collected. DNA extraction, PCR amplification and automated sequencing for 4 exons in the whole studied population were performed.

RESULTS. Systolic (158.5 ± 16.31 vs 112.5 ± 6.57 , $p < 0.0000$) and diastolic (105.3 ± 13.71 vs 70.4 ± 4.76 , $p < 0.0000$) blood pressure values were higher for cases group compared with control group. Statistically significant differences between groups were also found for gestational age (34.3 ± 4.72 vs 39.7 ± 1.07 , $p < 0.000015$). Nucleotide exonic changes were detected for exons 2, 3 and 4 on 29 subjects with a higher number of variations on cases group regard controls. The greatest number of nucleotide changes were found in women belonging to cases group. A total of 43 variations were found, 13 on exon 2, 17 on exon 3 and 13 on exon 4, distributed as follows: 33 on cases group and 10 on control groups, with significant differences for each of the analyzed exons. The same variation was only found in two individuals, the remaining were unique variations.

CONCLUSIONS. Forty three variations non described previously were found. These will be submitted to NCBI database. Statistically significant differences were found on studied groups, regard the number of nucleotide changes on exons 2 and 3. Only two studied subjects share a nucleotide variation, the remaining were unique, implying that it is not possible to establish a relationship between those changes and the disease.

Key words: Preeclampsia-eclampsia, PLAC9 gene, nucleotide variations.

I. INTRODUCCION

Los trastornos hipertensivos del embarazo constituyen un factor de riesgo para la morbimortalidad materna fetal en la población mundial incluyendo nuestro país. Según las estadísticas reportadas por el grupo de trabajo del Programa de Educación Nacional de la Hipertensión en el Embarazo indica que los trastornos hipertensivos del embarazo son la tercera causa de mortalidad materna, representando el 15% de las muertes relacionadas con el embarazo. Los trastornos hipertensivos del embarazo son un grupo de padecimientos cuya importancia se refleja en los altos índices de morbimortalidad materno fetal que representan del 7 al 10% de todos los embarazos.

Las enfermedades hipertensivas del embarazo fueron clasificadas en el año 1972 por el Colegio Americano de Ginecólogos y Obstetras siendo ampliamente aceptada, utilizada y revisada en la literatura mundial en 1996. En el año 2000 el grupo de trabajo sobre la hipertensión en el embarazo de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos propuso otra clasificación la cual es: hipertensión gestacional, hipertensión crónica, preeclampsia asociada a hipertensión crónica y preeclampsia.

La preeclampsia es la complicación médica mas frecuente del embarazo, es la principal causa de morbimortalidad materno-fetal constituyendo el 40% de partos prematuros, con 15% de morbilidad hospitalaria en general, con una incidencia en México hasta del 8%. En la ciudad de Durango en al año 2007 se reportaron 213 defunciones asociadas a enfermedades hipertensivas en general (1-13).

La preeclampsia se caracteriza por 3 criterios que son hipertensión arterial, proteinuria y edema mismos que aparecen después de las 20 semanas de gestación. La preeclampsia a su vez se clasifica en leve, grave o severa, eclampsia y síndrome HELLP (14-30).

Existen varios factores asociados al desarrollo de la enfermedad. La placenta es un órgano indispensable para el desarrollo de la preeclampsia, de origen fetal con

haplotipos y determinantes genéticos de origen materno y paterno tal es el caso de la mola hidatiforme que es una enfermedad trofoblástica gestacional en la que no hay desarrollo embrionario, tiene desarrollo exclusivamente placentario y es de origen cromosómico paterno es por ello que se justificó estudiar al papá (30-33).

La preeclampsia es considerada la enfermedad de las teorías ya que existen varias para explicar la génesis de la enfermedad. Estas se centran en una respuesta inflamatoria incrementada, alteraciones inmunológicas y predisposición genética mismos que están asociados con la disminución de la invasión trofoblástica que es el factor de inicio de la enfermedad y que conduce a anomalías en las arterias espirales uterinas por las células citotrofoblasticas extravelosas que producen un sistema vascular de alta resistencia (34-65).

Se han desarrollado modelos animales que semejan un fenotipo preclamptico idéntico al de la mujer, se estudiaran 15,000 genes en tejidos placentarios y embrionarios murinos con el objeto de determinar su especificidad, caracterizarlos y hacerlos blanco de estudio, se aislaron dos de estos genes placenta específicos Plac8 y Plac9 que presentan genes homologos en humanos PLAC8 Y PLAC9 (77-86)

Plac9 tiene poca conservación evolutiva, con una similitud de secuencia respecto al gen en humano de 73%. El análisis de expresión de este gen, reveló exclusivamente, la presencia de genes homólogos en placentas de rata y hámster lo que lo hace un gen de reciente aparición evolutiva y con ello más específico en su función placentaria (86)

PLAC9 es un gen placenta específico, recién identificado y caracterizado a través de microarreglos y estudios de expresión, esta localizado en la posición 22.3 del brazo largo del cromosoma 10, tiene 4 exones y 104 SNP's de los cuales solo se han identificado 2 en región codificante (86-88).

La Identificación de los factores de riesgo genético, o de una población con un riesgo excepcionalmente alto de la enfermedad, podría ayudar considerablemente en la comprensión de este importante problema de salud pública y dar pistas para la prevención o tratamiento de la preeclampsia eclampsia.

II. ANTECEDENTES

La hipertensión durante el embarazo constituye un factor principal de riesgo para la mortalidad materna así como para el deterioro y mortalidad fetal en la población mundial en general (1) incluyendo nuestro país. Las estadísticas reportadas a partir de la segunda reunión del grupo de trabajo del Programa de Educación Nacional de la Hipertensión en el Embarazo (2) indican que los desórdenes hipertensivos en la gestación son la tercera causa de mortalidad materna. Representan el 15% de las muertes relacionadas con el embarazo (2) y ocurren de 3 a 10% de todos los embarazos (3). Es más probable que ocurra preeclampsia en ambos extremos de la edad reproductiva pero es mas frecuente en mujeres menores de 20 años de edad (4).

Otro estudio en el año 2001 muestra que los índices de morbimortalidad materno-fetal representan del 7 al 10% de todos los embarazos (5-6).

En el año 2007 la Secretaria De Salud en el Estado de Durango reportó 213 defunciones por enfermedades hipertensivas con una tasa de 13.61/100,000 habitantes. Una defunción por preeclampsia con una tasa de 0.35/10,000 habitantes y 3 defunciones por eclampsia con una tasa de 1.06/10,000 habitantes.

2.1 Clasificación de los trastornos hipertensivos del embarazo

La clasificación de los trastornos hipertensivos fue establecida en el año de 1972 por el American College of Obstetritians and Gynecologist y se clasificaron en cuatro grupos como sigue:

- A. **Hipertensión de inicio reciente y/o proteinuria en el embarazo:** **1.** Hipertensión gestacional (sin proteinuria); **2.** Proteinuria gestacional (sin hipertensión) y **3.** Preeclampsia (hipertensión con proteinuria).

- B. Hipertensión crónica y enfermedad renal:** 1. Hipertensión crónica sin proteinuria; 2. Enfermedad renal crónica (proteinuria con y sin hipertensión) y 3. Hipertensión crónica con preeclampsia agregada.
- C. No clasificadas:** 1. Hipertensión y/o proteinuria que aparezcan después de la semana 20 de gestación; 2. Como el inciso anterior, cuando se nota por primera vez durante el embarazo, labor o puerperio y si hay antecedentes insuficientes que permitan el diagnóstico para las categorías A y B.
- D. Eclampsia:** Presentación antenatal en labor o en el puerperio (7).

Sin embargo esta clasificación fue modificada en el año 2000 por el National High Blood Pressure Education Program Working Group (NHBPEPWG), el cual clasifica a la hipertensión en el embarazo como sigue:

Hipertensión gestacional: Hipertensión que aparece después de la segunda mitad del embarazo o las primeras 24 horas post-parto sin otros signos de preeclampsia.

Preeclampsia-eclampsia: Hipertensión que aparece después de las 20 semanas de gestación en combinación con proteinuria y/o edema anormal, la eclampsia detona el desarrollo de convulsiones o coma sin otra causa identificable.

Hipertensión crónica: Hipertensión que antecede al embarazo, que se presenta antes de las 20 semanas de gestación o después de 6 semanas post-parto.

Preeclampsia asociada a hipertensión crónica: Desarrollo de preeclampsia-eclampsia, con hipertensión crónica preexistente (8).

De dichos trastornos, la **preeclampsia** es la que presenta un mayor índice de morbimortalidad a nivel mundial, pues en países desarrollados como Inglaterra, la incidencia de las complicaciones secundarias es de 4.9 por 10000 nacidos vivos (9). Un importante factor de riesgo para desarrollar preeclampsia es el primer embarazo (10-11). Varios investigadores han demostrado que la incidencia de preeclampsia en

mujeres multíparas es menor que en las primíparas, sin embargo se eleva si las mujeres multíparas tienen una pareja diferente (12-13)

La preeclampsia es un estado hipertensivo que complica exclusivamente al embarazo humano caracterizado por la gradual aparición de hipertensión, proteinuria y edema anormal de la semana 20 en adelante incluyendo el puerperio (14). Se trata de un síndrome hipertensivo donde la hipertensión es el signo cardinal principal y el edema y la proteinuria son datos secundarios de la enfermedad (15).

El síndrome de preeclampsia y eclampsia se conoce desde hace más de 2,000 años, siendo identificado en la antigüedad por los egipcios y los chinos. El cuadro clínico fue descrito gráficamente por Hipócrates.

Durante la segunda mitad del siglo XIX y hasta los dos o tres primeros decenios del siglo XX, la toxemia como también se denominó, se confundió con glomerulonefritis. Durante el mismo periodo también se efectuaron varios estudios de vigilancia, y casi todos los autores informaron de “nefritis crónica” como secuela de la enfermedad. Sin embargo, en 1927, Corwin y Eric destacaron que la glomerulonefritis era poco frecuente en la gestación y que la lesión concomitante con eclampsia era principalmente vascular y no renal. Este hecho fue destacado por Reid y Tell, y por Eric y Tilman en 1939 y 1935 respectivamente.

La preeclampsia- eclampsia es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad perinatal. El origen es desconocido y se han emitido muchas teorías y señalado diversos factores para explicarla pero ninguna se ha confirmado.

La primera descripción de efectos en la coagulación y microtrombos en una paciente embarazada fue descrita por Schmorl en 1993 y en 1992 Stanke informó de la presencia de trombocitopenia y hemólisis en un caso de eclampsia. En 1954 Pritchard comunicó la presencia de hemólisis, trombocitopenia, y otras anomalías hematológicas asociadas a la enfermedad hipertensiva del embarazo.

Goodlin en 1982 describió en un grupo de pacientes con hipertensión y embarazo con cambios hematológicos y elevación de enzimas hepáticas. Se acuñó el acrónimo de HELLP para llamar la atención de la gravedad del problema considerándolo una entidad diferente de la preeclampsia severa. En 1990 después de varios estudios realizados por diferentes autores, Sibai unificó y normó los criterios clínicos y de laboratorio para el diagnóstico de este síndrome (16).

La preeclampsia es la causa más frecuente de mortalidad materno fetal en México, también es causa frecuente de crecimiento intrauterino retardado y prematuridad de los productos. Se define como un síndrome que se presenta por lo general después de las 20 semanas de gestación (o antes en caso de enfermedad trofoblástica, mola o embarazo gemelar), se caracteriza por aumento de la presión sanguínea acompañada de proteinuria y edema. La elevación de la presión arterial durante la gestación se define como la presión arterial sistólica mayor a 140 mmHg y la diastólica a 90 mmHg en mujeres previamente normotensas. La proteinuria se define como la excreción de orina de 300 mg de proteínas o más, en una colección de orina de 24 horas. Esta cifra generalmente se correlaciona con 30 mg/dl (una cruz en el dipstick) en una determinación en un examen general de orina. El edema es el incremento de peso de 500 gramos por semana, hinchazón en manos, cara o generalizada. Además de la hipertensión, proteinuria y edema puede haber manifestaciones clínicas como cefalea, visión borrosa y dolor abdominal, así como alteraciones en exámenes de laboratorio como baja cuenta de plaquetas menor a $100,000\text{cm}^3$ y enzimas hepáticas elevadas (17-19).

De acuerdo al estado fisiológico de la paciente, la enfermedad se clasifica de la manera siguiente:

Preeclampsia leve: con cifras de tensión arterial sistólica de 140-160mmHg y una diastólica de 90-110mmHg, o bien elevación de más de 15 mmHg sobre las cifras basales de TA sistólica y de más de 10 mmHg para la TA diastólica, proteinuria de 2 a 5 gramos en 24 horas, edema o incremento rápido de peso sin evidencia de edema.

Preeclampsia grave o severa: con cifras de tensión arterial sistólica de mas de 160-180 mmHg y la diastólica de mas de 110 mmHg, proteinuria >5g/24 horas, edema, cefalea, dolor epigástrico (4). Esta enfermedad puede desarrollar complicaciones tales como la **eclampsia** en la que además de los criterios anteriores se presentas convulsiones de difícil control y **síndrome HELLP**, acrónimo que identifica la hemólisis con enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia (20).

La preeclampsia se resuelve después del parto, que es actualmente el único tratamiento existente definitivo.

2.1.1 Eclampsia

El termino eclampsia proviene del griego antiguo traducido como “relámpago”. Se acuñó para describir la presencia súbita de episodios convulsivos en pacientes embarazadas y fue introducido por primera por Sauvage en 1739 vez en su tratado de obstetricia como *Eclampsia parturientum*. Se define como el inicio de convulsiones o coma en una mujer que tiene datos previos de preeclampsia severa (21)

La eclampsia es una forma extremadamente grave de la preeclampsia, por lo que se constituye en una de las entidades patológicas de los cuadros hipertensivos del embarazo de alto riesgo obstétrico. Se hace difícil comprender lo que es la eclampsia sin estudiar previamente la preeclampsia, por que la eclampsia se caracteriza por la aparición de convulsiones o coma no causadas por alguna enfermedad neurológica coincidente en una paciente con preeclampsia, sin estar estrictamente relacionado con la gravedad ya que pueden aparecer abruptamente las convulsiones incluso existiendo pocos signos de preeclampsia (22). La eclampsia se observa en el 0.2-0.5% de todos los nacimientos y puede complicar hasta el 1.5% de los embarazos gemelares (22-23). La eclampsia se produce en la fase de anteparto en 46.3% de los casos, intraparto en un 16.4% y posparto en un 37.3%. La eclampsia constituye un severo trastorno multisistémico causado por intensa vasoconstricción e hipertensión, a la que se puede agregar coagulación en vasos pequeños. Los hallazgos *post-*

morten en pacientes que han fallecido después de presentar eclampsia demuestran alteraciones severas a nivel de parénquima renal, cerebral, hepático, siendo las más importantes el edema y la hemorragia cerebral (22-25).

2.1.2 Síndrome HELLP

El síndrome HELLP es un trastorno severo del estado grávido-puerperal, reconocido en relación con las formas graves de preeclampsia y eclampsia, que ha sido también considerada una preeclampsia “atípica” (26). El crédito e informe original se atribuye al norteamericano Louis Weinstein, quien el 15 de mayo de 1981 lo sometió a revisión y en enero de 1982 publicó la observación de los primeros 29 casos diagnosticados en pacientes preeclámpticas y eclámpticas con el acrónimo HELLP, que se integra por **H** para hemolisis, **EL** para enzimas hepáticas elevadas y **LP** para disminución de plaquetas (27). Los estudios de la función plaquetaria en preeclampsia sugieren una activación incrementada, reducción en su número y acortamiento en su vida media. La trombocitopenia, definida generalmente por una cuenta plaquetaria menor de 150,000 mm³, ocurre solo en aproximadamente 15% de mujeres con preeclampsia asociada al síndrome HELLP y en total 5 a 8% de mujeres preeclámpticas en quienes no se desarrolla el síndrome HELLP (28). El riesgo principal para desarrollar complicaciones hepáticas significativas ocurre también cuando la preeclampsia está asociada a síndrome HELLP. Aproximadamente 20% de la mortalidad materna en preeclampsia se debe a complicaciones hepáticas (29).

2.2 Placenta

La placenta es un órgano temporal, que desempeña las funciones de varios órganos de adultos para el feto en crecimiento. La placenta es diseñada exclusivamente para el intercambio de oxígeno, nutrientes, anticuerpos, hormonas, productos de desecho entre la madre y el feto y puede llevar información valiosa sobre el embarazo.

Aunque la placenta después del parto es uno tejidos humanos más fácilmente accesibles del humano, generalmente es desechada después de una evaluación superficial (30). Varios trastornos del embarazo, incluyendo la preeclampsia y parto prematuro están relacionados con la patología de placentaria. Además los estudios epidemiológicos sugieren que hay un origen feto-placentario que predisponen a los adultos a las enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas (31). El órgano indispensable en el síndrome preeclampsia es la placenta. Este órgano es de origen fetal y al igual que el feto, tiene haplotipos y determinantes genéticos de origen tanto materno y paternos. La preeclampsia puede ocurrir solamente cuando hay un exceso de estos últimos, aun sin la presencia de feto como en la degeneración hidrópica de la placenta (embarazo molar) y en el embarazo multifetal. Al respecto, las mujeres con gestaciones múltiples como ocurre en embarazos gemelares o de trillizos tienen mayor probabilidad de desarrollar preeclampsia, al igual las mujeres con embarazo molar completo y parcial, debido a un incremento en la masa trofoblástica (32-33).

2.3 Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos han permitido identificar poblaciones de riesgo de preeclampsia que pueden permitir acciones de salud en el nivel primario de atención desde antes de la concepción. Algunos autores destacan que hasta el momento no existe ninguna medida capaz de prevenir la preeclampsia y que un control prenatal adecuado y periódico solo ofrece la ventaja del diagnóstico temprano y en consecuencia un tratamiento oportuno.

Los autores han identificado como pacientes de riesgo de la enfermedad Primigestas

- Edad
- Herencia: madre o hermana con historia de preeclampsia
- Embarazo gemelar

- Obesidad
- Diabetes
- Hipertensión crónica
- Insuficiencia renal (34).

La incidencia de la preeclampsia es aproximadamente del 10% de todos los embarazos, y dentro de su patología se ha propuesto como característica general y pivote la disfunción endotelial (34).

2.4 Complicaciones

2.4.1 Complicaciones maternas

Entre las complicaciones más frecuentes al momento del nacimiento en la mujer con preeclampsia-eclampsia se incluyen: hemorragia masiva abrupto placentaria, CID, edema agudo pulmonar, sangrado postoperatorio y retraso en la cicatrización de la herida.

Las complicaciones son mas graves si la preeclampsia es severa o si ocurre eclampsia o síndrome HELLP. Se ha reportado que las mujeres con eclampsia tienen el riesgo de presentar abrupto placentario en 10% y síndrome HELLP en 11%, 6% de riesgo de desarrollar CID, 6% para déficit neurológico, 7% de riesgo de neumonía por aspiración, 5% para edema pulmonar (35)

Esta situación obliga a retomar la información existente y programar la investigación básica experimental y clínica enfocándola a la etiología de la enfermedad desde el punto de vista molecular con aplicación práctica.

2.4.2 Complicaciones fetales

Las complicaciones fetales en preeclampsia son el resultado de abrupso placentario, inadecuada perfusión placentaria o de prematuridad por un parto pretérmino.

La frecuencia de complicaciones fetales correlaciona en forma directamente proporcional con el grado de severidad de la preeclampsia y es más alta que la observada en mujeres crónicamente hipertensas con similares grados de elevación de la presión sanguínea (36). En 1976, Friedman y Neff demostraron que la mortalidad fetal estaba asociada a la elevación de la TA diastólica así como el grado de proteinuria materna.

Los fetos de mujeres con preeclampsia frecuentemente tienen retraso en el crecimiento y son pequeños al nacimiento para su edad gestacional. Esto es el resultado de la hipoperfusión de la placenta debido a la contracción del volumen intravascular y al pobre crecimiento placentario. Varios investigadores han demostrado con el método de óxido nítrico que el flujo sanguíneo hacia el útero en la mujer embarazada normal es de 500 a 700 mL/min. Y que se encuentra disminuido de 2 a 3 veces en las pacientes con preeclampsia (37). La preeclampsia es un factor de riesgo significativo para abrupso placentario lo cual produce una depleción aguda de oxígeno y nutrientes hacia el feto además de desencadenar un trabajo de parto prematuro y por necesidad de la interrupción urgente del embarazo. Además, como se ha comentado, preeclampsia es un factor de riesgo determinante para la presentación del compromiso neurológico fetal (38).

2.5 Etiología

La causa de preeclampsia- eclampsia es aún desconocida. A pesar de extensas investigaciones no ha surgido una hipótesis unificadora que explique satisfactoriamente la enfermedad. A lo largo de los años se han enunciado una serie

de teorías. Chesley denominó a la preeclampsia como la “**enfermedad de las teorías**” citándose entre otras:

- Fenómeno inmunológico
- Isquemia útero placentaria.
- Factores dietéticos
- Disfunción endocrina
- Susceptibilidad genética
- Reflejo de estiramiento uterino

Muchos de los mecanismos fisiopatológicos que culminan en la aparición de la entidad clínica llamada preeclampsia no se han explicado. El cuadro suele ceder rápidamente después del parto. De ese modo, la invasión deficiente del trofoblasto constituye la fuente del agente o agentes que desencadenan la enfermedad (39). La preeclampsia aparece preferentemente en el primer embarazo o en embarazos con un nuevo cónyuge (39-40).

Es probable que pueda haber varias causas y condiciones predisponentes con efectos individuales y/o combinados que resulten en un grupo común de signos y síntomas a los que llamamos preeclampsia. El vasoespasmo, la hiperreactividad vascular y la disfunción endotelial pueden ser la vía final común de los diferentes mecanismos fisiológicos que producen la enfermedad (40).

2.5.1 Fisiopatología de la preeclampsia

Se han desarrollado varias teorías que tratan de explicar el origen de los síndromes hipertensivos del embarazo y se acepta hoy en día que sea multifactorial (41)

Friedman ha desarrollado una teoría que se basa en el daño a las células endoteliales, que en opinión de los autores aparecen en todos los casos de preeclampsia (42). Se desconoce la causa exacta de dicho daño, pero se piensa que el trofoblasto con deficiencia de riego sanguíneo produce un agente que es tóxico para las células endoteliales (34).

Se ha visto que el común denominador en la génesis de la preeclampsia es un fenómeno conocido como “placentación anormal” y en particular la ausencia de la dilatación de las arteriolas espirales uterinas. En base a estudios histopatológicos de biopsias del lecho placentario en mujeres con embarazo normal y mujeres con preeclampsia se ha documentado que existe una invasión anormal de las células placentarias hacia el endotelio vascular de las arterias espirales del útero (43-45).

Existen varias teorías para la génesis de la preeclampsia- eclampsia centrada en respuesta inflamatoria incrementada, alteraciones inmunológicas y predisposición genética mismos que están asociados con la disminución de la invasión trofoblástica que es el factor de inicio de la enfermedad que conduce a una anomalía en las arterias espirales uterinas por las células citotrofoblásticas extravelosas que producen un sistema vascular de alta resistencia (46).

Los estudios en gemelos han demostrado que más del 50% de los factores genéticos generan susceptibilidad para que una persona presente preeclampsia (47). Sin embargo y a pesar que se han realizado investigaciones intensivas, la predisposición genética de la preeclampsia es en gran parte desconocida (48-49)

2.5.2 Invasión trofoblástica

Durante el embarazo normal el blastocito en forma temprana debe adherirse e invadir al endometrio uterino para que la sangre materna bañe adecuadamente los cotiledones placentarios. Durante la gestación las células del trofoblasto proliferan importantemente y tienen dos periodos bien definidos en que adquieren mayor

actividad invasiva, penetran y sustituyen al estroma de la decidua, tejido del miometrio y las paredes de las arterias espirales uterinas. Esto ocurre alrededor de la semana 12 (43-45).

Existen evidencias de que hay una transformación vascular por parte de las células del citotrofoblasto que invaden las arterias espirales que se manifiesta por una modulación de la expresión de moléculas de adhesión (50).

En preeclampsia- eclampsia los hallazgos de los estudios sugieren que ocurre una pérdida de la modulación normal de las moléculas de adhesión lo cual ocasiona una invasión vascular incompleta por el citotrofoblasto (51). Esto, entonces, se piensa que conlleva a una dilatación inadecuada de las arteriolas espirales. El nivel de oxigenación de la sangre materna en las arteriolas espirales parece regular también el grado y calidad de la invasión (52). Igualmente el miometrio interno sufre infiltración al menos en su tercio interno por las células trofoblásticas cuya meta final es alcanzar las arteriolas espirales uterinas (53)

Una vez que las células del trofoblasto alcanzan las estructuras de las arteriolas espirales comienzan a migrar hacia el interior de su pared, la invaden y finalmente reemplazan la lámina elástica interna y la capa media del musculo liso (53) lo cual confiere mayor distensibilidad y capacidad de conducir volumen en cantidades altas (hiperperfusión) a presiones muy bajas. Esta característica hace de la placenta una verdadera fístula arterio-venosa que cuenta con un área de superficie muy grande para el suficiente intercambio materno fetal de líquidos, electrolitos, gases y nutrientes (53).

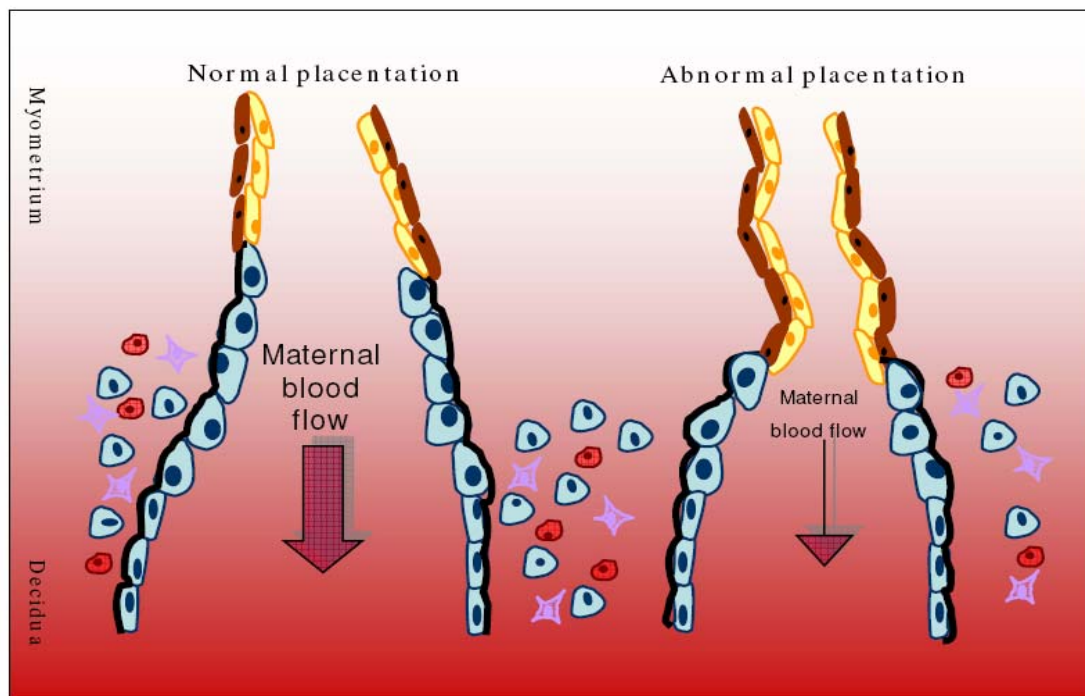
Este cambio vascular, el cual se extiende desde los espacios intravellosos hasta el tercio interno del miometrio se ha denominado “cambio fisiológico” del embarazo y, como se ha comentado, usualmente se completa en la semana 20 de la gestación en condiciones normales (53).

Por otro lado, desde 1972, Brosens y Renaer (54) reportaron la ausencia del cambio fisiológico de los segmentos miometriales de las arterias espirales en la

preeclampsia-eclampsia. Subsecuentemente, la ausencia de los cambios fisiológicos debidos el defecto en la invasión trofoblástica de las arteriolas espirales ha sido postulada como el principal factor etiológico en el desarrollo de preeclampsia-eclampsia.

En el embarazo normal las arterias espirales son transformadas en vasos dilatados de baja resistencia, por sustitución de sus elementos endoteliales y musculares por trofoblastos. La primera ola de invasión trofoblástica se observa en los segmentos deciduales entre las 10 y 16 semanas de gestación y la segunda se advierte en los segmentos miometriales, entre las 16 y 22 semanas. En la preeclampsia la segunda ola de invasión trofoblástica no se manifiesta, es decir, los segmentos miometriales de las arterias espirales siguen siendo musculares, sin dilatación y aun capaces de vasoconstricción. Por tal razón los vasos placentarios no se transforman en un sistema de alto volumen y baja resistencia, explicando la disminución del flujo útero-placentario. La causa por la cual la segunda etapa de migración del trofoblasto no se produce es desconocida. No se sabe si tal invasión no se produce por causas bioquímicas, inmunitarias o genéticas, pero todos los mecanismos mencionados pueden intervenir (34). (Figura 1)

Figura 1. Arterias espirales en la placentación normal y placentación anormal



Las alteraciones de la función trofoblástica pueden ser a diferentes niveles: diferenciación, proliferación, migración, invasión e imitación del fenotipo de las células endoteliales (34). Se ha visto elevación de factores a diferentes niveles del trofoblasto como: angiopoyetinas en migración, factor de crecimiento epidérmico en proliferación, factor de crecimiento de hepatocitos en migración e invasión, metaloproteinasas en invasión así como factor de crecimiento placentario y VEGF en proliferación (55). Estos hallazgos se han reforzado en un estudio de microarreglos que evaluó patrones de expresión en diferentes secciones de placenta humana (56). El VEGF juega un rol importante en la proliferación, migración y regulación de la permeabilidad vascular, este tiene un receptor, el VEGFR también llamado Flt del cual se ha estudiado un polimorfismo dinucleotídico TG a través de secuenciación de DNA en mujeres con y sin preeclampsia donde no se encontraron diferencias alélicas y genotípicas en estas pacientes por lo tanto se concluyó que Flt-1 es un gen que no está asociado con preeclampsia, (57) si bien se ha encontrado que hay una importante elevación de la fracción soluble de su proteína (**sFlt-1**) en el plasma de

las mujeres embarazadas con la enfermedad (58). Datos recientes sugieren que factores anti-angiogénicos pueden ser responsables de los signos clínicos y síntomas de la preeclampsia; las células asesinas naturales (NK) se cree que desempeñan un papel importante en condiciones normales de desarrollo de la placenta y se ha observado recientemente que inducen a los factores angiogénicos y remodelación vascular. Además, estudios genéticos sugieren que la susceptibilidad a la preeclampsia puede verse influida por variaciones polimórficas de HLA-G y ligándose de receptores de células killer (KIR) presentes en células NK (51). También se han encontrado niveles elevados de Leptina en pacientes con preeclampsia (60).

Un importante número de agentes bioquímicos han sido evaluados como marcadores para predecir la preeclampsia, sin embargo ninguno de ellos ha demostrado ser de valor clínico aún. Los más prometedores hasta la fecha, son las proteínas placenta 13 (PP-13), así como (sFlt-1) y endoglina (sEng). Estos marcadores permiten la detección en una etapa relativamente temprana y, lo más importante, muestran valores predictivos relativamente altos y la mejora de rendimiento diagnóstico si se combinan durante el primer trimestre (61).

2.5.3 Fisiopatología y Clínica

La transformación vascular de las arteriolas espirales, mismas que en condiciones de un embarazo normal se inicia en la semana 12 y se completa en la semana 18, no ocurre en preeclampsia-eclampsia. Esto condiciona la persistencia de vasos relativamente estrechos y rígidos que conducen a hipoperfusión e isquemia relativa por presiones altas y turbulencia del torrente sanguíneo que llega a los espacios sinusoidales intravellosos donde ocurre el intercambio materno-fetal de oxígeno, líquidos, nutrientes y diversas sustancias. El resultado final es la privación y sufrimiento de las células a nivel de espacios y por consiguiente del feto (62-63)

La preeclampsia- eclampsia tiene efectos en casi todos los aparatos y sistemas maternos pero preferentemente altera la vasculatura del cerebro, corazón, pulmones, riñón, hígado y sistema de la coagulación (64).

Las alteraciones vasculares en órgano blanco y sus consecuencias hemodinámicas juegan un papel importante en la preeclampsia-eclampsia. La contracción vascular con espasmo segmentario, que ocurre particularmente en las arteriolas, (64) conduce a una alta resistencia del flujo sanguíneo y a presiones arteriales altas. El daño endotelial promueve la fuga del líquido intravascular y de proteínas a los espacios intersticiales lo cual conduce a un volumen circulatorio efectivo reducido (65).

2.5.4 Factores angiogénicos

Aunque se han descrito una gran cantidad de factores angiogénicos, se cree que los principales factores involucrados en este proceso son el crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y las proteínas de la familia de angiopoyetina. Estudios recientes sugieren que el VEGF y el FGF son los principales factores de crecimiento angiogénico en la placenta (66-67).

El VEGF es una proteína homodimérica que actúa fundamentalmente a nivel de las células endoteliales induciendo cambios en la expresión génica de la célula, en su forma, estimulando su división y migración, y aumentando los niveles de calcio intracelulares. Es un potente agente mitógeno en las células endoteliales de la micro y macrovasculatura de arterias, venas y vasos linfáticos. Es considerado como un mitógeno específico para las células endoteliales pues carece de actividad en cualquier otro tipo celular, promueve la vasculogénesis, la angiogénesis e induce la expresión de activadores del plasminógeno como la uroquinasa y el factor tisular (63). El PlGF fue el primer factor de la familia del VEGF en ser identificado, esta proteína se expresa sólo en el trofoblasto veloso (64).

El FGF estimula la proliferación de las arterias espirales uterinas y de las arterias fetales placentarias (66).

2.5.5 Receptores membranales

Los principales receptores celulares involucrados en el inicio de la transducción de señales en respuesta al estímulo del VEGF, son los receptores de la familia tirosin kinasa, éstos son Flt-1 (65), en el suero de la mujer gestante y en los vasos umbilicales se ha identificado una forma soluble de Flt-1 cuya acción, según se ha demostrado, es la de inhibir los efectos del VEGF por lo que es considerada una proteína antiangiogénica (66)

2.5.6 Factores angiogénicos y antiangiogénicos en la preeclampsia

Diversos estudios desde 1995 a la fecha han demostrado que el sFlt-1 se encuentra elevado en la placenta y suero de mujeres con preeclampsia. Esta proteína se adhiere al dominio del receptor del VEGF, lo que impide su interacción con los receptores de membrana de las células endoteliales, que eventualmente conduce a disfunción endotelial. Se han asociado niveles elevados de sFlt-1 con disminución de las concentraciones sanguíneas de VEGF durante la preeclampsia clínica e inclusive antes de su presentación. Además se ha demostrado que la administración exógena de sFlt-1 a ratas embarazadas induce hipertensión, proteinuria y glomeruloendoteliosis, fenómenos también reportados en pacientes con cáncer que han sido tratados con inhibidores del VEGF. Todas estas observaciones sugieren que el exceso de sFlt-1 puede tener un papel fundamental en la fisiopatología de la preeclampsia. La concentración de sFlt-1 disminuye rápidamente después del parto, lo que apoya el concepto del origen placentario de la preeclampsia (67).

En los últimos años se ha demostrado que la forma soluble de endoglina (sEng) (que es una forma de la endoglina placentaria), genera un aumento de la permeabilidad vascular e hipertensión arterial en el embarazo. Además la endoglina soluble se ha

relacionado con el sFlt-1, (ambas proteínas antiangiogénicas), que a través de mecanismos diferentes, se combinan para producir disfunción endotelial y preeclampsia severa (68-70).

2.6 Enfermedad trofoblástica gestacional

Se refiere a un grupo de anomalías en las cuales crecen tumores dentro del útero de una mujer (71-72). Es un conjunto de procesos benignos y malignos poco habituales, derivados de una proliferación anormal del trofoblasto de la placenta humana y del genoma paterno, con una contribución materna ocasional; incluye la mola hidatiforme (73)

La mola hidatidiforme es un producto de la concepción que se caracteriza por una hiperplasia trofoblástica y por la tumefacción edematosa de las vellosidades coriónicas, cuyo diámetro oscila entre 0,1 y 3cm, adquiriendo la morfología de bandas y cúmulos de vesículas, que confieren el típico aspecto de racimo de uvas (74). La primera descripción exacta de mola hidatidiforme es el medico español Cristobal de Vega en el año de 1564 (65). En 1977 Kaji y Cols. Determinaron el origen paterno de la mola hidatidiforme (75)

La mola hidatidiforme tiene cromosomas solo de origen paterno exclusivamente, induciendo una intensa respuesta inmunológica de la madre. La presencia de dos juegos de cromosomas paternos en una mola hidatiforme origina el fallo en el desarrollo embrionario y favorece la proliferación del trofoblasto (76)

2.7 Modelos animales en el estudio de la preeclampsia

De esta manera, podemos ver que la búsqueda de factores etiológicos puede hacerse a varios niveles, desde el proceso mismo de la invasión trofoblástica, hasta la alteración de las células endoteliales, proceso que puede considerarse una consecuencia más que una causa directa.

Existen muchos tratados que explican con precisión las características de la placenta y en los últimos años comienzan a comprenderse los mecanismos de regulación genética de dichas funciones (70, 77-79).

El embarazo, tanto en el ratón como en el humano presenta condiciones muy semejantes por su desarrollo fisiológico (80); sin embargo, la preeclampsia-eclampsia es una enfermedad exclusiva (en forma natural) del ser humano, aunque existen varios modelos animales (“preeclampsia-like”) entre los que destaca un ratón transgénico, mismo que ha simulado el fenotipo de la enfermedad. En este caso, se introdujo un gen de renina humano en el ratón macho y un gen de angiotensinógeno humano en la hembra, con lo que el ratón hembra desarrollo un fenotipo idéntico al de una mujer preecláptica, mismo que se resolvió tal como ocurre en el ser humano al retirar el aloinjerto placentario (81). Interesantemente, se notó que la renina presentaba un patrón de impronta muy particular a nivel de la placenta en la ratona, por lo que una teoría reciente supone la presencia de eventos de impronta genómica para su desarrollo.

Por otro lado, se encuentran otros modelos animales que semejan un fenotipo preecláptico: los ratones transgénicos $p57^{kip2}$ (82), ratas sometidas a tratamiento con bajas dosis de endotoxina (83), y ratonas embarazadas sometidas a tratamiento con Flt1 soluble (84).

La utilidad de evaluar genes nuevos caracterizados en otras especies, parece ser una estrategia promisoría para la caracterización de dichos genes en el humano, además de conocer su expresión tanto a nivel normal como patológico. Es así que el desarrollo de la genómica juega un papel importante en el desarrollo de tecnología que facilita la caracterización de múltiples genes en ensayos simples con el consecuente ahorro de tiempo, dinero y esfuerzo; Tal es el caso de los microarreglos, los que han permitido establecer la expresión génica diferencial entre dos o más tejidos de interés.

Un ejemplo son los estudios de microarreglos llevados a cabo en el Laboratorio de Genética del Instituto Nacional del Envejecimiento de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos, realizado por Tanaka y cols. en el año 2000, donde se estudiaron simultáneamente más de 15000 genes en tejidos placentarios y embrionarios murinos con objeto de determinar la especificidad de algunos de ellos en uno u otro tejido, caracterizarlos y hacerlos blanco de estudio (85). La expresión placenta-específica de algunos de estos genes permitió considerarles para un estudio más extenso con la intención de demostrar la mencionada especificidad tisular. Así fueron aislados dos nuevos genes placenta-específicos en ratón, Plac8 y Plac9 que presentan genes homólogos en humanos PLAC8 y PLAC9 (86).

El gen Plac9 tiene poca conservación evolutiva, con una similitud de secuencia respecto al gen en humano de 73%. El análisis de expresión de este gen, reveló exclusivamente, la presencia de genes homólogos en placentas de rata y hámster lo que lo hace un gen de reciente aparición evolutiva y con ello más específico en su función placentaria (86). La hibridación *in-situ* de Plac9 reveló sólo parcialmente la expresión de este gen en el laberinto de la placenta murina (análoga al citotrofoblasto veloso humano) (observaciones no publicadas).

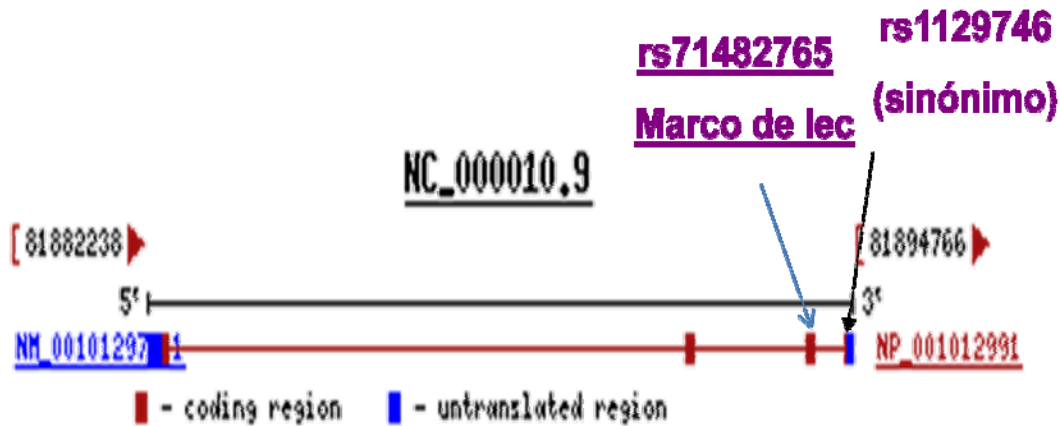
2.8 Gen PLAC9

El gen PLAC9 en el humano es un gen placenta-específico, recién identificado y caracterizado a través de microarreglos y estudios de expresión, tiene 4 exones y splicing alternativo 4a y 4b. Tiene 104 polimorfismos de nucleótido único (SNPs), se encuentra localizado en el cromosoma 10q22.3 en el humano, homólogo de una secuencia localizada en el cromosoma 14 del ratón donde presenta un patrón de expresión importante en la porción laberíntica de la placenta murina, análoga a las vellosidades coriales del humano (87).

Muchos marcadores en diferentes genes se han ensayado tratando de encontrar uno asociado consistentemente con la preeclampsia-eclampsia (86), sin embargo, los

resultados han sido contradictorios. Dados los eventos fisiopatológicos de la PE, resulta entonces lógico hacer un abordaje de estudio de los genes involucrados en el proceso de la invasión trofoblástica, como las metaloproteinasas MMP2 y MMP9, que han sido estudiadas en pacientes con PE (88).

Figura 2. Conformación exónica del Gen PLAC9



http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=219348

2.9 Métodos de identificación de mutaciones

2.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa

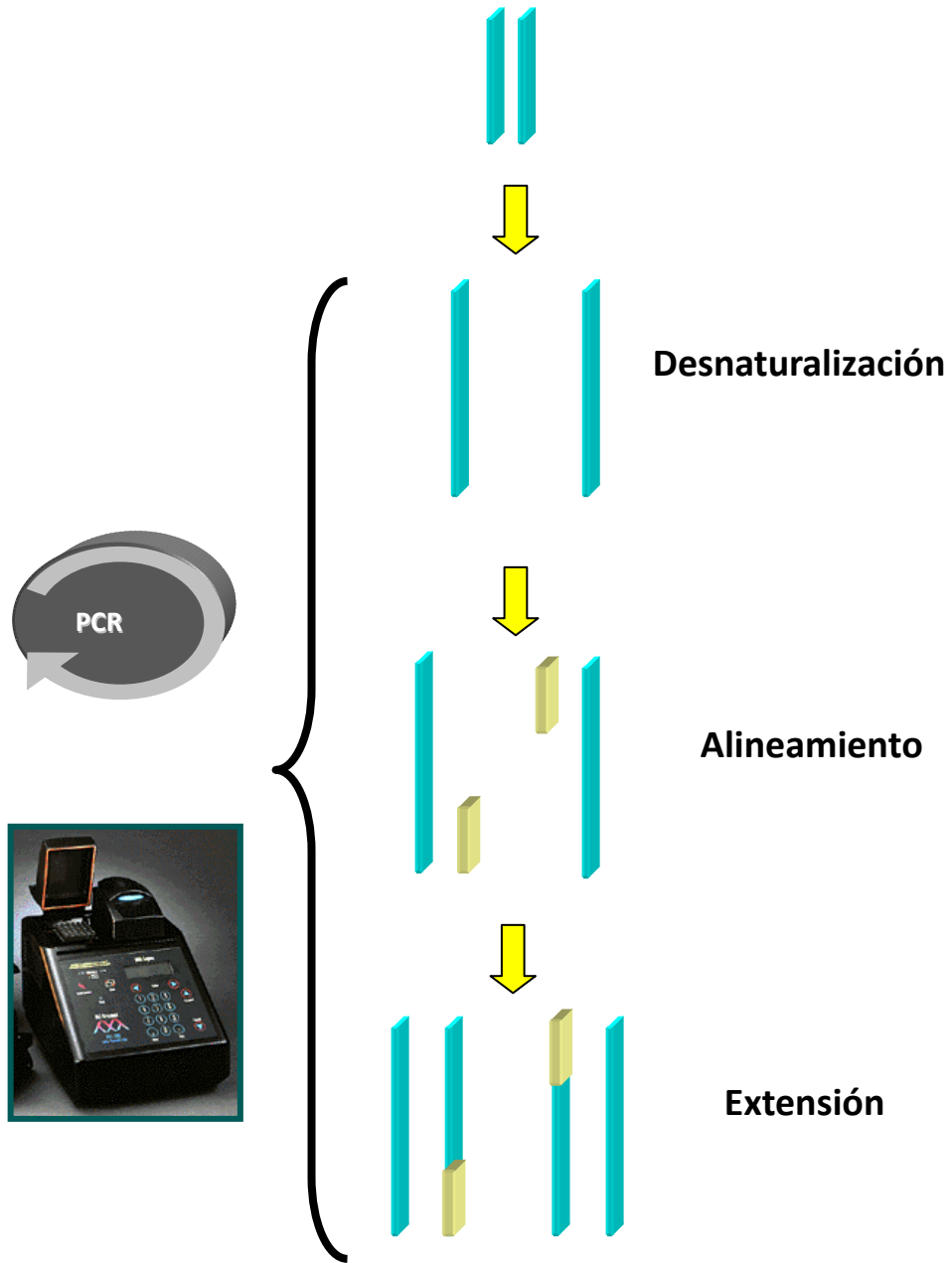
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue ideada por Mullis en 1986; es en sí misma una técnica que ha revolucionado la Biología Molecular, al permitir la amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN a partir incluso de una sola molécula de ADN (89).

Esta reacción utiliza un par de oligonucleótidos llamados también cebadores o iniciadores que son moléculas de cadena sencilla de ADN de entre 18 a 26 bases, los cuales delimitan la región a amplificar posicionándose por complementariedad de

bases. Una vez colocados los oligonucleótidos, se procede a extender la secuencia por medio de desoxinucleótidos trifosfatados dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Esta extensión es llevada a cabo por medio de una polimerasa obtenida de un microorganismo llamado *Thermophilus aquaticus*, por lo que es llamada Taq-polimerasa, esta enzima es termoestable, evitando la desnaturalización de ésta en los ciclos repetidos de desnaturalización del ADN.

Esta reacción consta de tres etapas diferentes, la primera de ellas, de desnaturalización, en la que la doble cadena de ADN es separada típicamente a 95°C, lo que permitirá que en la segunda fase, el alineamiento, los oligonucleótidos puedan aparearse (complementarse) con el ADN, para finalmente por medio de la Taq-polimerasa, puedan integrarse los diferentes desoxinucleótidos trifosfatados (fase de extensión). Estas tres etapas son repetidas cíclicamente entre 25 a 35 veces, con lo que en el primer ciclo de una molécula se obtienen dos, en el segundo ciclo cuatro y así sucesivamente

Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa “PCR”



2.9.2 Secuenciación

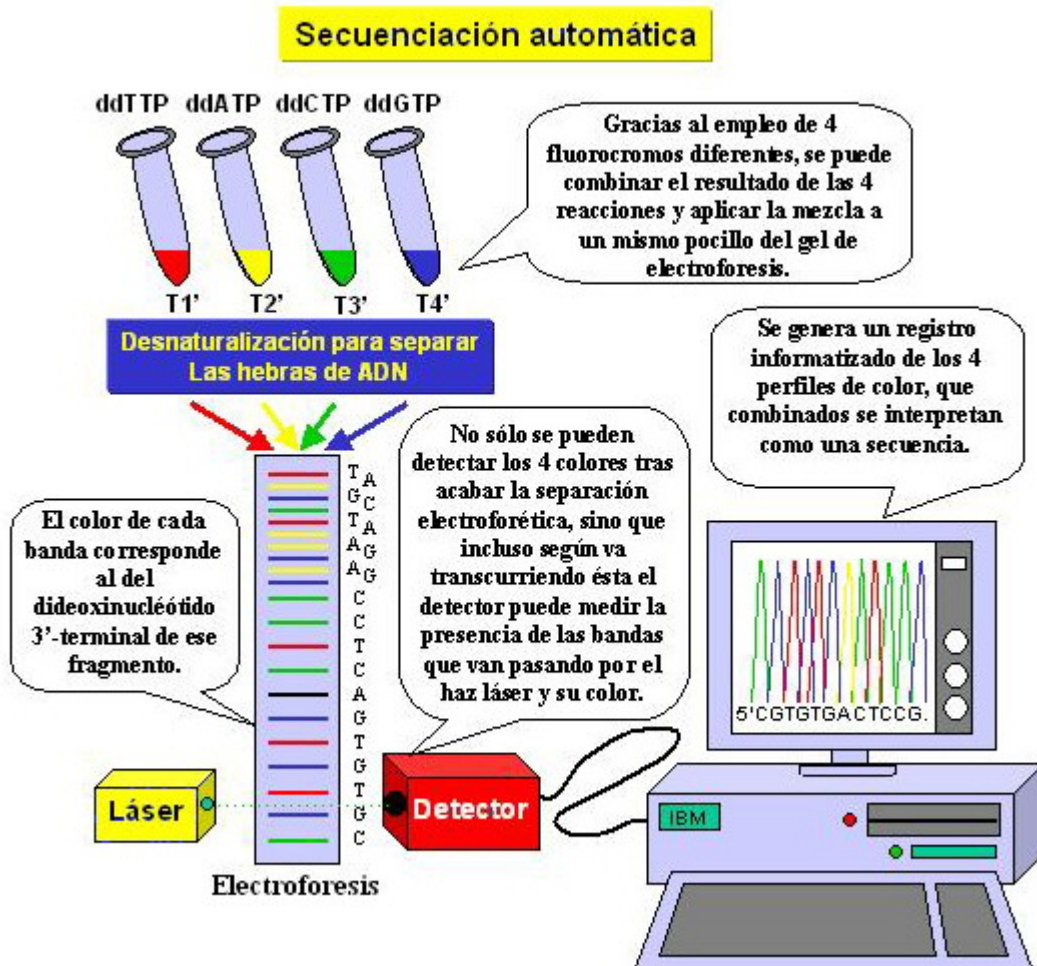
Durante treinta años la mayor parte de la secuenciación de ADN se llevó a cabo con el método de terminación de la cadena desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores en 1975. Antes del desarrollo de métodos rápidos de secuenciación del ADN a principios de los 70 por Sanger en Inglaterra y Walter Gilbert y Allan Maxam en Harvard, se utilizaban varios métodos de laboratorio (90)

La Secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. Así pues, determinar la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en campos aplicados, como la investigación. Las técnicas actuales permiten realizar esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala como el Proyecto Genoma Humano (91)

El análisis más detallado de la estructura del ADN consiste en averiguar la secuencia de nucleótidos. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, sin embargo, actualmente los métodos más utilizados son el de secuenciación automática (92-93).

Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer es la última generación de aparatos de electroforesis capilar de 4-para la baja a los laboratorios de rendimiento medio. El sistema ofrece un rendimiento líder en la industria, además de sofisticadas capacidades de automatización que le permite ahorrar tiempo, reducir costes y aumentar la productividad.

Figura 4. Secuenciación automática



<http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Automat1.jpg&imgrefurl>

III. JUSTIFICACIÓN

La preeclampsia-eclampsia (PE) constituye un problema de salud reproductiva en nuestro país con un alto índice de morbi-mortalidad materno infantil. Las causas no se han establecido con precisión, sin embargo, la migración trofoblástica incompleta ha sido señalada como uno de los eventos fisiopatológicos primarios en la enfermedad. Asimismo, dado que la placenta es considerada como un aloinjerto en relación a la madre, con patrones de metilación paternos, se justifica estudiar variantes nucleotídicas en los exones del gen PLAC9 que está relacionado con invasión trofoblástica en mujeres con PE, mujeres embarazadas sin PE y sus respectiva pareja con el objeto de identificar marcadores potencialmente predictivos para el desarrollo de la enfermedad.

IV. Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en las secuencias nucleotídicas exónicas del gen PLAC9 entre mujeres con PEE y mujeres con embarazo normal y su pareja?

V. Hipótesis

Las secuencias nucleotídicas exónicas del gen PLAC9 son diferentes entre mujeres con PEE y mujeres con embarazo normal y su pareja.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Identificar las variaciones nucleotídicas exónicas del gen PLAC9 de las pacientes con y sin preeclampsia-eclampsia y su pareja

6.2 Objetivos específicos

- Comparar las secuencias analizadas de ambos grupos de estudio con la secuencia depositada en la base de datos del NCBI
- Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de las variaciones nucleotídicas exónicas en las pacientes con y sin preeclampsia-eclampsia y su pareja.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos estudiados.

VII. MATERIAL Y METODOS

7.1 Diseño

Casos y controles

7.1.1 Grupos de estudio

Casos

- Pacientes embarazadas preeclámpticas y su pareja que acepten participar en el estudio.

Controles

- Pacientes embarazadas sanas y su pareja.

7.1.2 Universo de estudio

- Mujeres embarazadas con preeclampsia-eclampsia y su respectiva pareja.

7.1.3 Tamaño de muestra

Se captaron 20 pacientes con preeclampsia- eclampsia y su pareja y 20 pacientes con embarazo normal y su pareja del Hospital General de Durango. Este tamaño de muestra se calculó con la formula $n = \frac{(z_{\alpha}^2 + z_{\beta}^2)\sigma^2}{d^2}$, para identificar polimorfismos mediante secuenciación de las regiones codificantes de un Gen con una frecuencia mayor o igual a 5%, se consideró un valor de $\alpha=0.05$, $\beta=0.20$.

7.1.4 Aspectos éticos

- El proyecto de investigación fue aprobado por el comité de ética del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE., en la Ciudad de México, D.F. con el número de registro 006/07.

- El proyecto de investigación fue aprobado por el comité de ética del Hospital General de Durango

7.2 Criterios de selección

7.2.1 Criterios de inclusión

- a) Pacientes embarazadas con y sin preeclampsia-eclampsia, que acepten firmar la carta de consentimiento informado
- b) Parejas de las mujeres seleccionadas.

7.2.2 Criterios de exclusión

- a) Pacientes embarazadas con preeclampsia-eclampsia que no cumplan con los criterios del National High Blood Pressure Education Program Working Group.
- b) Pacientes con hipertensión arterial crónica, con hipertensión arterial crónica más preeclampsia o con hipertensión transitoria.

7.2.3 Criterios de eliminación

- a) Que el o la paciente decida retirarse del estudio.
- b) Muestra sanguínea contaminada
- c) ADN degradado

7.3 Variables en estudio

7.3.1 Variable dependiente

- **Preeclampsia-eclampsia**

Variable cualitativa policotómica

Para definir la presencia de preeclampsia-eclampsia se consideraron las cifras de presión arterial, la proteinuria y el edema, así como la presencia de convulsiones no atribuibles a otra causa.

7.3.2 Variable independiente

- **Variaciones nucleotídicas exónicas del gen PLAC9**

Variable cualitativa policotómica

Podrá haber hasta tres variaciones nucleotídicas en relación a cada nucleótido silvestre analizado por secuenciación.

7.3.3 Variables intervinientes

- **Edad**

Variable cuantitativa continua

Para efectos de este estudio se consideró la edad de los pacientes siendo esta mayor a 18 años y menor a 35; que establece el rango de edad de menor riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

- **Gestas**

Variable cuantitativa discreta

Se consideró el número de gestas ya que en mujeres primigestas es más frecuente el desarrollo de la enfermedad disminuyendo el riesgo conforme se incrementa el número de las mismas.

- **Partos**

Variable cuantitativa discreta

Se consideró el número de partos, como antecedente gineco-obstétrico en la madre.

- **Cesáreas**

Variable cuantitativa discreta

Se consideró el número de cesáreas, como antecedente gineco-obstétrico en la madre.

- **Semanas de gestación**

Variable cuantitativa discreta

Para fines de este estudio se tomo en cuenta la aparición de la enfermedad después de la semana 20 de gestación.

- **Presión sistólica y diastólica**

Variable cuantitativa continua

Para efecto de este estudio se tomo en cuenta la presión sistólica y diastólica ya que fue una variable para definir la presencia de preeclampsia y establecer grados de severidad de la misma.

- **Proteínas (Albumina en suero)**

Variable cuantitativa continua

Se midieron las concentraciones de albumina en suero a través de una reacción de bromocresol con espectrofotometría a 630 nm con un equipo de química seca Vitros250, basándonos en los valores normales que son de 3.4-5.4 g/dL

- **Plaquetas**

Variable cuantitativa continua

Se consideró plaquetopenia a cifras menores de $100,000\text{cm}^3$

- **Edema**

Variable cualitativa dicotómica

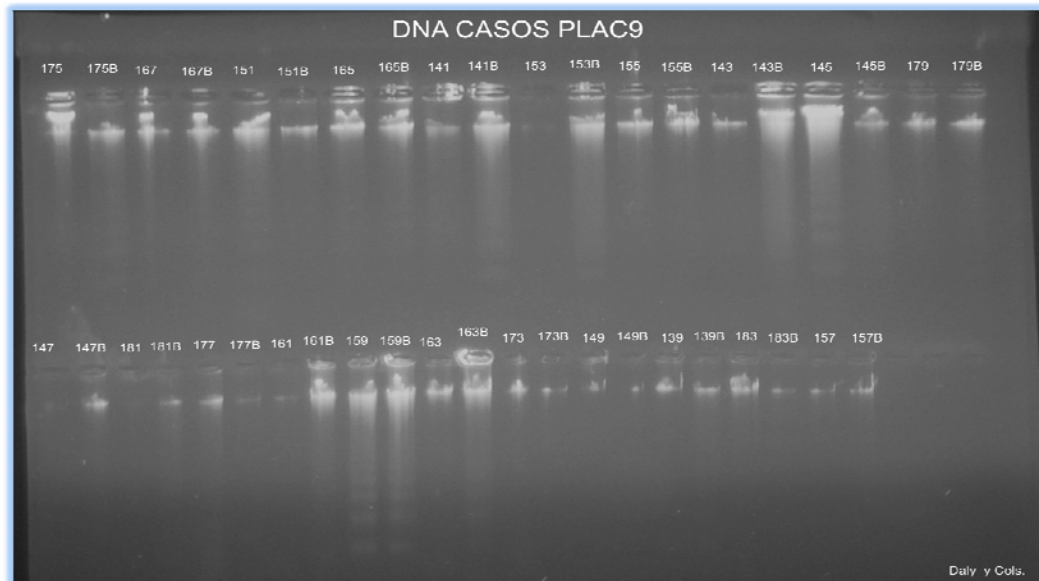
Se consideró como edema al incremento rápido de tejido blando a la palpación en manos, piernas y cara o generalizada o bien al incremento rápido de peso sin evidencia de edema.

7.4 Procedimientos

1. El protocolo se entregó y se aprobó por las autoridades correspondientes del Comité Local de Investigación y Ética del Hospital General de la Ciudad de Durango.
2. El proceso de selección de los participantes se realizó de pacientes hospitalizados en el Hospital general de Durango.
3. A las personas que cumplieron con los criterios de ingreso, se les explicaron los objetivos del estudio, invitándolos a participar.
4. A las personas que aceptaron participar en el estudio se les pidió que firmaran la carta de consentimiento informado.
5. Los sujetos de estudio fueron asignados a uno de los siguientes grupos:
 - **Grupo de Casos:** Mujeres embarazadas con diagnóstico de preeclampsia-eclampsia y su respectiva pareja.
 - **Grupo de Controles:** Mujeres embarazadas sanas y su respectiva pareja.
6. A cada una de las pacientes se les realizó una historia clínica con datos como número de partos, número de gestas, número de abortos, número de cesáreas semanas de gestación, para el diagnóstico de preeclampsia, se les realizó la medición de la presión sistólica y diastólica, edema y proteínas tanto en orina como en suero.
7. Se realizó la toma de muestra sanguínea a cada paciente y su pareja y se colectaron 5mL en tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante y 5mL en tubo vacutainer sin EDTA para el análisis de las proteínas en suero y enzimas

- hepáticas, mismos que se realizaron en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital General de Durango.
8. Las muestras sanguíneas en tubos con EDTA fueron transportados a temperatura adecuada a IPN-CIIDIR DURANGO para realizar la extracción de DNA de cada uno de los pacientes.
 9. Se realizo la extracción de DNA de cada uno de los pacientes con la técnica de Daly y cols (Anexo 1).
 10. Se preparó gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Anexo 2) y por medio de electroforesis se hizo el corrimiento del gel a 100volts por una hora y se verificó la integridada y pureza del DNA genómico, Figura 5.

Figura 5. Electroforesis de DNA



11. Una vez que se obtuvo el DNA de cada uno de los pacientes se realizó. Se amplificaron los 4 exones del Gen PLAC9 utilizando oligonucleótidos flanqueantes que fueron elaborados para cada exón a partir de la secuencia del Gen, considerando al menos 100pb corriente arriba y debajo de los exones (GeneID:219348) con el programa primer 3.

Cuadro 1. Iniciadores del Gen PLAC9 para cada Exón.

	Sentido	Antisentido
Exón 1 (465pb)	5' TgA gCC CAA gAC CTC ACC 3'	5' CTC TCg CTC ATT CCT TCC TC 3'
Exón 2 (272pb)	5' TTT gAg CCC AgT gTT TAC Agg 3'	5' CCT CAC ATT CCAAAg CAA Gc 3'
Exón 3 (233pb)	5' ATg AAg Cgg AAC gTg GAA C 3'	5' CCA gCg CCA gAT gAC Ag 3'
Exón 4 (251pb)	5' CAg gTA CTC TgC ggC ACC 3'	5' Agg CAT ggAAgT ggA gTg Ag 3'

12. Se preparó PCR (Anexo 3), para la amplificación de cada uno de los exones del Gen. Procesando todas las muestras de la población estudiada.
13. Los programas de amplificación fueron estandarizados en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600 obteniendo temperaturas de alineamiento para cada una de los exones, se logró la amplificación de todas las muestras para cada uno de los exones, obteniendo los productos amplificados sin bandas inespecíficas.

Cuadro 2. Condiciones de amplificación de PCR. Gen PLAC9

	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
Exón 1	95°- 1min	94°- 30seg	59.3°- 30seg	72°-30seg	70°- 5min
Exón 2	95°- 1min	94°- 30seg	58.3°- 30seg	72°-30seg	70°- 5min
Exón 3	95°- 1min	94°- 30seg	59°- 30seg	72°-30seg	70°- 5min
Exón 4	95°- 1min	94°- 30seg	61°- 30seg	72°-30seg	70°- 5min
32 ciclos. Programa del termociclador # 1 (2, 3, 4, 5)					

14. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio y con un corrimiento a 100volts durante una hora, para verificar la amplificación de los fragmentos buscados para cada exón del Gen PLAC9 en cada uno de los pacientes, Figura 6, 7, 8, 9.

Figura 6. Electroforesis de PCR. Exón 1.

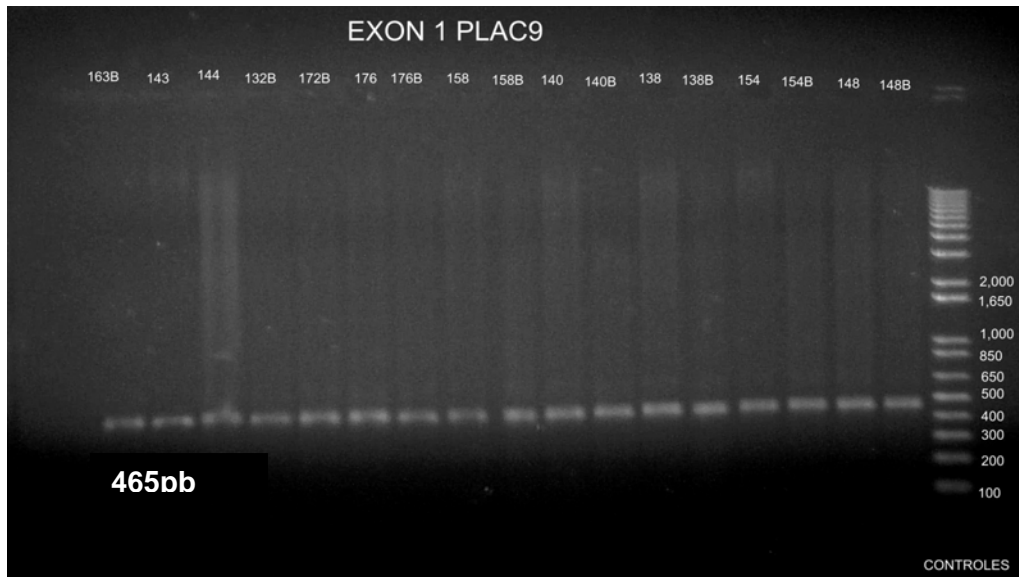


Figura 7. Electroforesis de PCR. Exón 2.

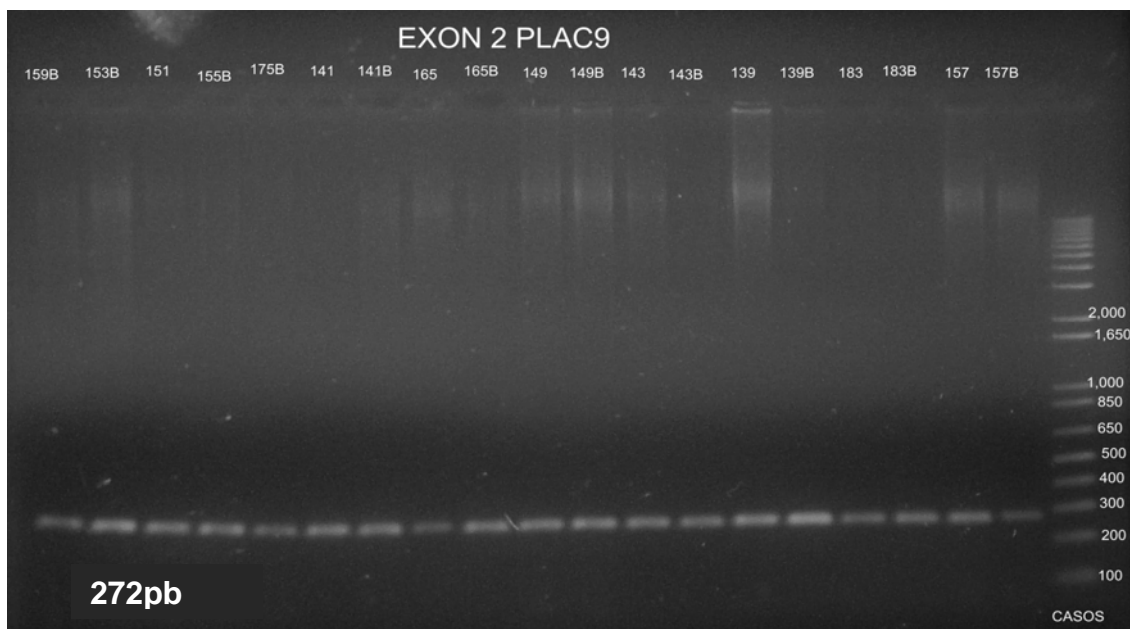


Figura 8. Electroforesis de PCR. Exón 3.

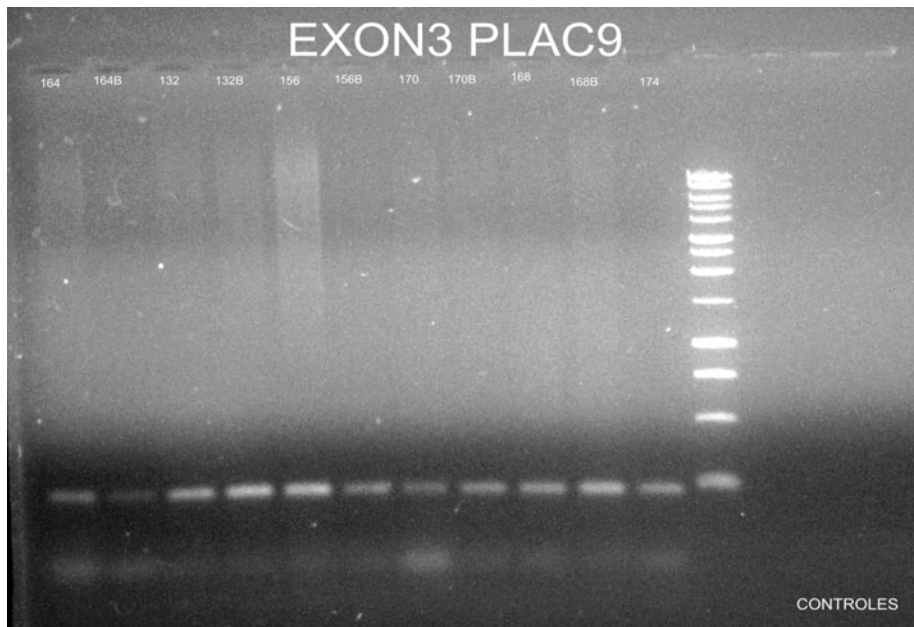
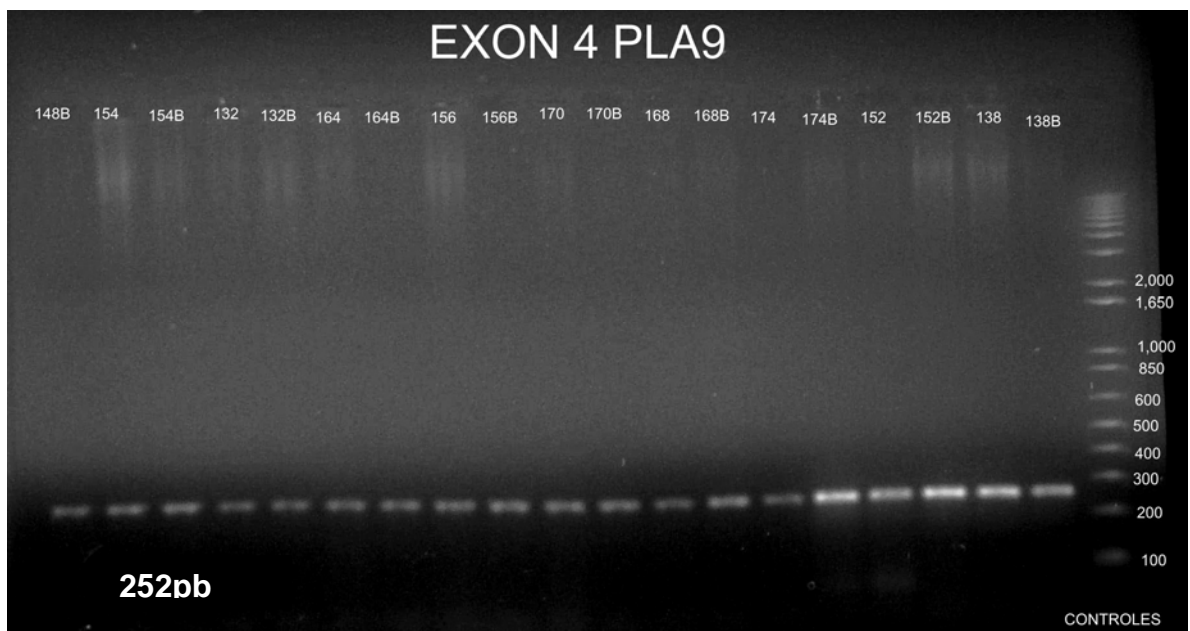
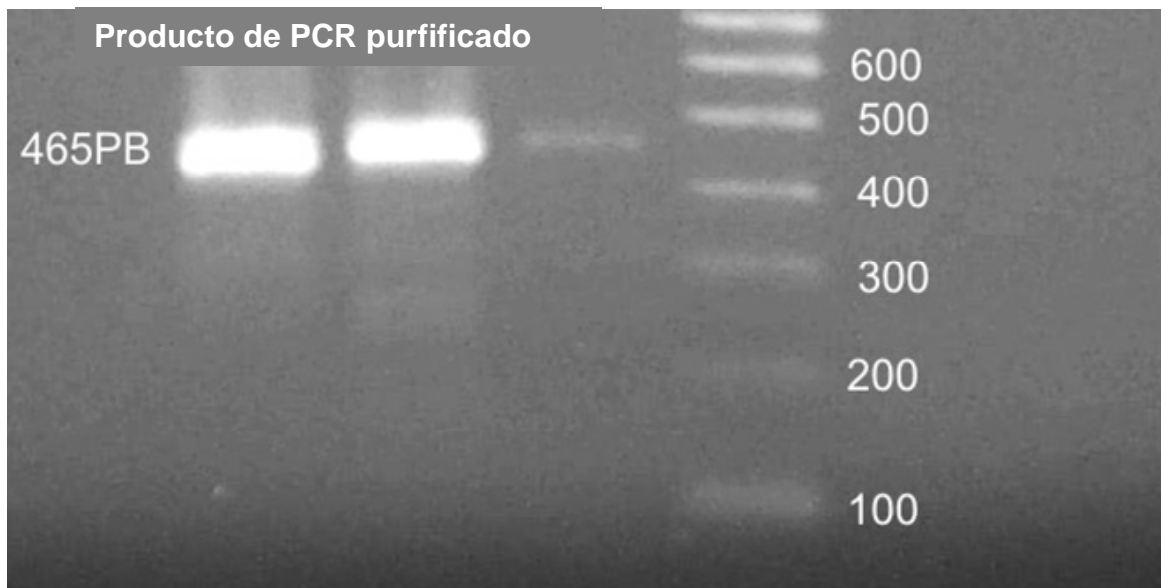


Figura 9. Electroforesis de PCR. Exón 4



15. Una vez que se comprobó la amplificación se procedió a realizar el corte de las bandas de cada uno de los exones y cada banda se depositó en tubos eppendorf (Anexo 4).
16. Se realizó la purificación de cada una de estas bandas con el método de QIAquick Gel Extraction Kit®, QIAGEN™ (Anexo 5).
17. Para observar la cantidad de producto purificado que se obtuvo se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y con un corrimiento de 100volts por una hora.

Figura 10. Producto de PCR purificado



18. Ya purificado el producto se realizó PCR usando BigDye® (Anexo 6). Para la amplificación de los productos de PCR, se usó un termociclador C1000 Thermal Cyclers™ usando las mismas condiciones de amplificación para las 4 exones.

Cuadro 3. Amplificación de PCR con BigDye. Gen PLAC9

	T°	Tiempo
Desnaturalización	95°	30seg
Alineamiento	50°	15seg
Extensión	60°	4min
	4°	Forever
25 ciclos. Tiempo 2 horas 30 min		

19. Se realizó la purificación de este producto de PCR usando las columnas de Centri-Sep™ (Anexo 7).
20. Se procedió a realizar secuenciación en el secuenciador Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer™

Figura 11. Diagrama de flujo muestras secuenciadas

21. Se obtuvieron los resultados
22. Se compararon los resultados con la base de datos del NCBI, usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para realizar la búsqueda de variaciones nucleotídicas.
23. Se realizó una comparación intergrupar y se hizo el análisis estadístico de los datos obtenidos para la obtención de los resultados.

7.5 Análisis estadístico

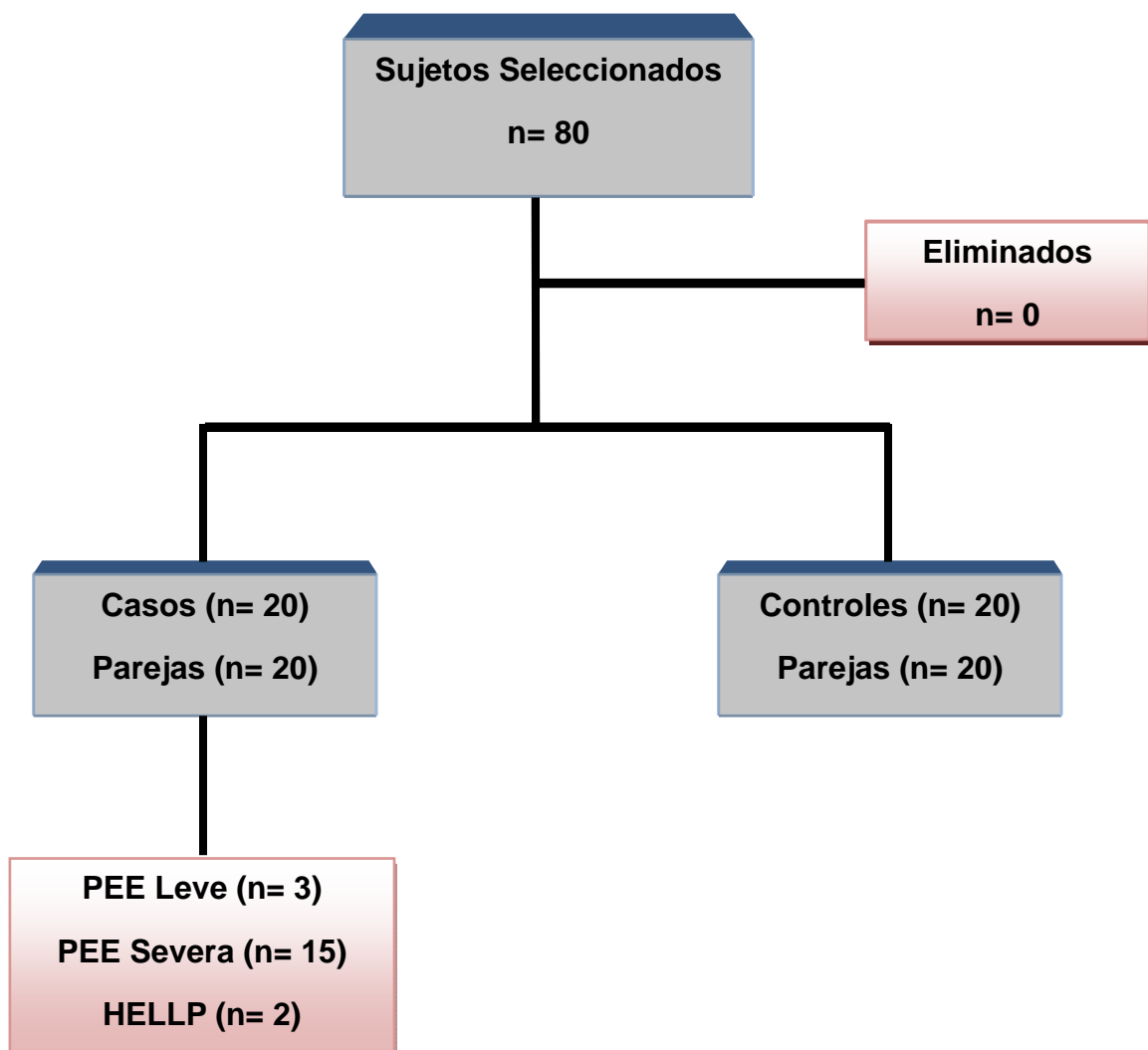
Se utilizó la prueba de t de Student para identificar diferencias entre variables continuas.

Se realizaron tablas de contingencia de 2x2 y se utilizó la ji cuadrada para calcular la significancia de la bondad de ajuste. Se consideró un valor de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95% para definir la significancia estadística. La información se analizó en el paquete estadístico Statistic versión 7.

VIII. RESULTADOS

El estudio se realizó en diferentes etapas, en las cuales se seleccionó a los participantes, se integraron los grupos de estudio, se realizó el procedimiento experimental y finalmente se hizo el análisis de la información.

Figura 12. Diagrama de flujo de la selección de participantes



En el análisis estadístico de los resultados clínicos, las pacientes en el grupo de casos presentaron cifras mayores de presión sistólica y diastólica en relación al grupo control, así mismo se encontró diferencia significativa en las semanas de gestación al compararlos con los sujetos del grupo control. En la medición de albumina en suero se observa que las pacientes en el grupo de casos tienen menor cantidad de esta proteína y disminución en el recuento plaquetario, si bien no se encuentra diferencia significativa al comparar los grupos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características de la Población estudiada y significancia de la diferencia de medias con t de Student

	Casos n=20	Controles n=20	P
Edad M	27.4 ± 5.82	24.1 ± 4.80	0.0577
Edad H	30.55 ± 8.16	28.60 ± 6.85	0.4184
Gestas	2.1 ± 1.45	2.3 ± 1.17	0.6340
Partos	0.6 ± 1.19	1.2 ± 1.54	0.1761
Abortos	0.3 ± 0.57	0.0 ± 0.22	0.0762
Cesareas	1.22 ± 0.88	1.0 ± 1.17	0.6487
Semanas de gestación	34.3 ± 4.72	39.7 ± 1.07	0.000015
TA Sistólica (mmHg)	158.5 ± 16.31	112.5 ± 6.57	0.0000
TA Diastólica (mmHg)	105.3 ± 13.71	70.4 ± 4.76	0.0000
Albumina en suero (g/dl)	2.6 ± 0.64	2.9 ± 0.62	0.0782
Plaquetas	206,200 ± 71,435	237,450 ± 44,842	0.1057

En el análisis de los resultados, se calculó el porcentaje de individuos que presentaron cambios para cada exón y se realizó la comparación entre los grupos.

Se calculó el porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia en el exón 2, 3 y 4, así como también el porcentaje de individuos que presentaron variaciones con el total de la población estudiada. El análisis del Exón 2 reveló el mayor porcentaje de individuos con variaciones en relación al grupo control encontrando diferencias significativas al realizar la comparación entre los grupos estudiados con la prueba t de Student (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia y significancia de la diferencia de proporciones con la prueba t de Student

Exón 2					
	Individuos	Mujeres	Hombres	% Por grupo	% vs Población total
Casos n=40	7	7	0	17.5%	8.75%
Controles n=40	2	1	1	5%	2.50%
Total de la población n=80	9	8	1		11.25%
				p=0.03	p= 0.04

Al igual que en el exón 2, el exón 3 presentó un mayor porcentaje de individuos con variaciones en el grupo de casos que en el grupo control y al realizar la comparación también se encontró diferencias significativas con la prueba de t de Student (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia y significancia de la diferencia de proporciones con la prueba t de Student

Exón 3					
	Individuos	Mujeres	Hombres	% Por grupo	% vs Población total
Casos n=40	7	6	1	17.5%	8.75%
Controles n=40	2	1	1	5%	2.50%
Total de la población n=80	9	7	2		11.25%
				p=0.03	p= 0.04

Para el exón 4 aunque se observa un mayor porcentaje de individuos con variaciones en el grupo de casos en relación al grupo control, estas diferencias no son estadísticamente significativas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de individuos que presentaron variaciones de secuencia y significancia de la diferencia de proporciones con la prueba t de Student

Exón 4					
	Individuos	Mujeres	Hombres	% Por grupo	% vs Población total
Casos n=40	7	4	3	17.5%	8.75%
Controles n=40	4	2	2	10%	5%
Total de la población n=80	11	6	5		13.75%
				p=0.16	p= 0.17

El análisis de las tablas anteriores muestra que hay un mayor número de mujeres con variaciones en el grupo de casos (17) con respecto al grupo control (4) y que para las parejas analizadas en ambos grupos no existen diferencias en relación al número de individuos con cambios (4 por grupo), (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de individuos por sexo que presentaron variaciones nucleótídicas

	Mujeres	Hombres
Casos	17 (80.1%)	4 (50%)
Controles	4 (19.9%)	4 (50%)
Total	21 (100%)	8 (100%)

Se puede apreciar una importante diferencia en el número de mujeres con variaciones en relación al número de hombres para el grupo de casos; en contraste con el grupo control donde el número de mujeres y hombres con variaciones es el mismo. El total de individuos con variaciones es de 29, de los cuales 21 (72.41%) pertenecen al grupo de casos y 8 (27.59%) son del grupo control por lo que la diferencia entre los grupos es estadísticamente significativa **p=0.01** de acuerdo a la prueba t de Student.

Se realizó el análisis de cambios encontrados por exón clasificándose según el tipo de cambio que tuvieron y se calculó la frecuencia de estos cambios.

En el Exón 2 el grupo de casos presentó un número de cambios mayor que el grupo control y al realizar la comparación entre los grupos se obtuvo una diferencia significativa (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cambios encontrados por Exón y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2

Exón 2							
	# de cambios	Homocigoto	Heterocigoto	Delección	Inserción	Frecuencia	%
Casos	10	4	4	0	2	0.1	10.20%
Controles	3	0	1	0	2	0.03	3.06%
Total de cambios	13	4	5	0	4	0.13	13.26%
p=0.04							

En el exón 3 el grupo de casos presentó un número mayor de cambios que el grupo control y al comparar ambos grupos se obtuvo una diferencia significativa (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cambios encontrados por Exón y significancia de la bondad de ajuste con la prueba X^2

Exón 3							
	# de cambios	Homocigoto	Heterocigoto	Delección	Inserción	Frecuencia	%
Casos	15	3	5	2	5	0.12	12.29%
Controles	2	1	0	1	0	0.01	1.64%
Total de cambios	17	4	5	3	5	0.14	13.93%
p=0.001							

Aunque en el exón 4 el grupo de casos presentó mayor cantidad de cambios que el grupo control no se encontró diferencia significativa al comparar ambos grupos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Cambios encontrados por Exón y significancia de la bondad de ajuste con la prueba χ^2

Exón 4							
	# de cambios	Homocigoto	Heterocigoto	Delección	Inserción	Frecuencia	%
Casos	8	3	0	0	5	0.06	6.2%
Controles	5	1	2	0	2	0.03	3.87%
Total de cambios	13	4	2	0	7	0.1	10.07%
p=0.39							

Al identificar los cambios que se obtuvieron para cada exón tanto para casos como para controles se localizó dicho cambio en la secuencia del mensajero y se observó el número de veces que el cambio se repetía calculando las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de esos cambios.

Para el exón 2 se encontraron 8 cambios nucleotídicos correspondientes al grupo de casos y 3 cambios en el grupo de controles, a excepción del cambio 340 G/A Y 342 T>A que se repitieron dos veces el resto de los cambios solo se presentó una vez (Cuadro 12-13).

Cuadro 12. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

EXÓN 2. CASOS								
Posición Cambio	333 A>C	340 G/A	342 T>A	358 INS T	375 C/A	405 G>C	420 C>T	420 INS A
# veces que se repite el cambio	1	2	2	1	1	1	1	1
Frecuencias Genotípicas	A>C=2.5%	G/A=5%	T>A=5%	INS T=2.5%	C/A=2.5%	G>C=2.5%	C>T=2.5%	INS A=2.5%
Frecuencias Alélicas	A=98.75% C=1.25%	G=97.5% A=2.5%	T=97.5% A=2.5%	T=1.25	C=98.75% A=1.25%	G=98.75% C=1.25%	C=98.75% T=1.25%	A=1.25%

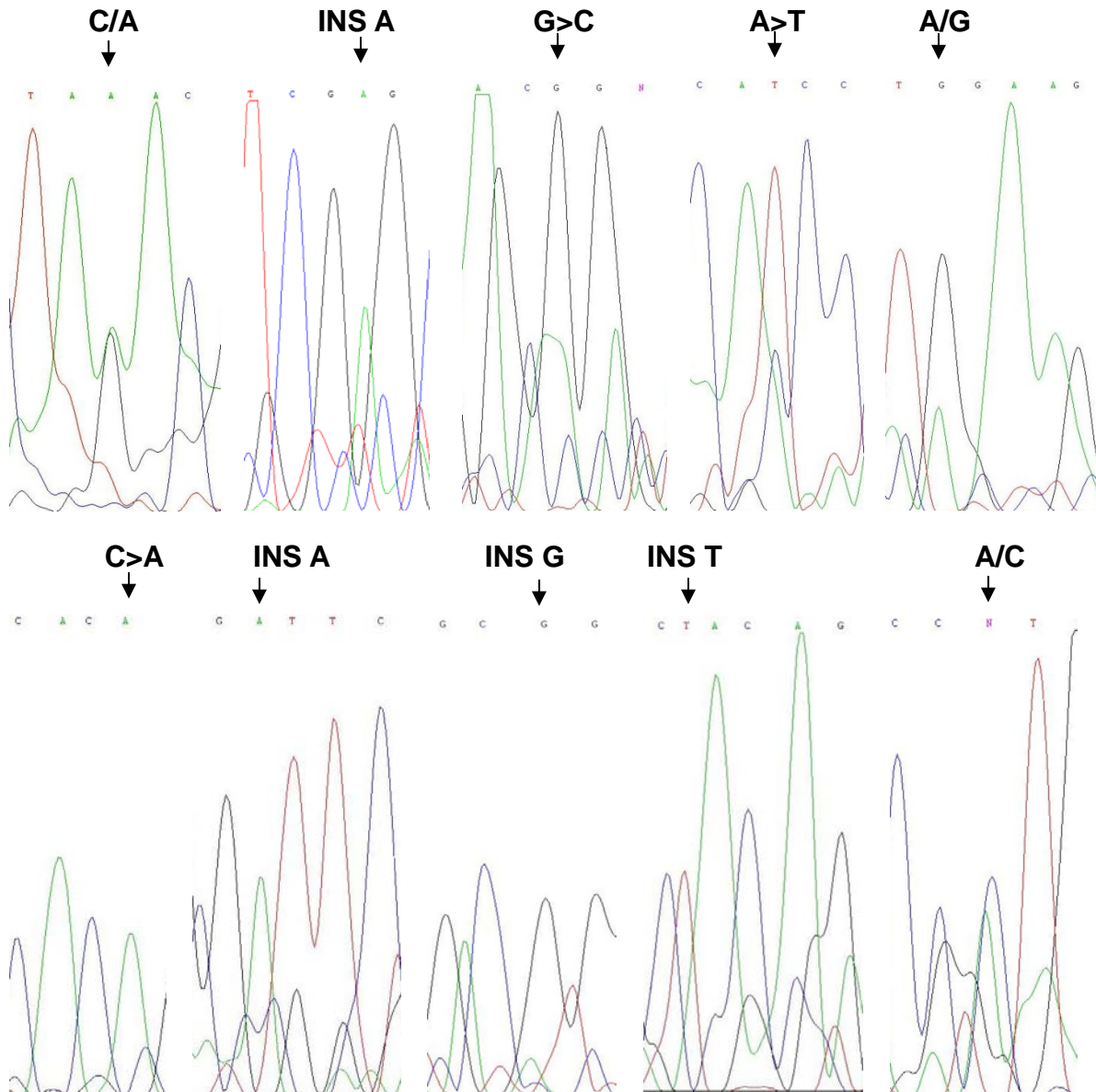
- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

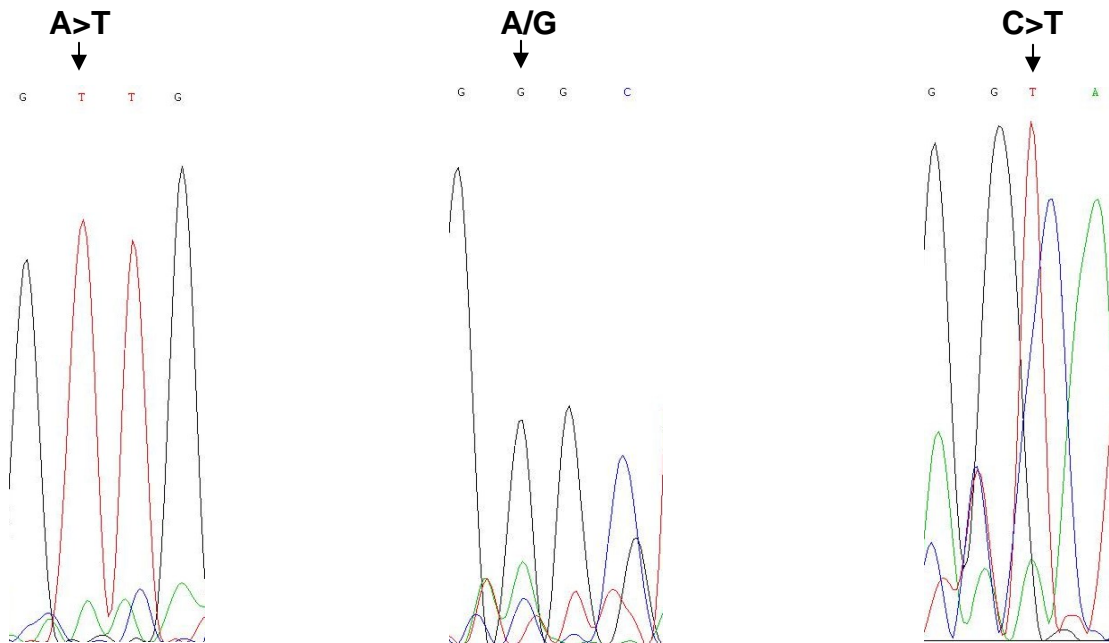
Cuadro 13. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Exón 2. Controles			
Posición Cambio	343 G/A	403 INS G	413 INS G
# veces que se repite el cambio	1	1	1
Frecuencias Genotípicas	G/A=2.5%	INS G=2.5%	INS G=2.5%
Frecuencias Alélicas	G=98.75% A=1.25%	INS G= 1.25%	INS G= 1.25%

- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

FIGURA 13. Electroferogramas de los cambios nucleotidicos del exón 2





Para el exón 3 se encontraron 15 cambios nucleotídicos correspondientes al grupo de casos y 2 cambios en el grupo de controles, todos los cambios encontrados para este exón tanto en el grupo de casos como en el grupo de controles solo se presentó una vez (Cuadro 14-16).

Cuadro 14. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

EXÓN 3. CASOS								
Posición Cambio	432 G/T	434 DEL A	435 G>T	435 DEL A	453 INS A	464 INS A	469 C>T	470 C>T
# veces que se repite el cambio	1	1	1	1	1	1	1	1
Frecuencias Genotípicas	G/T=2.5%	DEL A=2.5%	G>T=2.5%	DEL A=2.5%	INS A=2.5%	INS A=2.5%	C>T=2.5%	C>T=2.5%
Frecuencias Alélicas	G=98.75% T=1.25%	A=98.75%	G=98.75% T=1.25%	A=98.75%	A=1.25%	A= 1.25%	C=98.75% T=1.25%	C=98.75% T=1.25%

- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

Cuadro 15. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Exón 3. Casos							
Posición Cambio	496 C/T	503 INS A	505 G>A	516 INS G	519 C>A	539 C/T	540 INS T
# veces que se repite el cambio	1	1	1	1	1	1	1
Frecuencias Genotípicas	C/T=2.5%	INS A=2.5%	G>A=2.5%	INS G=2.5%	C>A=2.5%	C/T=2.5%	INS T=2.5%
Frecuencias Alélicas	C=98.75% T=1.25%	A=1.25%	G=98.75% A=1.25%	G=1.25%	C=98.75% A=1.25%	C=98.75% T=1.25%	T=1.25%

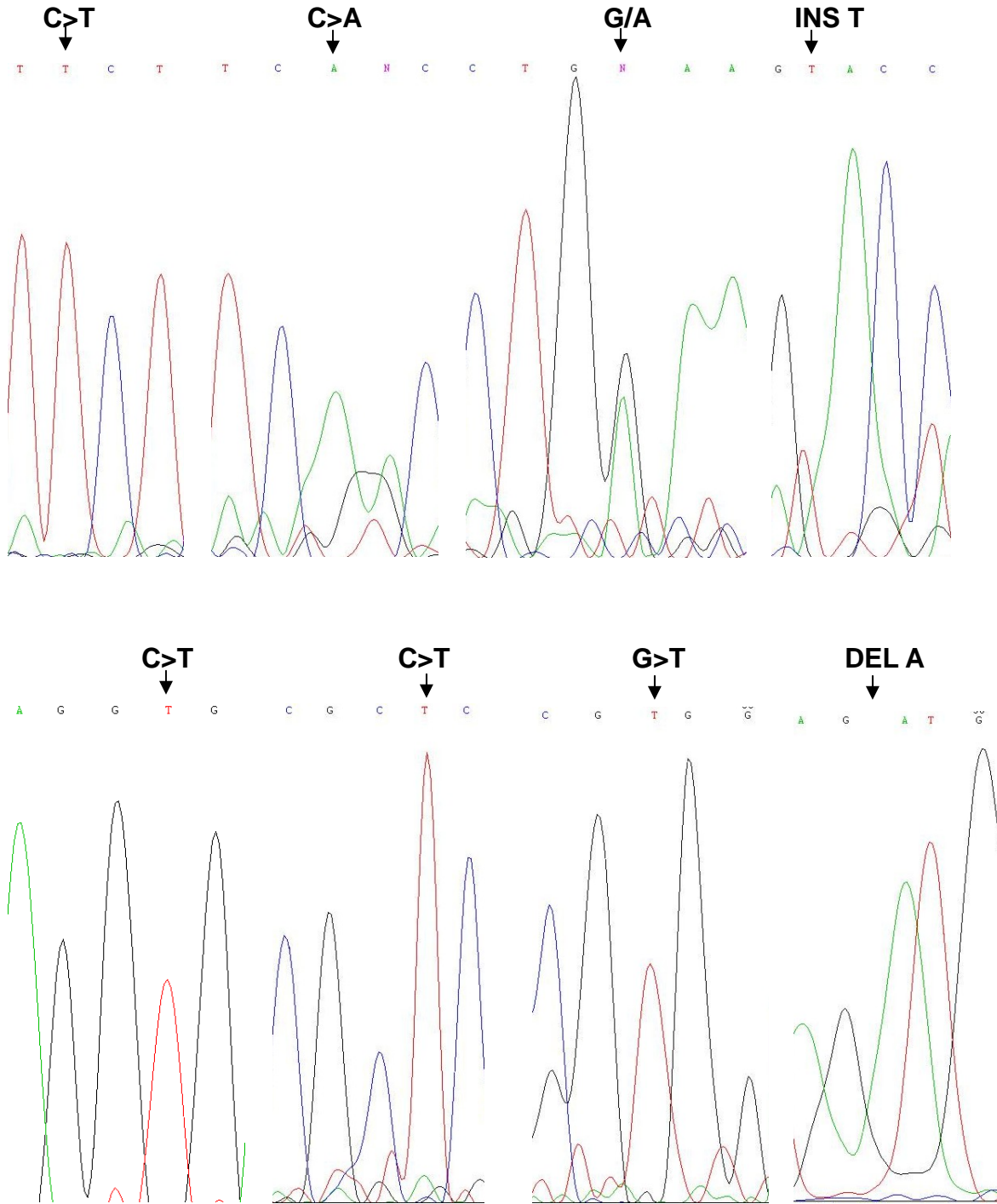
- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

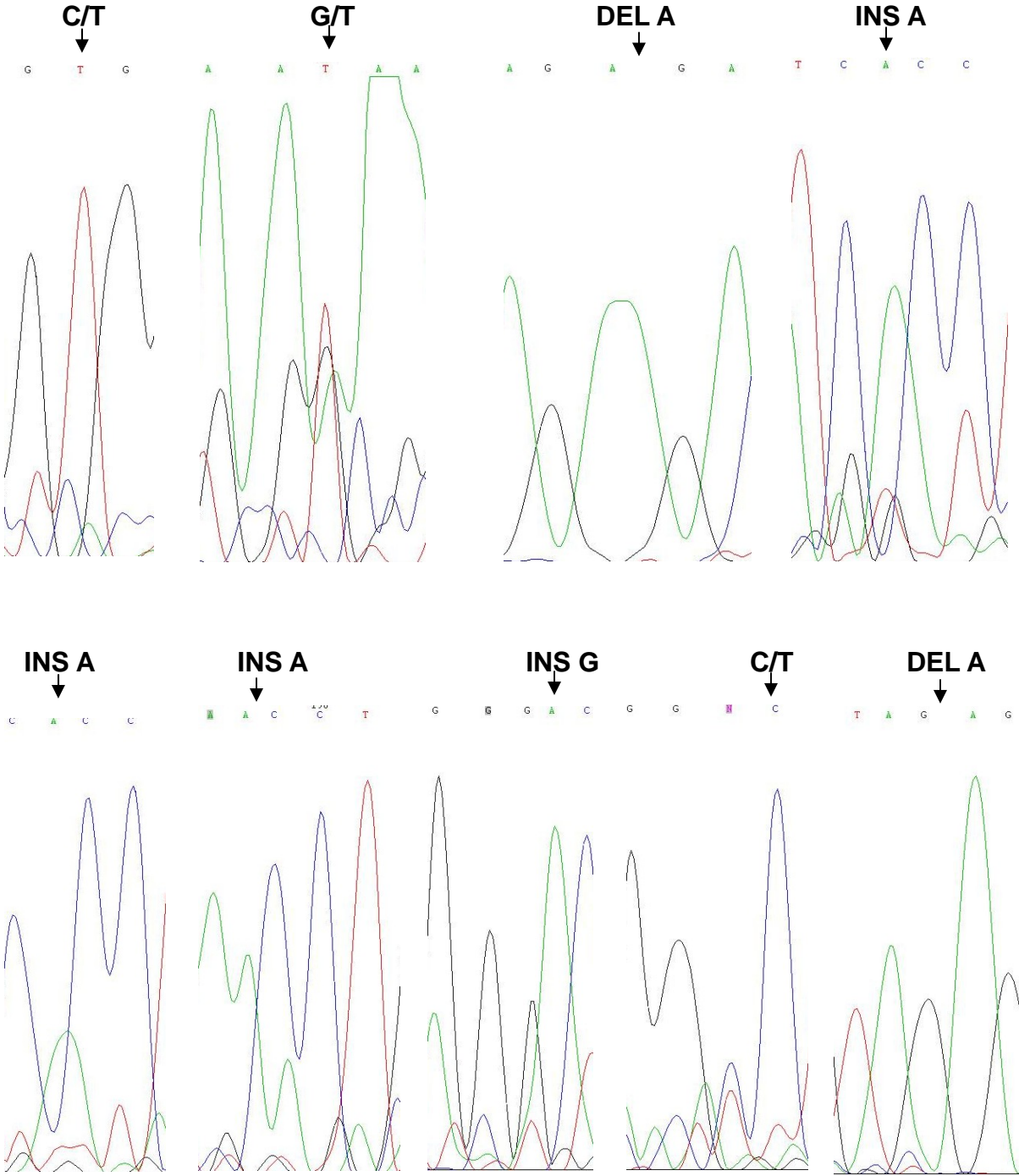
Cuadro 16. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Exón 3. Controles		
Posición Cambio	435 DEL A	473 C>T
# veces que se repite el cambio	1	1
Frecuencias Genotípicas	DEL A=2.5%	C>T=2.5%
Frecuencias Alélicas	A=98.75%	C=98.75% T=1.25%

- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

FIGURA 14. Electroferogramas de los cambios nucleotidicos del exón 3





Para el exón 4 se encontraron 8 cambios nucleotídicos correspondientes al grupo de casos y 5 cambios en el grupo de controles, todos los cambios encontrados para este exón tanto en el grupo de casos como en el grupo de controles solo se presentó una vez (Cuadro 17-18)

Cuadro 17. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

EXÓN 4. CASOS								
Posición Cambio	565 INS C	581 A>C	581 INS C	596 A>T	628 C>T	629 INS C	662 INS C	673 INS T
# veces que se repite el cambio	1	1	1	1	1	1	1	1
Frecuencias Genotípicas	INS C=2.5%	A>C=2.5%	T>A=2.5%	INS A>T=2.5%	C/A=2.5%	G>C=2.5%	INS C=2.5%	INS A=2.5%
Frecuencias Alélicas	A=98.75% C=1.25%	A=98.75% A=1.25%	T=98.75% A=1.25%	A=98.75% T=1.25%	C=98.75% A=1.25%	G=98.75% C=1.25%	C=1.25%	A=1.25%

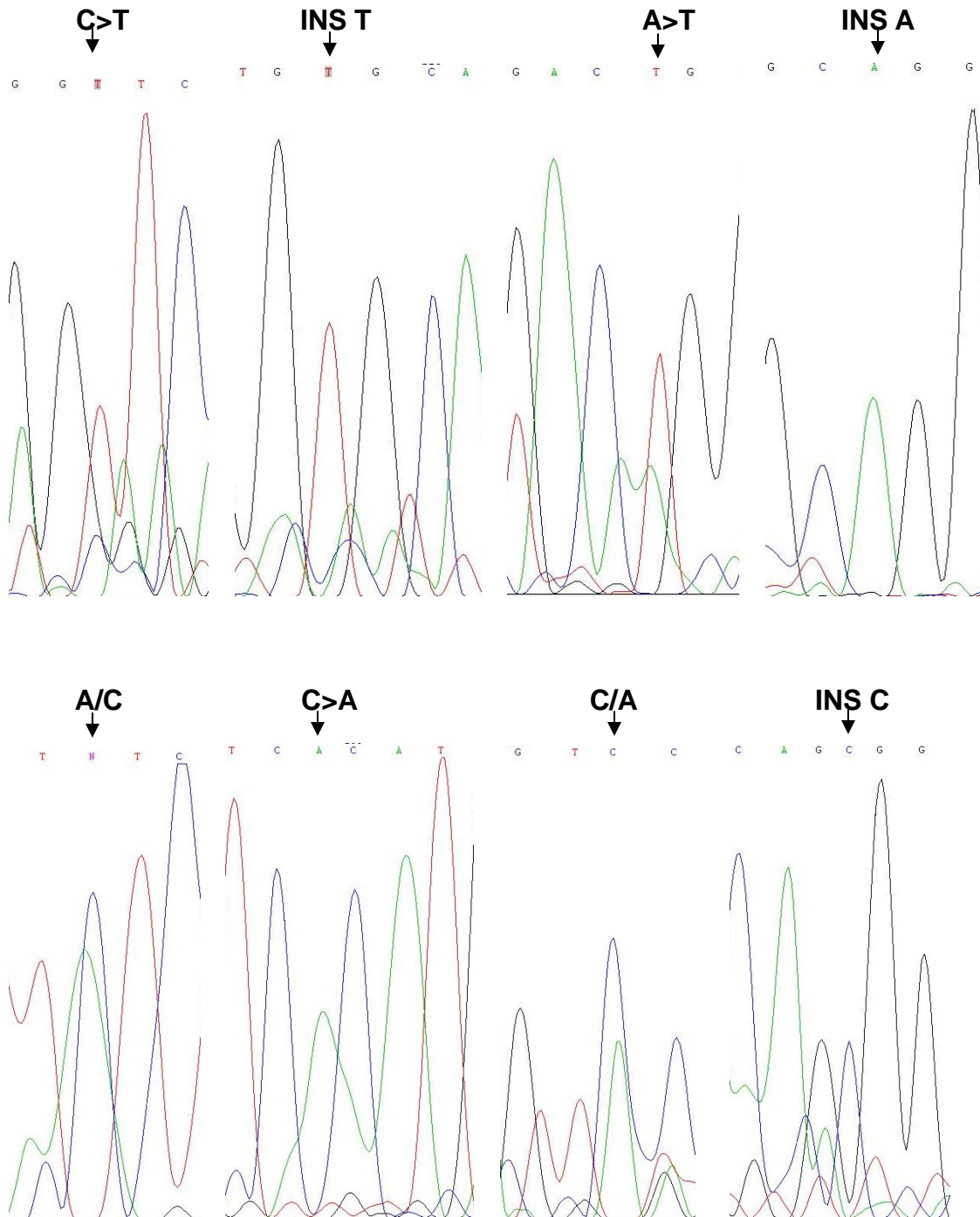
- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

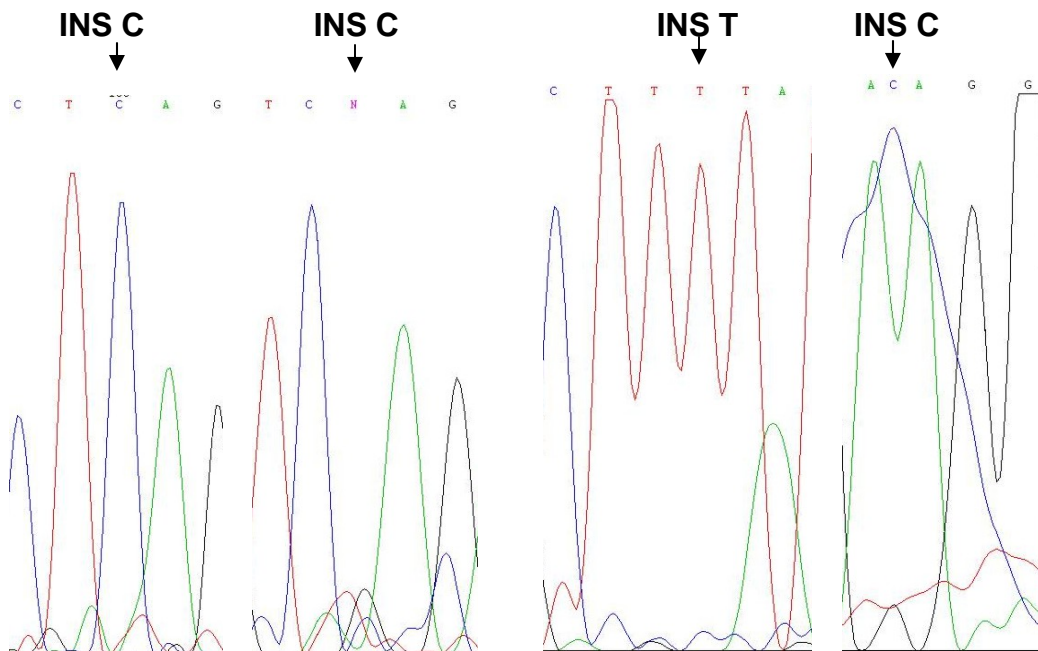
Cuadro 18. Posición del cambio. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Exón 4. Controles					
Posición Cambio	591 INS A	599 INS C	603 C/A	646 C/A	650 C>A
# veces que se repite el cambio	1	1	1	1	1
Frecuencias Genotípicas	INS A=2.5%	INS C=2.5%	C/A=2.5%	C/A=2.5%	C>A=2.5%
Frecuencias Alélicas	A=1.25%	C= 1.25%	C=98.75% A= 1.25%	C=98.75% A= 1.25%	C=98.75% A= 1.25%

- > Homocigoto
- / Heterocigoto
- **INS.** Inserción
- **DEL.** Delección

FIGURA 15. Electroferogramas de los cambios nucleotidicos del exón 4





Al calcular la diferencia entre alelos solo se calcularon dos veces, ya que los cambios encontrados se repitieron dos veces en dos pacientes y en el resto el cambio fue único.

Para los cambios que solo se presentaron una vez al comparar los casos con los controles no se encontró diferencia significativa (Cuadro 19).

Cuadro 19. Diferencia entre alelos y significancia de la bondad de ajuste con la prueba χ^2

	A	C	
Casos	79	1	80
Controles	80	0	80
Total	159	1	160
p= 0.31			

Para los cambios que solo se presentaron dos veces al comparar los casos con los controles no se encontró diferencia significativa (Cuadro 20).

Cuadro 20. Diferencia entre alelos y significancia de la bondad de ajuste con la prueba χ^2

	G	A	
Casos	78	2	80
Controles	80	0	80
Total	158	2	160
p= 0.15			

IX. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que trata de asociar al Gen PLAC9 con la presencia de una enfermedad en particular con preeclampsia-eclapmsia cuyo defecto en los procesos de migración trofoblastica (incompleta) son bien conocidos.

Asi mismo pone de manifiesto la importancia que reviste la identificación de genes en modelos animales cuyos genes ortologos pueden relacionarse con procesos fisiopatologicos en el humano (52).

La diferencia observada en las semanas de gestación entre los grupos es debido a que la mayoría de las mujeres con preeclampsia presentan la enfermedad entre las 27 a 35 semanas de gestación. Entre tanto que las mujeres con embarazo normal fueron captadas entre la semana 38 a 40 para asegurarnos de que estas mujeres no desarrollaran la enfermedad al final del embarazo.

En la medición de albumina en suero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos debido a que el tamaño de muestra era pequeño sin embargo se observa que las mujeres con preeclampsia tienen menor cantida de albumina que las mujeres con embarazo normal

Con excepción de las cifras tensionales sistólica y diastólica en donde encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos el resto de los parámetros evaluados no mostraron diferencia significativa

La evaluación de 40 sujetos en una población es suficiente para identificar polimorfismos con una frecuencia mayor o igual a 5% con intervalo de confianza del 95% (94). En nuestro estudio se evaluaron a 80 sujetos

Como puede apreciarse en el presente trabajo, no se desarrollo el analisis de las secuencias del exón 1 debido a que la calidad de las secuencias no fue la optima incluso despues de haber repetido los análisis, sin embargo los exones restantes

proveyeron de información que permitió establecer diferencias intergrupales y cumplir con nuestro objetivo.

Las mujeres con preeclampsia presentaron mayor número de variaciones que su pareja en una proporción estadísticamente significativa, lo que permite inferir que al menos para el Gen estudiado la participación de los alelos paternos es limitada. Esta misma tendencia de “asociación” con alelos maternos se ha descrito también para el Gen STOX 1 en el cual se vio herencia matrilineal en población holandesa (95).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de casos como el de controles para el exón 2 y 3, para el exon 4 no se encontró diferencia significativa al comparar ambos grupos; sin embargo debido a que los cambios no se repitieron en ninguno de los pacientes y/o controles, no podemos atribuir la presencia de la enfermedad a los cambios nucleotídicos encontrados

El haber encontrado cambios repetidos en solo dos de nuestros controles, no resta importancia a nuestro trabajo ya que nuestro objetivo fue encontrar diferencias nucleotídicas exónicas que no se han sido descrito previamente, pues hasta el momento solo han sido descritas dos mutaciones en región codificante del Gen PLAC9 mismas que no fueron encontradas en el presente estudio.

La disminución en los niveles de expresión de este Gen se han visto relacionados con el desarrollo de carcinoma oral de células escamosas (96), por lo que es evidente el papel que desempeña en los procesos de migración celular mismos que se encuentran alterados en las etapas tempranas de la preeclampsia.

X. CONCLUSIONES

- Se encontraron 43 variaciones no descritas previamente
- Estas variaciones serán depositadas en la base de datos del NCBI
- Se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados en relación a los cambios nucleotídicos para los exones 2 y 3.
- De los pacientes analizados solo dos (parejas de mujeres preeclámpticas) compartieron una variación; las variaciones restantes fueron únicas.
- Sera interesante evaluar algunos de estos cambios para tratar de asociarlos con otras enfermedades como el cáncer.

XI. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES

Resultara importante re-evaluar las secuencias faltantes del exón 1 así como eestablecer los patrones de expresión de este Gen en tejido placentario proveniente de mujeres con y sin la enfermedad estableciendo una relación funcional.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Bretelle, F., Sabatier, F., Blann, A., D'Ercole, C., Boutière, B., Mutin, M., Boubli, L., Sampol, J. & Dignat-George, F. 2001. Maternal endothelial soluble cell adhesion molecules with isolated small for gestational age fetuses: comparison with pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* pp. 1277-1282
2. Makhseed, M., Musini, V.M. & Ahmed, M.A. 1998. Association of fetal gender with pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, pp. 55-56
3. Brown M.A. 1999. Classification of the hipertensión in pregnancy. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 13, No. 1, pp. 27-39
4. Sibai. 2001. Hypertensive Disorders in Women. Chapter 2 Mild Gestational Hipertensión and Preeclampsia, pp. 9-23
5. Waterstone M, Bewley S, Wolfe C. 2001. Incidence and predictors of severe obstetric morbidity: case-control study, pp. 1089-93
6. Tálosi, G., Endreffy, E., Túri, S. and Németh I. 2000. Molecular and Genetic Aspects of preeclampsia: State of the art. *Molecular Genetics and Metabolism*, pp. 565-572
7. Chesley LE. 2006. Trastornos hipertensivos del embarazo. En: Hellman LM, Pritchard JA, eds. *Williams Obstetrics*. Traduc 14^a de Salvat Edit.
8. Gant NF, Chand S, Worley RJ. 1974. A clinical test useful for predicting the development of acute hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, pp. 1
9. Pacheco J. Preeclampsia-eclampsia. 2001. *Revista de la sociedad peruana de ginecología y obstetricia*, pp. 26-30

10. Walker, J.J. Severe pre-eclampsia and eclampsia. 2000. *Ballière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, pp. 57-71.
11. Sanchez Eulalia, Gómez Julio, Morales Victor. 2005. Preeclampsia severa, eclampsia, síndrome HELLP, comportamiento clínico. Servicio de ginecología y obstetricia. *Rev Fac Med UNAM Vol. 48 No.4*
12. Díaz de León PMA, Briones GJC, Moreno SAA, Briones VCG. 2006. La importancia de la medicina crítica en obstetricia. *Rev Asoc Mex Med Crit Ter Int*, pp. 142-146.
13. Villar J, Say L, Guñmezoglu M, Meriardi M, Lindheimer M, Betran A, Piaggio G. 2003. Eclampsia and pre-eclampsia: a world health problem for 2000 years. In: Critchley H, Maclean A, Poston L, Walker J, editors. *Pre-eclampsia*. London (UK): RCOG Bookshop; pp. 210-25.
14. Friedman SA. 1991. Fisiopatología de la preeclampsia. *Clín Perinatol*, pp. 4.
15. Cifuentes R. 1994. Hipertensión arterial y embarazo. *Obstetricia de alto riesgo*. 4ta. Ed. ASPRO MEDICA
16. Merviela P, Carbillon L, Challierb JC, Rabreaud M, Beaufilse M, Uzan S. 2004. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. Review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, pp. 134-47
17. Laura Lunghi, Maria E Ferretti, Silvia Medici, Carla Biondi and Fortunato Vesce. 2007. Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, pp. 6.
18. Ruchira Sood, James Zehnder, Maurice Druzin and Patrick Brown Vesce. 2006. Gene expression patterns in human placenta. Departments of *Biochemistry, Pathology, and Gynecology and Obstetrics, Stanford University, Stanford, CA 94305

19. Shin-Young Kim¹, Ji-Hyae Lim¹, Jae-Hyug Yang², Moon-Young Kim², Jung-Yeol Han², Hyun-Kyong Ahn², Jun-Seek Choi², So-Yeon Park¹, Mi-Jin Kim¹ and Hyun-Mee Ryu. Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) gene is not associated with preeclampsia 2008. BMC Medical Genetics, pp. 68
20. A, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Corrado F, D'anna R. : Acta Obstet Gynecol Scand. 2008. Endoglin, PIGF and sFlt-1 as markers for predicting preeclampsia, pp 837-42. Department of Gynecological, Obstetrical Sciences and Reproductive Medicine, University of Messina, Messina, Italy
21. Naicker T, Khedum SM, Moodly J, Pijnenborg R. Acta Obstet Gynecol Scand 2003. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia, pp. 722-9
22. Brosens IA, Renaer M. Br J Obstet Gynaecol. 1972. On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia, pp. 794-9
23. Vázquez RJG. Fundamentos en ginecología y obstetricia, 1^a ed. Mexico: Méndez Editores. 2004. Cap. 40. Preeclampsia-eclampsia. Asociación de Médicos Especialistas del Hospital de Ginecología y Obstetricia No 3 IMSS. AC, pp. 1.391- 1.398
24. Vázquez RJG. 1995. Fisiopatología y tratamiento del daño endotelial por toxemia del embarazo. Rev Asoc Med Crit Ter int, pp. 87-91
25. Landesman R, Douglas RG, Holze E. 1954. The bulbar conjunctival vascular bed in the toxemia of pregnancy. Am J Obstet Gynecol, pp. 170-83
26. Pritchard, JA, Cunningham FG, Pritchard SA. 1984. The Parkland Memorial Hospital protocol for treatment of eclampsia: Evaluation of 245 cases. Am J Obstet Gynecol, pp. 951-63.
27. Saleh AA, Bottoms SF, Farag AM, et al. 1992. Markers for endothelial injury, clotting and platelet activation in preeclampsia. Arch Gynecol Obstet, 105-10

28. Knox TA, Olans LB. 1996. Liver disease in pregnancy. *N Engl Med*, pp. 569-76
29. MacGillivray J. 1958. Some observations on the incidence of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp*, pp. 536-9
30. Benirschke, K. & Kaufmann, P. 2000. *Pathology of the Human Placenta* (Springer, New York).
31. Gluckman, P. D. & Hanson, M. A. 2004. *Science* 305, pp. 1733–1736.
32. Mastrobbatista JM, Skupski DW, Monga M, et al. 1997. The rate of severe preeclampsia is increased in triplet as compared to twin gestations. *Am J Perinatol*, pp. 263-5
33. Mattar F, Sibai BM. 2000. Eclampsia. VIII. Risk factors for maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*, pp. 307-12
34. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JR, et al. 1997. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, pp. 1669-72
35. Ferrazzani S, Caruso A, DeCarolis S, et al. 1990. Proteinuria and outcome of 444 pregnancies complicated by hypertension. *Am J Obstet Gynecol*, pp. 366-71
36. Metcalfe J, Romney SL, Ramsey LH, et al. 1955. Estimation of uterine blood flow in normal human pregnancy at term. *J Clin Invest*, pp. 1632-8
37. O'Shea TM, Dammann O. 2000. Antecedents of cerebral palsy in very low-birth weight infants. *Clin Perinatol*, pp. 285-302
38. Hemberger M and Cross J. 2001. Genes governing placental development. *TRENDS in endocrinology & metabolism*, pp. 162-168

39. Hernan D. Kopcow¹ and S. Ananth Karumanchi. 2007. Angiogenic Factors and Natural Killer (NK) Cells in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, pp. 23–29.
40. Nakatsukasa, Masuyama, Takamoto. 2008. Circulating Leptin and Angiogenic Factors in Preeclampsia Patients. Department of obstetrics and Gynecology, Okayama. *Endocrine journal*, pp. 565-573
41. Cross J. 2000. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Cell & Developmental Biology*, pp. 105-113
42. Rinkenberger J., Cross J and Werb Z. 1997. Molecular Genetics of implantation in the mouse. *Developmental Genetics*, pp. 6-20.
43. Cross, J.C. 2003. The Genetics of preeclampsia; a feto-placental or maternal problem? *Clin. Genet*, pp. 96-103
44. Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Murakami, K. And Fukamizu, A. 1996. Hipertensión induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science*, pp. 995-998
45. Kanayama, N., Takahashi, K., Matsuura, T et al., 2002. Deficiency in p57kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol. Hum. Reprod*, pp. 1129-1135
46. Sakawi, Y., Tarpey, M., Chen, Y.F., Calhoun, D.A., Connor, M.G., Chestnut, D.H. et al. 2000. Evaluation of low-dose endotoxin administration during pregnancy as a model of preeclampsia. *Anesthesiology*, pp. 1446-1455
47. Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P: 2004. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am J Med Genet Part*, pp. 365-371

48. Chappell S, Morgan L: 2006. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clin Sci*, pp. 443-458
49. Laivuori H: 2007. Genetic aspects of preeclampsia. *Front Biosci*, pp. 2372-2382
50. Maynard, S.E., Min, J.Y., Merchan, J. et al. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sflt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest*, pp. 649-658
51. Tetsuya S. Tanaka, Saied A. Jaradat, Meng K. Lim, George J. Kargul, Xiaohong Wang, Marija J. Grahovac, Serafino Pantano, Yuri Sano, Yulan Piao, Ramaiah Nagaraja, Hirofumi Doi, William H. Wood, III, Kevin G. Becker, and Minoru S. H. Ko. 2000. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray *PNAS*, pp. 9127-9132
52. Galaviz-Hernandez C, Stagg C, de Ridder G, Tanaka TS, Ko MS, Schlessinger D, Nagaraja R. 2003. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. *Gene*, pp. 81-9.
53. Broughton, F.P. 1999. Genetics of pre-eclampsia: ideas at the turn of the millennium. *Curr. Obst. & Gynaecol*, pp. 178-182
54. Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D. and Shalev, E. 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, pp. 59
55. Reynolds L, Redmer A. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction*, pp. 1033-1040
56. Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, pp. 249-257

57. Demir R, Kayisli UA, Cayli S et al. 2006. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta, pp. 535-539
58. Clark DE, Smith SK, He Y et al. 1998. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biology of Reproduction*, pp. 1540-1548
59. Banks RE, Forbes MA, Searles J et al. 1998. Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Molecular Human Reproduction*, pp. 377-386
60. Widmer M, Villar J, Benigni A et al. 2007. Mapping the theories of preeclampsia. *Obstet Gynecol*, pp. 168-80
61. Levine RJ, Lam CQ, Yu KF et al. 2006. Soluble endoglin and other circulating angiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, pp. 355:992-1005
62. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM et al. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of pre-eclampsia. *Nat Med*, pp. 642-9.
63. Arias Fernando: Guía. 1995. *Práctica para el Embarazo y el Parto de Alto Riesgo*. 2da. Edición. Mosby
64. *Clinicas Neurológicas de Norteamérica*. Vol. 3 1994.
65. Pérez Sánchez A., Donoso Siña E. 1992. *Obstetricia*. 2da. Edición. Mediterraneo
66. Robert J.A., y cols. 2001. *Hipertensión Arterial y Embarazo*. Revista Médica Clínica las Condes Santiago – Chile. Vol.12
67. Bacq Y, Riely C. 1999. *Liver in preeclampsia and HELLP [versión en CD-ROM]*. UpToDate, Inc. Windows

- 68.** Varios. 1996. Hypertension in pregnancy. American College of Obstetricians and Gynecologists. Technical Bulletins No 219. Committee on Technical Bulletins of the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int. J. Gynaecol. Obstet*, pp. 175-83
- 69.** Chesley LC. 1984. History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. *Clin. Obstet. Gynecol*, pp. 801-20
- 70.** Coonrod DV, Hickok DE, Zhu K, et al. 1995. Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: A population-based cohort study. *Obstet. Gynecol*, pp. 645-50
- 71.** Berkowitz RS, Goldstein DP. 2005. Gestational trophoblastic diseases, pp. 1055-1076
- 72.** Kavanagh JJ, Gershenson DM. 2007. Gestational Trophoblastic Disease: Hydatidiform Mole, Nonmetastatic and Metastatic Gestational Trophoblastic Tumor
- 73.** Mazur MT, Kurman RJ. 1994. Gestational trophoblastic disease and related lesions. En: Kurman RJ editor. *Blaunstein's pathology of the female genital tract*. 4th ed. New York: Springer-Verlag, pp. 1049-93
- 74.** De Agustín P, Ruiz A, López F, Contreras F. 1972. Patología de la enfermedad trofoblástica. *Simposio Enfermedad Trofoblástica*, pp. 79-98.
- 75.** Kajii T, Ohama K. 1977. Androgenetic origin of hydatidiform mole, pp. 633-4
- 76.** Berkowitz RS, Mostoufizadeh GhM, Kabawat SE, Goldstein DP, Driscoll SG. 1982. Immunopathologic study of the implantation site in molar pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, pp. 925-30
- 77.** Eskenazi B, Fenster L, Sydney S. 1991. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia, pp. 237-41

78. Li DK, Wi S. 2000. Changing paternity and the risk of preeclampsia in the subsequent pregnancy. *Am. J. Epidemiol*, pp. 57-62
79. Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity. 1996. A risk factor for preeclampsia in multiparas. *Emidemiology*, pp. 240-4
80. Vazquez RGJ. 2004. Preeclampsia-Eclampsia. En: Asociación de Médicos Especialistas del Hospital de Ginecología y Obstetricia No 3 IMSS. AC. Fundamentos de Ginecología y Obstetricia. 1ª ed. México: Méndez Editores, pp. 1,391-1,398
81. Vázquez RGJ. 1999. Aspectos nefrológicos de la preeclampsia-eclampsia: un enfoque dinámico. *Nefrología Mexicana*, pp. 29-36
82. Kovats S, Main EK, Librach C, et al. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, pp. 220-3
83. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. 1972. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Ann*, pp. 177-91
84. Coss JC, Werb Z, Fisher SJ. 1994. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science*, pp. 1508-18
85. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, et al. 1981. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by preeclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynecol*, pp. 876-81
86. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. 1992. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest*, pp. 210-22
87. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. 1997. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblast to mimic a vascular adhesion phenotype. Once

- cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, pp. 2152-64
- 88.** The MAGPIE Trial Collaborative Group. To women with preeclampsia, and their babies; benefit from magnesium sulphate. *Lancet*; 2002; 359: 1977-89.
- 89.** Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific síntesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol*, pp. 155: 335-350
- 90.** Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 25: 441–448
- 91.** Sanger F, Nicklen s, y Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Diciembre; 74(12): 5463–5467
- 92.** Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:560-4
- 93.** Walter Gilbert y Allan Maxam.1973. The Nucleotide Sequence of the lac Operator, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70: 3581–3584.
- 94.** Beatrice Saposnik, Jean-Luc Reny, Pascale Gaussem, Joseph Emmerich, Martine Aiach, and Sophie Gandrille. 2004. A haplotype of the *EPCR* gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis.
- 95.** Van Dijk, M. Mulders, J., Poutsma, A. Könst, A., Lachmeijer, A., Dekker, G., Blankenstei, M. and Oudejans, C. 2005 Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene familia. *Nature Genetics.* May;37(5):514-9.

- 96.** Chu Chen, Eduardo Méndez, John Houck, Wenhong Fan, Pawadee , Dave Doody, Bevan Yueh, Neal D. Futran, Melissa Upton, D. Farwell, Stephen M. Schwartz, and Lue Ping Zhao. 2008. Cancer Epidemiol Biomarkers. Gene expression profiling identifies genes predictive of oral squamous cell carcinoma. 17(8): 2152–2162.

XIII. ANEXOS

Anexo 1

Método de extracción de ADN de Dally y cols a partir de 500 μ L de sangre total con EDTA

1. Colocar 500 μ L de sangre periférica anticoagulada con EDTA
2. En un tubo de vidrio de 13X100 colocar 3.5 mL de Solución A de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; sacarosa 320 Mm; MgCl₂ 5 mM; y Tritón X-100 al 1%)
3. Mezclar 2 min en vortex
4. Centrifugar a 3,500 rpm por 10 min
5. Decantar.
6. Resuspender el botón celular en 1 mL de Solución B (Tris-HCl 400mM; EDTA 60 mM; NaCl 150 mM y SDS 1%)
7. Mezclar en el vortex
8. Añadir 250 μ L de perclorato de Sodio al 5 mM.
9. Mezclar a temperatura ambiente por 15 min (lentamente).
10. Incubar a 65° C por 30 min.
11. Añadir 1000 μ L de Cloroformo a -20° C.
12. Mezclar a TA por 10 min (lentamente).
13. Centrifugar a 3500 rpm por 10 min.
14. Se obtienen tres capas, y se transfiere la capa superior transparente (con pipeta pasteur) a otro tubo de 13X100.
15. Añadir 1000 μ L de etanol absoluto a 4° C.

16. Mezclar por inversión varias veces (lentamente)(10). Se observa una hebra semitransparente.
17. Transferir el contenido del tubo de 13X100 a un tubo eppendorf de 2.0 mL previamente rotulado.
18. Centrifugar a 13,000 rpm por 3 min y desechar el sobrenadante.
19. Lavar con 500 μ L de etanol al 80%.
20. Desechar el sobrenadante de etanol al 80%
21. Repetir el paso 20 y 21
22. Dejar secar el DNA por 10 min en el liofilizador
23. Resuspender en Agua libre de DNAsas y RNAsas Gibco® o Buffer Tris-EDTA 10/0.1.
24. Incubar a 64° C durante 60 min.
25. Conservar a 4° C.

Anexo 2

Electroforesis. Preparación de gel de agarosa al 0.7%

Para preparar un gel de agarosa al 0.7% en una cámara de electroforesis grande se siguió el siguiente procedimiento:

- Primeramente se pesaron .525grs de agarosa y se colocó en un matraz
- Se le agregaron 75mL de Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X con la finalidad de tener un gel al 0.7%
- Este matraz ya con el agarosa, y el TBE se calentó en un horno de microondas por dos minutos para deshacer los grumos de agarosa y dejarlo completamente en estado líquido
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente (sin solidificar) para introducirlo al cuarto oscuro y verterlo en vaso de precipitado
- Con el agarosa aún líquida en el vaso de precipitado se agregaron 8µL del colorante bromuro de etidio grado biología molecular a una concentración de 10mg/mL. Marca Promega®
- Enseguida se vació el agarosa en el contenedor de gel de la cámara de electroforesis y se le insertó el peine para que cuando solidificara los pozos quedaran formados para depositar la muestra.
- Durante el proceso de solidificación, se prepararon las muestras afuera del cuarto oscuro
- La preparación de las muestras fue de 5µL de muestra problema más 2µL de buffer de carga y para el marcador de peso molecular de 1kb plus, se agregaron 2µL de este marcador más 2µL de buffer de carga y 6µL de TBE1X
- Una vez solidificado el gel se retira la cinta de la cámara así como el peine
- Se cargó una muestra por cada pozo del gel.
- La cámara se conectó a la fuente de alimentación y se sometió a electroforesis a 100 volts durante una hora
- Visualizar el gel en un transiluminador para observar los resultados
- Tomar la fotografía al gel.

Anexo 3

Preparación de muestras para PCR

Para la preparación de cada una de las muestras para PCR de los 4 exones del Gen PLAC9, se utilizaron los reactivos y las cantidades de cada uno que se muestran en el cuadro

Preparación de PCR

	1X(μ L)	MIX	18X (μ L)
Buffer	2.5		40
MgCl₂	1		18
Primer F	0.66		11.88
Primer R	0.66		11.88
dNTPs	1		18
Amplicasa	0.2		3.6
H₂O	12.73		229.14
DMSO	1.25		22.5
DNA	5		
TOTAL	25μl		360/18=20
			20+5 DNA= 25 μl

Anexo 4

Corte de las bandas del gel de agarosa

- Una vez que se le tomo la fotografía al gel
- Se deja el gel sobre el transiluminador y se hizo el corte de las bandas amplificadas
- Este corte de bandas se hizo con un bisturí directamente cortándolas del gel
- Depositar las bandas cortadas en tubos eppendorf
- La persona que lo realice deberá estar protegida con bata, guantes, lentes contra luz ultravioleta y casco protector

Anexo 5

Purificación de las bandas. (QIAquick Gel Extraction Kit Protocol)

La purificación de las bandas se realizó con el siguiente procedimiento:

- Se pesó un tubo eppendorf de 0.6mL
- Se pesó el tubo con la banda cortada y se restó el peso del tubo para saber el peso de la banda cortada
- Se adicionaron 3 volúmenes de buffer QG por 1 volumen de gel (100mg-100µL). Por ejemplo, adicionar 300µL de buffer QG a cada 100mg de gel.
- Se incubaron los tubos a 50°C durante 10min hasta que el gel estuvo completamente disuelto dando vortex a cada tubo cada 2 minutos durante la incubación
- Después de que el gel se disolvió completamente, se chequeó que el color fuera amarillo similar al color del buffer QG para comprobar que el PH de muestra era óptimo para seguir el procedimiento
- Se adicionó 1 volumen de isopropanol en la muestra y se mezcló suavemente. Por ejemplo si se tienen 100mg de agarosa, adicionar 100µL de isopropanol
- No centrifugar al agregar el isopropanol solo mezclar suavemente.
- La muestra del tubo se pasó a la columna y se centrifugó por 1 min a 13000 rpm. El volumen máximo de muestra que ocupa la columna es de 800µL
- Se desechó lo que queda en el tubo donde está la columna
- Posteriormente se adicionó 500µL de buffer QG en la columna y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. Esto para remover las trazas de agarosa.
- Se decanta de nuevo lo que queda en el fondo del tubo
- Enseguida se lavó, adicionando 750µL de buffer PE en la columna y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto

Nota: Después de adicionar el buffer PE se dejó reposar por 5 min y después se centrifugó.

- Se decantó de nuevo lo que queda en el fondo del tubo
- Se dio una centrifugada adicional a 13000 rpm durante 1 minuto, con la finalidad de remover completamente residuos de etanol se desechó el tubo y solo se dejó la columna
- Se rotularon tubos de 1.5mL según las muestras que se estén procesando previamente estériles con la finalidad de introducir la columna ahí
- Una vez que se introdujo la columna en el tubo nuevo se adicionaron 30µL de buffer EB en el centro de la membrana de la columna y se dejó reposar durante 1 minuto, aumentando la concentración del DNA.
- Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto.
- Enseguida se desechó la columna dejando solo el tubo con el DNA purificado
- Este DNA purificado se analizó en gel de agarosa, adicionando 1µl de buffer de carga y 5µL de DNA purificado.
- El DNA purificado restante se almacenó a -20°C para su siguiente procesamiento que fue la secuenciación.

Anexo 6**Preparación de PCR con BigDye**

Para la preparación de PCR con BigDye se utilizaron los reactivos y las cantidades que se muestran en la tabla para cada uno de los exones.

Preparación PCR con BigDye. Gen PLAC9

	Buffer	Bigdye	Oligo	DNA	H₂O	DMSO	Total
Exón 1	3.5µL	0.5µL	1µL	2µL	3.0µL	0	10µL
Exón 2	3.5µL	0.5µL	1µL	2µL	3.0µL	0	10µL
Exón 3	5.0µL	1.0µL	1µL	5µL	2.5µL	0.5	15µL
Exón 4	3.5µL	0.5µL	1µL	2µL	2.5µL	0.5	10µL

Anexo 7

Purificación del producto de PCR con columnas de Centri-Sep™

Las columnas de centri-Sep™ se utilizan para la rápida y eficiente purificación de ácidos nucleicos. El gel centri-Sep proporciona una excelente recuperación de fragmentos de DNA, elimina mas del 98% de sales e impurezas no deseadas.

- Primeramente se quito a las columnas la tapa de arriba como la de abajo y se depositaron en un tubo eppendorf de 2mL
- Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos para eliminar el exceso de agua.
- Una vez cntrifugadas se paso cada una de las columnas a tubos eppendorf de 1.5mL
- A cada producto de PCR se le agregaro 10µL de agua inyectable
- Se pasaron 20µL de cada producto de PCR a las columnas y se cenrifugaron a 2200 rpm durante 2min.
- Una vez centrifugadas las muestras se pusieron a secar en un Vacufuge® 5301 Centrifugal Vacuum Concentrator por 20 minutos
- Una vez secas las muestras se resuspendieron con 20µL de formamida. La resuspensión se realizó manualmente con una micropipeta cada muestra se resuspendio por 3 minutos.
- Una vez resuspendidas las muestras se incubaron a 95° durante 5 minutos y se colocaron en hielo listas para procesar en el secuenciador.

Anexo 8

Preparación de las soluciones de trabajo

Preparación del TBE 1X para la elaboración de los geles de agarosa

Para preparar 4 litros de TBE 1X se pesaron los siguientes reactivos:

- 43.2 gramos de Trisma Base
- 22 gramos de Acido Bórico
- 16 mL de EDTA 0.5 molar

Se disolvieron cada uno de ellos en agua desionizada y se aforo con la misma agua hasta completar 4 litros.

Preparación de soluciones para el método de extracción de DNA con perclorato de sodio (Daly et al, 1998)

Solucion A de lisis (250mL)

- Sacarosa 320mM (PM 342.3).
 - Se pesaron 27.38gr
- MgCl₂ 5mM (PM 203.3)
 - Se preparó una solución stock al 100mM, para la cual se pesaron 5.08gr de MgCl₂ y se aforo a 250mL con agua desionizada.
 - De esta solución se tomaron 12.5mL para obtener la concentración de 5mM en la solución de lisis.
- Triton X-100 1%
 - Se agregaron 2.5mL por las paredes del matraz aforado evitando la agitación
- Tris-HCl 10mM (PM 157.56)
 - Se preparó una solución stock al 500mM a PH 8, para la cual se pesaron 19.62gr de Tris-HCl y se disolvió en 100mL de agua, una vez disuelto se aforo a 250mL.

- De esta solución se tomaron 5mL para obtener una concentración al 10mM en la solución de lisis.

Se agregaron los 27.38gr de sacarosa, 12.5mL de la solución stock de $MgCl_2$ al 5mM, 2.5mL de triton 1% y 5mL de la solución stock de Tris HCl 500mM en una matraz de aforación de 250mL y se aforo el resto con agua desionizada para así tener lista lo que fue la **solución A**.

Solución B (250mL)

- NaCl 150mM (PM 58.44)
 - Se pesaron 2.19gr
- EDTA 60mM (PM 372.20)
 - Se preparó una solución stock al 500mM a PH 8, para cual se pesaron 46.52gr de EDTA y se disolvió en 100mL de agua, una vez disuelto se aforo a 250mL.
 - De esta solución se tomaron 30mL para obtener una concentración al 60mM en la solución B.
- SDS al 1%
 - Se pesaron 2.5gr
- Tris-HCl 400mM
 - Se tomaron 200mL de la solución stock a 500mM de tris-HCl para obtener una concentración al 400mM en la solución B.

Se agregaron los 2.19gr de NaCl, 30mL de EDTA 60mM, 2.5gr de SDS 1% y 200mL de la solución stock de Tris-HCl 500mM en una matraz de aforación de 250mL y se aforo el resto con agua desionizada para así tener lista lo que fue la **solución B**.

Perclorato de Sodio (50mL)

- Perclorato de Sodio 5M (PM 122.44)
 - Se pesaron 30.61gr y en un matraz se aforo a 50mL

Buffer de carga (jugo azul)

- Azul de bromofenol 0.25%
- Xilene cianol 0.25%
- Ficoll (Tipo 400) en agua 25%
- De una solución 6X de buffer de carga se realizó una dilución 1 a 10 μ L de este buffer para utilizarlo en el corrimiento de las muestras en el gel de agarosa
- Para la dilución se tomó 1 μ l de buffer 6X mas 10 μ L de agua bidestilada para obtener una dilución de 1 a 10 μ L

Preparación de columnas de Sephadex™ G-50

- Se pesaron 4.1gr de sephadex se deposito en un vaso de presipitado de 200mL y se disolvio en 61ml de agua inyectable previamente esterilizada.
- El sephadex se puso en agitación durante dos horas a temperatura ambiente para terminar de disolverlo
- Pasado el tiempo se agrego a cada a cada columna 800 μ L de shepadex y se vortexearon para deshacer las burbujas.
- Se almacenaron a 20°C para su utlización.

Anexo 9

Cuestionario de recolección de datos de las(os) pacientes

PACIENTE			
Folio:	Hospital:	Expediente:	
Nombre:			
Edad:	Teléfono:		
Lugar de origen:			
Gestas:			
Partos:			
Abortos:			
Cesárea:			
Semnas de Gestación:			
AHF:			
AHF de Preeclampsia:			
APP:			
T/A (mmHg) al momento del diagnóstico:			
Proteinuria:	+	++	+++ y/o _____ mg/día
Edema:		Piernas	Manos Cara + ++ +++
Albumina:			
Plaquetas:			
Pruebas de Función Renal	Normales		Alteradas
Pruebas de Función Hepática	Normales		Alteradas
Preeclampsia Leve	Preeclampsia Severa	Eclampsia	HELLP
PAREJA			
Folio:			
Nombre:			
Lugar de origen:			
AHF de Preeclampsia:	si	no	Familiar: Mamá Hermana Abuela Tía
APP:			

Anexo 10

Carta de consentimiento

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Estudio molecular de genes asociados a invasión trofoblástica como probables marcadores predictivos para el desarrollo de preeclampsia-eclampsia.

RESPONSABLE: Dr. en C Carlos Galaviz Hernández. Profesor Investigador Titular Academia de Genómica Aplicada CIIDIR-IPN Unidad Durango

CORRESPONSABLES:

Dra. en C Liliana García Ortiz. Encargada de la División de Medicina Genómica. CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

Dra. María del Carmen Chima Galán. Médico especialista "A" adscrita a la División de Medicina Genómica. CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

Biol. Juan Carlos Pérez Razo. Biólogo adscrito a la División de Medicina Genómica. CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

Dr. Jose de Jesus Guijarro Bustillos Jefe del Servicio de Ginecología del Hospital General de Durango de la SSD

M. en C. Fernando Vázquez Alaniz Químico adscrito al Hospital General de Durango

Dr. en C Ismael Lares Assef Profesor Investigador Titular "C" Academia de Geonómica Aplicada CIIDIR-IPN Unidad Durango.

Dr. en Med. Jaime Salvador Moysén. Director del Instituto de Investigación Científica de la UJED.

INSTITUCIÓN: Hospital General de Durango. De los Servicios de Salud de Durango. SSD

JUSTIFICACIÓN: La preeclampsia-eclampsia (PE) constituye un problema de salud reproductiva en nuestro país con un alto índice de morbi-mortalidad. Las causas no se han establecido con precisión, sin embargo, la migración incompleta hacia el útero de ciertas células constituyentes de la placenta ha sido señalada como uno de los eventos iniciales de la enfermedad y se conoce que la mayoría de los genes que se expresan en la placenta provienen del padre. Por esto, se justifica estudiar algunos genes relacionados con dicha migración incompleta en mujeres con PE, mujeres embarazadas sin PE y sus respectivas parejas con el objeto de identificar marcadores potencialmente predictivos para el desarrollo de la enfermedad.

OBJETIVO: Evaluar e identificar cambios (polimorfismos) en los genes STOX1, KiSS1, INSL4, GPR54, PLAC8 y **PLAC9** asociados a migración celular incompleta en mujeres con preeclampsia-eclampsia y sus parejas y en mujeres con embarazo normal y sus parejas; para usarlos como marcadores predictivos de desarrollo de preeclampsia-eclampsia.

PROGRESIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: El proyecto incluirá 432 pacientes distribuidos como sigue: 108 pacientes con preeclampsia-eclampsia y sus respectivas parejas y 108 pacientes embarazadas sanas y sus respectivas parejas. A todos los sujetos de estudio, se les tomarán 5 ml de sangre periférica, de la que se hará extracción de DNA genómico para verificar su concentración y su pureza, se procederá a hacer evaluación de polimorfismos en los genes PLAC8, PLAC9, KISS-1, GPR54, INSL4 Y STOX1, a través de PCR en tiempo real con sondas de detección específicas. De igual forma, una vez resuelto el embarazo, se hará biopsia de tejido placentario en 20 pacientes por grupo de estudio (elegidas al azar) para evaluar los niveles de expresión de los genes antes mencionados. Con los resultados, se hará análisis comparativo de los genotipos entre las mujeres preeclámpicas y sus parejas, respecto a mujeres embarazadas sanas y sus parejas, para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados y se hará una correlación con los niveles de expresión de los genes en las placentas analizadas (20 por grupo).

LUGAR Y DURACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: La toma de muestra se realizará en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE; el Hospital Regional “1º de Octubre”, ISSSTE; el Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza”, ISSSTE, el Hospital General “Tacuba”, ISSSTE y el Hospital general de Durango SS, durante un periodo programado de 2 años. El procesamiento de las muestras se hará en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE y el CIIDIR-IPN Durango

Por lo anterior solicitamos su participación en este proyecto de investigación, para lo cual le exponemos las siguientes consideraciones:

- El grupo de investigación consultará su historia médica para obtener información pertinente al proyecto de investigación.
- En caso de aceptar, se hará la toma de 5 ml de sangre del antebrazo tanto a usted como a su pareja con el objeto de obtener DNA genómico.
- Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras llevándolas al anonimato; en otras palabras, después de que la muestra sea tomada, todos los identificadores que permitirían dar con usted, serán borrados. El investigador podrá decidir si incluye información específica con la muestra (como su edad, su sexo, o ciertos datos clínicos, patológicos o demográficos, etc...); esta información, sin embargo, no permitirá que usted sea identificado o localizado.
- El DNA obtenido de la muestra sanguínea se guardará en el Laboratorio de Medicina Genómica y Genética Clínica en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, bajo la responsabilidad de los investigadores relacionados al proyecto de investigación por 5 años después de finalizado el proyecto de investigación. Después del tiempo establecido, todas las muestras serán destruidas.
- Su muestra, una vez llevada al anonimato, podrá ser usada en otra(s) investigación(es) genética(s) en Preeclampsia-Eclampsia, aprobadas por el Comité de Ética. En dichas investigaciones se podría requerir de la entrega de muestras a otros investigadores incluyendo a aquellos de fuera de la Institución.
- Usted no recibirá beneficio personal de ninguna clase por su participación en este proyecto de investigación. Sin embargo, nosotros esperamos que los resultados obtenidos nos permitirán ampliar el conocimiento que se tiene para la identificación de marcadores predictivos para el desarrollo de la preeclampsia-eclampsia, por medio del estudio de polimorfismos en genes involucrados en el proceso de la invasión trofoblástica para poder identificar pacientes en riesgo de desarrollar la enfermedad.
- Aún cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios para la mayoría de la gente, esta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la punción.
- Toda la información obtenida acerca de usted y de los resultados de la investigación será tratada confidencialmente. Esta información será inmediatamente llevada al anonimato.

- Sus resultados personales no aparecerán en su historia médica, de tal manera que es imposible asociarlos con usted.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados o comunicados por otros medios, pero no serán relacionados con usted.
- Puesto que toda la información en este proyecto de investigación es llevada al anonimato, sus resultados personales no pueden estar disponibles para terceras personas como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros o instituciones educativas. Esto también se aplica a su cónyuge, a otros miembros de su familia y a su médico.
- Sin embargo, con la finalidad de asegurar el manejo apropiado de los datos de la investigación, es posible que un miembro de un Comité de Ética, un representante de Instituciones como la Secretaría de Salud puedan consultar los datos de su investigación, así como su historia clínica.
- Ya que sus datos han sido llevados al anonimato, se hace por lo tanto imposible comunicarle los resultados. A pesar de esto, usted se puede comunicar con el grupo de investigación para obtener información sobre el estado del trabajo o sobre los resultados generales del proyecto de investigación.
- Usted podrá reunirse con su médico tratante en cualquier momento y ante cualquier duda.
- El investigador principal y/o la institución tienen interés financiero en becas otorgadas por instituciones nacionales e internacionales que financien este proyecto de investigación.
- Puesto que su muestra será llevada al anonimato, será imposible destruirla a pesar de su petición.
- Los gastos incurridos en razón de su participación no serán reembolsados.
- Si desea información adicional de los miembros del grupo de investigación, en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar con el Dr. Carlos Galaviz Hernández en el siguiente número telefónico: (618) 8-14-20-91.
- Si usted quisiera discutir su participación con una persona que no este directamente involucrado en el proyecto (delegado, comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar a la Coordinación de Investigación del Hospital General de Durango con el Dr. Luis Angel Ruano Calderón Jefe de Enseñanza e Investigación al teléfono: (618) 8-13-00-11.

El (la) Dr(a) _____ nos explicó la naturaleza y el progreso del proyecto de investigación. Nos hemos familiarizado con el Formato de Consentimiento y hemos recibido una copia. Hemos tenido la oportunidad de hacer preguntas que han sido respondidas. Después de reflexionar, estamos de acuerdo en participar en este proyecto de Investigación.

Nombre (paciente/control):

Apellido:

Dirección:

Teléfono (casa):

Teléfono (trabajo)

Nombre (pareja/control):

Apellido:

Dirección:

Teléfono (casa):

Teléfono (trabajo)

Yo estuve presente durante el encuentro entre los miembros del grupo de investigación y el participante. Yo transcribí, para el participante, el Formato de Consentimiento y toda la información presentada en relación con el proyecto de investigación.

Nombre:

Firma:

Fecha:

Tanto el proyecto de investigación, como las condiciones de participación, se describieron al participante. Un miembro del grupo de investigación respondió las preguntas y explicó que la participación es voluntaria.

Nombre:

Firma del Investigador:

Fecha:

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA:

El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Durango en la Ciudad de Durango; Dgo.. a _____ de _____ de 20____.