



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO  
INTEGRAL REGIONAL UNIDAD DURANGO**

**COMPARACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -5312 C/T EN EL ENHANCER  
CORIÓNIC Y -11003 G/A EN EL ENHANCER RENAL DEL GEN *REN* ENTRE  
MUJERES CON PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA Y EMBARAZO  
NORMO-EVOLUTIVO**

## **TESIS DE POSGRADO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**

**ALUMNO:**

**CESAR DAVID PALOMAREZ GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. EN C. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ**

**Co DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. EN C. GERARDO MARTÍNEZ AGUILAR**

**Victoria de Durango; Dgo., Noviembre 2011.**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 12:00 horas del día 5 del mes de Diciembre del 2011 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:

**Comparación de los Polimorfismos -5312 C/T en el Enhancer Coriónico y -11003 G/A en el Enhancer Renal del gen REN entre mujeres con Preeclampsia-eclampsia y embarazo normo-evolutivo.**

Presentada por el alumno:

PALOMAREZ

GONZÁLEZ

CESAR DAVID

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	2	1	7
---	---	---	---	---	---	---

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

Dr. Gerardo Martínez Aguilar

Dra. Verónica Loera Castañeda

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Antonio Ávila Reyes

CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN 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 DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 10 de Febrero del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión Ordinaria No. 1 celebrada el día 12 del mes de Enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

**PALOMAREZ**

**GONZÁLEZ**

**CESAR DAVID**

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro: 

B	0	9	1	2	1	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Biomedicina

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
"Comparación de los polimorfismos -5312 C/T en el Enhancer Coriónico y -11003 G/A en el Enhancer Renal del gen REN entre mujeres con Preeclampsia-eclampsia y embarazo normo-evolutivo"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Buscar los polimorfismos de estos Enhancer y establecer su relación con la preeclampsia-eclampsia.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Carlos Galaviz Hernández y Dr. Gerardo Martínez Aguilar

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:

Directores de Tesis

Dr. Carlos Galaviz Hernández

Aspirante

Cesar David Palomarez González

Dr. Gerardo Martínez Aguilar

Presidente del Colegio

Dr. José Antonio Avila Rojas

CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
**C.I.I.D.I.R.**  
UNIDAD DURANGO  
1951



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **05** del mes de **DICIEMBRE** del año **2011**, el que suscribe **PALOMAREZ GONZÁLEZ CESAR DAVID** es alumno del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA** con número de registro **B091217**, adscrito a **CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ** y del **DR. GERARDO MARTÍNEZ AGUILAR** y cede los derechos del trabajo intitulado **“COMPARACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -5312 C/T EN EL ENHANCER CORIÓNICO Y -11003 G/A EN EL ENHANCER RENAL DEL GEN REN ENTRE MUJERES CON PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA Y EMBARAZO NORMO-EVOLUTIVO”** 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 **mitarea17@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**CESAR DAVID PALOMAREZ GONZÁLEZ**

Nombre y firma

## **LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO**

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO  
INTEGRAL REGIONAL DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL UNIDAD  
DURANGO.

## **AGRADECIMIENTOS.**

- ❖ AI CIIDIR-IPN-DURANGO.
- ❖ Al personal administrativo y directivo del centro.
- ❖ A mis maestros.
- ❖ Al Dr. José Bernardo Proal Nájera.

**DEDICATORIA.**



## INDICE

GLOSARIO .....	I
SIMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	IV
RELACIÓN DE TABLAS .....	VI
RELACIÓN DE FIGURAS .....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.2. Trastornos hipertensivos del embarazo.....	3
2.2.1. Clasificación de los trastornos hipertensivos del embarazo.....	3
2.3. Preeclampsia. ....	4
2.3.1. Definición de la preeclampsia-eclampsia.....	4
2.3.2. Clasificación de la Preeclampsia .....	5
2.3.3. Epidemiología. ....	6
2.3.4. Factores asociados a la Preeclampsia-eclampsia. ....	7
2.3.5. Fisiopatología de la enfermedad y cuadro clínico.....	8
2.3.6. Etiología de la preeclampsia-eclampsia y teorías propuestas. ....	9
2.3.7. Etiología genética de la enfermedad. ....	11
2.3.8. Marcadores de riesgo de la Preeclampsia-eclampsia.....	12
2.4. Fisiopatología molecular de la Preeclampsia-eclampsia y el sistema renina angiotensina. ....	15
2.4.1. Descripción del sistema renina angiotensina.....	16
2.4.2. Renina: activación del sistema renina angiotensina. ....	19
2.4.3. Gen <i>REN</i> .....	20
2.4.4. Métodos de identificación de mutaciones. ....	21
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	24
V. HIPÓTESIS. ....	24
VI. OBJETIVOS. ....	25
6.1. Objetivo General. ....	25

6.2. Objetivos Específicos.....	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7.1. Diseño del estudio.....	25
7.2. Universo.....	25
7.3. Criterios de Inclusión.....	26
7.4. Criterios de exclusión.....	26
7.5. Criterios de Eliminación.....	26
7.6. Variables.....	27
7.6.1. Variable Dependiente.....	27
7.6.2. Variable Independiente.....	27
7.6.3. Variables Intervinientes.....	27
7.7. Criterios de Pareamiento:.....	28
VIII. METODOLOGÍA.....	28
8.2.1. Metodología para el análisis del enhancer renal.....	30
8.3.1. Metodología para el análisis del enhancer Coriónico.....	31
8.4 Análisis estadístico.....	35
IX. RESULTADOS.....	36
9.1. Resultado del análisis genético del enhancer renal.....	39
9.2. Resultado del análisis genético del enhancer corionico.....	42
9.3 Haplotipos.....	45
X. DISCUSIÓN.....	48
XI. CONCLUSIONES.....	51
XII. SUGERENCIAS.....	51
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	52
XIV. ANEXOS.....	59
Anexo 1. Carta de consentimiento informado:.....	59
Anexo 2. Método de extracción de Dally y cols. A partir de 500 µl de sangre total con EDTA.....	62
Anexo 3. Protocolo para purificación de ADN a partir de sangre total. Kit Macherey-Nagel.....	63
Anexo 4. Preparación del gel de agarosa para electroforesis al 1%.....	64

Anexo 5. Reacción estandarizada de PCR para el enhancer renal. ....	65
Anexo 6. Oligonucleótidos utilizados para el enhancer renal.....	66
Anexo 7. Digestión del producto de PCR para el enhancer renal. ....	67
Anexo 8. Reacción estandarizada de PCR para el enhancer coriónico. ....	68
Anexo 9. Oligonucleótidos utilizados para el enhancer coriónico. ....	69
Anexo 10. Cortes de bandas del enhancer coriónico. ....	70
Anexo 11. Purificación del DNA a partir de geles de agarosa; QIAquick® Gel Extraction Kit. ....	71
Anexo 12. Reacción de secuencia del enhancer coriónico.....	72
Anexo 13. Precipitación de la reacción de secuencia big dye. ....	73

## GLOSARIO.

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico, unidad hereditaria de información.

**Arterias en espiral.** Ramas de la arteria uterina que se dirigen hacia la capa funcional superficial del endometrio; también llamadas ramas helicoidales.

**Citotrofoblasto.** Término que se emplea para la capa más interna del trofoblasto, unidas al sincitiotrofoblasto del embrión y que funciona como un anclaje para el corión embrionario al endometrio materno.

**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 de informar en forma escrita y oral los propósitos, beneficios y riesgos del estudio.

**Corion.** Tejido placentario externo que recubre el embrión humano y que colabora en la formación de la placenta.

**dNTP's.** Unidades básicas de construcción para la nueva molécula de ADN, utilizados en múltiples ensayos basados en la PCR.

**Edema.** O hidropesía es la acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial, además de en las cavidades del organismo.

**Electroferograma.** Estudio gráfico que muestra los resultados de la electroforesis por secuenciación, muestra la secuencia de bases nitrogenadas de las que se conforma la muestra de interés.

**Enhancer.** Región corta del ADN, potencializador de la expresión de un gen.

**Gen.** Secuencia de nucleótidos que codifica para un RNA o una proteína, es la unidad hereditaria.

**Haplotipo.** Combinación de alelos en dos o más loci genéticos en un mismo cromosoma que se encuentran estrechamente ligados y que suelen estar estadísticamente asociados.

**Morbilidad.** Es la cantidad de personas o individuos que son considerados enfermos o que son víctimas de enfermedad en un espacio y tiempo determinados.

**Mortalidad.** Número proporcional de defunciones en población o tiempo determinados. Se mide en relación con el total de una población, mediante el índice de mortalidad, que indica el número de defunciones registradas en un año por cada 1 000 habitantes.

**Oligonucleótidos.** Secuencia corta de ADN (8-50 pares de bases) sintetizada para utilizarse como sonda.

**PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa; técnica en la que una secuencia corta de ADN puede amplificarse  $>10^6$  por medio de 2 iniciadores oligonucleótidos próximos y ciclos repetidos de amplificación con ADN-polimerasa, a partir de una plantilla o molde de ADN.

**Placenta.** Es un órgano efímero presente en la mayoría de los mamíferos y que relaciona estrechamente al bebé con su madre y atiende las necesidades de respiración, nutrición y excreción del feto durante su desarrollo.

**Polimorfismo.** Variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, que se presenta con una frecuencia mayor al 1% en la misma.

**Preeclampsia-eclampsia.** Es una complicación médica del embarazo también llamada toxemia del embarazo y se asocia a hipertensión inducida durante el embarazo; está asociada a elevados niveles de proteína en la orina.

**Proteinuria.** Presencia de proteína en la orina en cuantía superior a 150 mg en la orina de 24 horas.

**Trofoblasto.** Grupo de células que forman la capa externa del blastocito, que provee nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta. Se forma durante la primera etapa del embarazo.

## SIMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.

AA-AT1	Auto anticuerpos AT1.
IMC	Índice de masa corporal.
C/T	C por T.
dL	Decilitro.
DMSO	Dimetol sulfóxido
EAS	Embarazadas aparentemente sanas.
ECA	Enzima convertidora de angiotensinógeno.
g	Gramos.
G/A	G por A.
HAE	Hipertensión asociada al embarazo.
HELLP	Hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia.
hr	Hora.
HAS	Hipertensión arterial sistémica.
Kg	Kilogramo.
µL	Microlitro.
min	Minuto
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio.
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercurio.
PEE	Preeclampsia-eclampsia.
SRA	Sistema renina angiotensina.
THE	Trastornos hipertensivos del embarazo.
PA	Presión arterial.
PAM	Presión arterial media.
TA	Tensión arterial.
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica.
°C	Grados centígrados.
OMS	Organización Mundial de la Salud.

pb            pares de bases.  
RPM          Revoluciones por minuto.

## RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Características de la PEE y Eclampsia.....	6
Tabla 2. Marcadores de riesgo para preeclampsia-eclampsia.....	14
Tabla 3. Comparación de los componentes de RAS en mujeres embarazadas normo-tensas y con PEE contra mujeres no embarazadas.....	18
Tabla 4. Comparación entre casos y controles de las variables medidas en el estudio.....	37
Tabla 5. Comparación entre casos y controles.....	37
Tabla 6. Diferencias de las características intragrupal de la población estudiada de casos comparando PEE severa contra PEE leve y significancia de la diferencia de medias con t de Student.....	38
Tabla 7. Diferencias de las características intragrupal de la población estudiada de casos comparando PEE severa contra PEE leve utilizando U de Mann-Whitney.....	39
Tabla 8. Frecuencias genóticas y alélicas del enhancer renal.....	40
Tabla 9. Frecuencias genóticas del enhancer renal.....	40
Tabla 10. Frecuencias alélicas del enhancer renal.....	41
Tabla 11. Frecuencias genóticas del enhancer renal comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve.....	41
Tabla 12. Frecuencias alélicas del enhancer renal comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve.....	42
Tabla 13. Frecuencias genóticas y alélicas del enhancer coriónico.....	42
Tabla 14. Frecuencias genóticas del enhancer coriónico.....	43
Tabla 15. Frecuencias alélicas del enhancer coriónico.....	43
Tabla 16. Frecuencias genóticas del enhancer coriónico comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve.....	44
Tabla 17. Frecuencias alélicas del enhancer coriónico comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve.....	44
Tabla 18. Comparación del genotipo del enhancer renal contra proteinuria.....	45

Tabla 19. Comparación del genotipo del enhancer coriónico contra proteinuria. ....	45
Tabla 20. Haplotipos entre casos y controles. ....	46
Tabla 21. Haplotipos comparados contra severidad. ....	46
Tabla 22. Haplotipos comparados contra PEE severa y controles. ....	47

## RELACIÓN DE FIGURAS.

Figura 1. Ubicación del estado de Durango; México.....	7
Figura 2. Secuencia de los eventos patofisiológicos de Preeclampsia-eclampsia..	9
Figura 3. Invasión trofoblástica normal y preeclampsia .....	16
Figura 4. Cascada enzimática del sistema renina-angiotensina.....	17
Figura 5. Mecanismos hipertensinógenos de la angiotensina II .....	19
Figura 6. Enhancer renal (KE) y coriónico (CE) en la región intergénica de los genes KiSS 1 y REN.....	21
Figura 7. Secuenciación. ....	23
Figura 8. Muestra gel de agarosa con ADN íntegro. ....	29
Figura 9. Comprobación de PCR. Con algunas muestras de los casos y escalera 50pb.....	30
Figura 10. Muestra la comprobación de la digestión de algunas de las muestras de los casos.....	31
Figura 11. Homocigoto GG enhancer coriónico. ....	33
Figura 12. Homocigoto GA enhancer coriónico. ....	34
Figura 13. Homocigoto AA enhancer coriónico. ....	35
Figura 14. Diagrama del agrupamiento de las muestras.....	36

## RESUMEN.

### COMPARACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -5312 C/T EN EL ENHANCER CORIÓNICO Y -11003 G/A EN EL ENHANCER RENAL DEL GEN *REN* ENTRE MUJERES CON PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA Y EMBARAZO NORMO-EVOLUTIVO

**Objetivo.** Determinar la asociación de los polimorfismos -5312 C/T del enhancer coriónico y -11003 G/A del enhancer renal del gen *REN* con la PEE.

**Material y método.** Estudio de casos y controles en el que el grupo de casos se integró por 50 mujeres diagnosticadas con preclampsia-eclampsia, y el grupo control por 48 mujeres con embarazo normo evolutivo. La enfermedad se clasificó y diagnosticó de acuerdo a los criterios de Sibai. Los grupos se parearon por semanas de gestación, edad cronológica y número de partos. Se excluyeron aquellas mujeres con enfermedades subyacentes como lupus, diabetes, enfermedades renales, hipertensión crónica y consumo de tabaco. Se obtuvieron datos clínicos de la población y se hizo el análisis de los polimorfismos. El polimorfismo -5312 C/T del enhancer coriónico fue evaluado a través de secuenciación automatizada y el polimorfismo -11003 G/A en el enhancer renal, a través de RFLP.

**Resultados.** No se encontró asociación entre el polimorfismo -11003 G/A del enhancer renal del gen *REN* con la PEE.

No fue posible detectar el polimorfismo -5312 C/T del enhancer coriónico, sin embargo se observó una variación nucleotídica G/A en la posición -5320, 8 pb corriente arriba del sitio donde originalmente se buscaba el polimorfismo. El análisis de esta nueva variación no mostró diferencias significativas en las poblaciones de estudio. La evaluación de los haplotipos no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio, sin embargo se encontró una mayor frecuencia del genotipo GG del enhancer renal en las pacientes con preeclampsia severa sin alcanzar diferencias significativas.

**Conclusiones.** Los polimorfismos estudiados en los enhancers del gen *REN* no se asociaron con la presencia de preeclampsia.

Se detectó un nuevo polimorfismo G/A en nuestra población, localizado en la posición -5320.

El estado homocigoto GG del polimorfismo -11003 del enhancer renal se encontró más frecuentemente en las pacientes con preeclampsia severa. Por esto último es importante incrementar la población de estudio con el objeto de evaluar la tendencia antes mencionada.

## ABSTRACT

### COMPARISON OF CORIONIC ENHANCER -5312 C/T AND KIDNEY ENHANCER - 11003 G/A POLYMORPHISMS OF *REN* GENE AMONG WOMEN WITH PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA AND NORMOEVOLUTIVE PREGNANCY.

**AIM:** To determine the association of the chorionic enhancer -5312 C/T and kidney enhancer -11003 G/A polymorphisms of the *REN* Gene with preeclampsia-eclampsia (PEE).

**METHODS AND MATERIALS.** Case-control design. Cases group was integrated by 50 preeclampsia-eclampsia patients, and the control group by 48 normoevolutive pregnancy women. The disease was classified and diagnosed according to Sibai's criteria. The groups were matched by weeks of gestation, age and number of deliveries. Patients with underlying diseases such as lupus, diabetes, kidney diseases, chronic hypertension and tobacco consumption were excluded. Clinical data from studied population were collected as well as polymorphism analysis. The chorionic enhancer polymorphism -5312 C/T were evaluated through automated sequencing while -11003 kidney enhancer was assessed by RFLP analysis..

**RESULTS.** No association was found between kidney enhancer -11003 G/A polymorphism of the *REN* Gene with PEE. It was not possible to detect the polymorphism -5312 C/T of the chorionic enhancer; however a new nucleotide variation G/A in position -5320 was found, 8 bp upstream the original polymorphic position. This new variation did not showed significant differences between groups, neither haplotypes analyzed. Nevertheless, a trend for GG genotype in kidney enhancer was noticed in severe preeclamptic patients without reach statistic differences.

**CONCLUSIONS.** The studied polymorphisms on *REN* gene enhancers were not associated with preeclampsia.

A new polymorphism G>A, in position -5320 was found in our population.

The homozygous state GG in kidney enhancer -110003, was found more frequently in severe affected patients. This trend make necessary to increase the studied population.

## I. INTRODUCCIÓN.

Los trastornos hipertensivos del embarazo (THE) constituyen un factor de riesgo para la morbi-mortalidad materna fetal en la población mundial incluyendo nuestro país. Las estadísticas reportadas indican que los trastornos hipertensivos del embarazo son la principal causa de muerte en mujeres embarazadas y determinan una proporción elevada de complicaciones maternas y fetales, presentándose entre el 10 y el 14% de todas las gestantes.

Entre los THE está la preeclampsia-eclampsia (PEE). Esta se define por el incremento de la presión arterial sistólica  $>140\text{mmHg}$  y diastólica  $>90\text{mmHg}$  acompañada de proteinuria ( $>300\text{ mg/L/24 horas}$ ) que aparecen después de la 20a semana de gestación. Existen diferentes pruebas que se han utilizado tratando de identificar a mujeres en riesgo de padecer la enfermedad. Entre ellas destacan el roll-over test; sin embargo resultados preliminares de una revisión sistemática conducida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), demuestran que las pruebas de detección tienen un bajo potencial predictivo para esta enfermedad. Fisiopatológicamente se encuentra una invasión anormal de los trofoblastos hacia las arterias espirales miometriales, lo que provoca que la modificación de estas arterias sea inadecuada generando un sistema vascular de alta resistencia. Por otro lado se encuentra una alteración endotelial generalizada con alteraciones importantes a nivel renal. La enfermedad puede resultar catastrófica si pasa inadvertida, sin tratamiento o si evoluciona hacia eclampsia. Su etiología no se conoce y se han estudiado diversas condiciones predisponentes, tales como: primer embarazo, edad materna extrema sobre todo cuando ésta es menor de 18 o mayor de 35 años, exposición limitada al esperma, mayor masa trofoblástica, etc.

Uno de los sistemas asociados recientemente con la enfermedad es el sistema renina angiotensina (SRA), este es un regulador crítico de la homeostasis electrolítica y la presión arterial en mamíferos. Existe evidencia sobre la existencia de un SRA placentario local constituido por renina, angiotensinógeno y quimasa [Un análogo de la enzima convertidora de angiotensinogeno (ECA)]. La renina es una aspartil proteasa que consta de 406 aminoácidos y en su forma madura contiene 340

aminoácidos y tiene una masa de 37kDa. Su fuente primaria son las células yuxttaglomerulares renales y el tejido coriodecidual de la membrana fetal; esta inicia la cascada enzimática del SRA y resulta en la producción del péptido vaso-activo angiotensina II (Ang-II), el principal efector del SRA. El gen que codifica a renina es *REN* localizado en el cromosoma 1q32, tiene 169 SNP's, 15 de ellos en regiones codificantes, su longitud es de 24 kb, y tiene expresión a nivel placentario y renal. Se han encontrado alteraciones en el SRA en pacientes afectadas con PEE destacando variaciones en la expresión del gen *REN*, estas son determinadas por la presencia de elementos enhancer (potenciadores) localizados a nivel renal y placentario, resultando pertinente el estudio de los polimorfismos -5312 C/T en el enhancer coriónico y -11003 G/A en el enhancer renal del gen *REN* en pacientes con PEE, comparadas con mujeres con embarazo normo-evolutivo.

## II. ANTECEDENTES.

### 2.2. Trastornos hipertensivos del embarazo.

Son problemas médicos importantes que determinan una proporción elevada de complicaciones maternas y fetales. Se presentan entre el 10 y el 14% de todas las gestantes y constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad materna, fetal y neonatal <sup>(1) (2)</sup>.

#### 2.2.1. Clasificación de los trastornos hipertensivos del embarazo.

De acuerdo a la revista internacional de ginecología y obstetricia los trastornos hipertensivos del embarazo se clasifican de la siguiente manera <sup>(3)</sup>

- Hipertensión asociada al embarazo (HAE), definida como presión arterial (PA) sistólica >140 mm Hg y PA diastólica > 90 mm Hg y proteinuria < 3 g/L/24 horas.
- Hipertensión gestacional con aparición antes de las 20 semanas de gestación sin presencia de proteinuria.
- Hipertensión con preeclampsia sobreimpuesta.
- Preeclampsia, aparición de hipertensión arterial sistémica (HTAS) después de la semana 20 de gestación asociada a proteinuria (>3g/L/24 horas); y eclampsia, cuando además de hipertensión y proteinuria aparecen convulsiones.

## **2.3. Preeclampsia.**

### **2.3.1. Definición de la preeclampsia-eclampsia**

La preeclampsia-eclampsia (PEE) es un desorden específico del embarazo, definida como el incremento de la presión arterial sistólica  $>140\text{mmHg}$  y diastólica  $> 90\text{mmHg}$  acompañada de proteinuria ( $>3\text{g/L}/24$  horas) y edema, que aparecen después de la semana 20 de gestación <sup>(4)</sup>.

Los cambios patológicos vistos en la PEE son principalmente isquémicos, afectando la placenta, riñón, hígado, cerebro y otros órganos. La causa de la PEE es desconocida, sin embargo se ha propuesto: la invasión incompleta del trofoblasto, el trastorno endotelial y las respuestas inmunes anormales, como factores posibles. Puede resultar catastrófica si pasa inadvertida, sin tratamiento o si evoluciona hacia eclampsia <sup>(5)</sup>. El tratamiento adecuado requiere tener presentes los cambios normales de la presión arterial y del volumen intravascular que tienen lugar durante el embarazo. El medicamento más común es la metildopa, antihipertensivo que constituye un fármaco de primera línea basado en los reportes de estabilidad del flujo útero placentario; otros medicamentos utilizados son: hidralacina, betabloqueadores, labetalol y los antagonistas de los canales de calcio (hipotensores) <sup>(6)</sup>. La preeclampsia se caracteriza por proteinuria asociada o no a edema, en su forma severa presenta oliguria, edema pulmonar, disfunción hepática, trastornos de la coagulación, elevación de la creatinina sérica, trastornos visuales y dolor epigástrico. Las pacientes con preeclampsia pueden evolucionar a eclampsia, que se caracteriza por ser un proceso convulsivo sin antecedente de enfermedad neurológica y se presenta en el 0.3% de los embarazos <sup>(7)</sup>. Algunas mujeres embarazadas desarrollan a su vez el síndrome HELLP, caracterizado por alteraciones bioquímicas que evidencian hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia <sup>(8)</sup>. La PEE constituye un síndrome complejo donde la PA alta y la afectación renal representan solo 2 elementos relevantes de este cuadro <sup>(9)</sup>.

### 2.3.2. Clasificación de la Preeclampsia.

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

- **Preeclampsia leve.** Con cifras de tensión arterial de 140-160mmHg la sistólica y de 90-110 mmHg la diastólica 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 g en 24 horas, edema o incremento rápido de peso sin evidencia de edema.
- **Preeclampsia grave o severa.** Con cifras de tensión arterial sistólica de más de 160 y hasta 180 mmHg o diastólica mayor de 110 mmHg, proteinuria >5g/24 hr, creatinina sérica mayor de 1.2 mg/dl. Otras características de la PEE severa incluyen oliguria <500ml/24hrs, disturbios visuales o cerebrales, edema pulmonar y cianosis, hemólisis microangiopática, elevación de los niveles de alanino o aspartato aminotransferasa, recuento de plaquetas menor de 100,000/ml, oliguria <500ml/24 hr, edema pulmonar, cefalea, dolor epigástrico y papiledema <sup>(10)</sup>.
- **Eclampsia.** Es una complicación de la enfermedad en la que además de los anteriores criterios se presentan convulsiones de difícil control sin otra causa subyacente. Por otra parte, puede presentarse el síndrome HELLP, acrónimo que identifica la hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia. <sup>(11)</sup>, síndrome hemolítico urémico <sup>(12)</sup>, hígado graso en el embarazo (AFLP por sus siglas en inglés) <sup>(13)</sup> y hemorragia cerebral <sup>(14)</sup>.

Los datos se resumen en la tabla 1

Tabla 1. Características de la PEE y Eclampsia.

Manifestación	Preeclampsia		Eclampsia ****†
	Leve *	Severa **	
Presión Arterial	≥140/90mm Hg	≥160/110 mm Hg	≥185/115 mm Hg
Edad gestacional de inicio	Después de la semana 20	Después de la semana 20	Después de la semana 20
Proteinuria	≥ 300mg y <5g en 24 hrs.	≥5g en 24 hrs.	≥10g en 24 hrs
Edema		Generalizado	Generalizado
Convulsiones y/o estado de coma			Después de la semana 20.

\*Harrison y cols; 1997.

\*\*Talosí y cols; 2000.

\*\*\* Eulalia y cols; 2006. <sup>(15)</sup>

†La ausencia de proteinuria y las cifras tensionales menores a 185/115 mm Hg no excluye el diagnóstico de PEE.

### 2.3.3. Epidemiología.

La PEE constituye la más grave de las complicaciones hipertensivas específicas del embarazo <sup>(16)</sup>. En países donde el control prenatal no es adecuado, la PEE explica el 40-80% de las muertes maternas, estimándose un total de 50,000 por año. En México, la enfermedad es la principal causa de muerte materna representando el 30% de los casos y es además la primera causa de ingreso de pacientes embarazadas a las unidades de terapia intensiva <sup>(17)</sup>. En el 2004, Durango (figura 1), se encontró entre los estados con mayor mortalidad materna debido a los trastornos hipertensivos con 33% siendo 1.8 mayor el riesgo de fallecimiento por esta causa que el reportado a nivel nacional y 8 veces superior comparado con Nuevo León <sup>(18)</sup>.

Figura 1. Ubicación del estado de Durango; México.



Los casos de eclampsia ocurren en aproximadamente en 1 % de las mujeres con preeclampsia. La hipertensión gestacional es diagnosticada cuando la presión sanguínea es elevada y sin proteinuria, desarrollada antes de la vigésima semana de embarazo y si la presión sanguínea regresa a sus valores normales dentro de las primeras semanas después del parto <sup>(19)</sup>. Una de cada cuatro mujeres con hipertensión gestacional desarrollan proteinuria y esta progresa a preeclampsia <sup>(20)</sup>.

#### **2.3.4. Factores asociados a la Preeclampsia-eclampsia.**

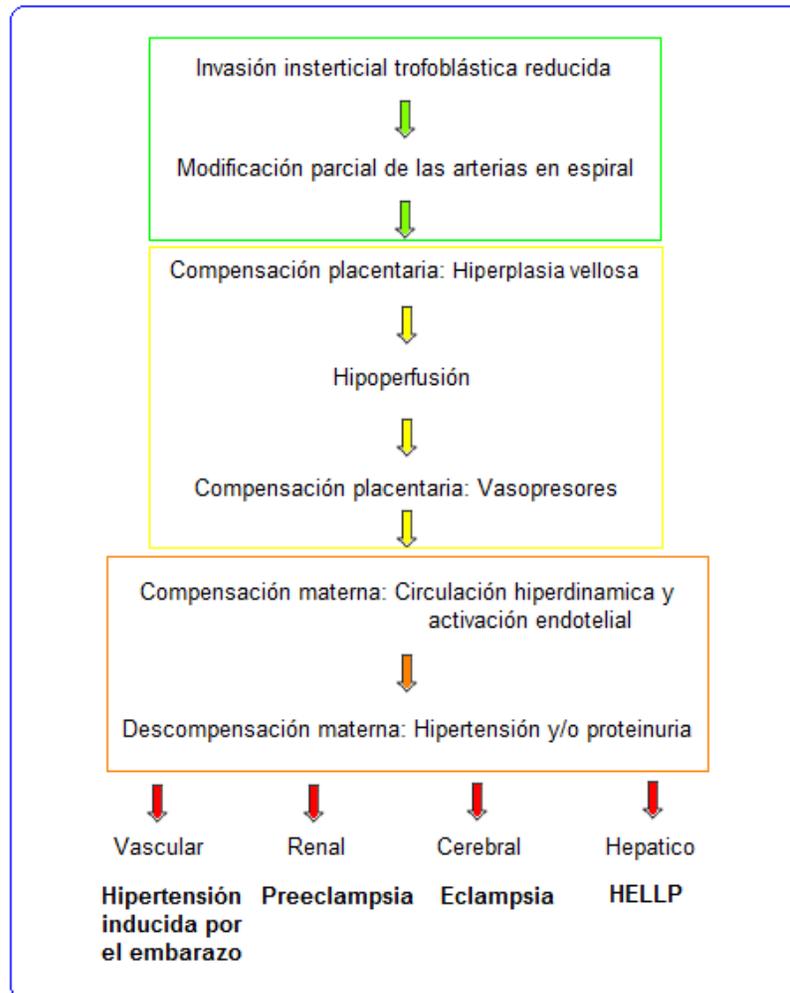
Aun no han sido identificados los factores relacionados con la PEE <sup>(21)</sup>, dentro de los observados están: primer embarazo, edades maternas extremas, sobre todo cuando ésta es menor de 18 o mayor de 35 años, exposición limitada al esperma <sup>(15)</sup>, desnutrición, bajo nivel de instrucción, embarazo molar, diabetes, lupus eritematoso, embarazos con productos múltiples y los cambios de pareja <sup>(22)</sup>. También se demostró que la fracción soluble de tirosina quinasa (sFlt 1), antagonista del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), se encuentra incrementado en la circulación en pacientes con PEE <sup>(23)</sup>. Otros factores asociados a un riesgo elevado son:

obesidad previa al embarazo, deficiencia de proteína S, presencia de anticuerpos anticardiolipina, factores genéticos como historia familiar, donde se evidencia que las madres o hermanas de pacientes que han presentado preeclampsia tienen una incidencia 4 veces mayor de la enfermedad <sup>(7)</sup>. Así mismo, los embarazos con productos múltiples son un importante factor de riesgo para que se presente PEE, ya que se asocia a un mayor tamaño de la placenta. La diabetes tipo 1 ha sido implicada también como factor de riesgo para el desarrollo de PEE debido a la alteración en el metabolismo de lípidos en comparación con mujeres sin diabetes, el incremento de la actividad lipídica y la alta concentración de ácidos grasos libres en suero, también se ha asociado a la enfermedad <sup>(24)</sup>.

### **2.3.5. Fisiopatología de la enfermedad y cuadro clínico.**

La patogénesis de la preeclampsia está dada por una invasión anormal de las arterias espirales miometriales, lo que provoca que la modificación de estas arterias sea inadecuada, presentándose hipoperfusión con incremento en la síntesis de tromboxanos y decremento en la producción de prostaciclina. La compensación materna se activa a nivel endotelial y a través de la circulación hiperdinámica, lo que llevará a la descompensación materna con presencia de valores elevados de presión arterial y proteinuria <sup>(25)</sup> (Figura 2).

Figura 2. Secuencia de los eventos patofisiológicos de Preeclampsia-eclampsia.



Los eventos tempranos de PEE se presentan a nivel placentario local, mientras que los síntomas clínicos se presentan en las etapas avanzadas del embarazo. Eva M.L. Smets y cols. 2005.

### 2.3.6. Etiología de la preeclampsia-eclampsia y teorías propuestas.

La etiología de la PEE no se conoce y se han estudiado diversas condiciones patológicas, entre ellas una invasión incompleta del trofoblasto, la intolerancia

inmunológica entre la madre y el feto, la predisposición genética, la acumulación de triglicéridos citotóxicos en las células endoteliales y la falta de expresión de HLA-G en la superficie de los citotrofoblastos <sup>(1)</sup>. Si bien parece no existir una explicación única, todas estas condiciones podrían contribuir a la presencia de las manifestaciones clínicas características de esta enfermedad <sup>(1)</sup> y formar parte de una alteración en el funcionamiento de la placenta, principal órgano respiratorio, de excreción, metabólico y endocrino de la vida fetal <sup>(26)</sup>.

Las investigaciones de base inmunológica sobre la preeclampsia-eclampsia son limitadas debido a la poca comprensión de las interacciones materno-fetal-paterno <sup>(27)</sup>. La PEE es una enfermedad con mayor frecuencia en primigestas, las mujeres que usan barreras anticonceptivas tienen dos veces más riesgo de presentar PEE <sup>(28)</sup>. Según Dekker en el estudio: "Oral toleration to paternal antigens and preeclampsia"; en el grupo de mujeres preeclámpicas, 44% de ellas practicaban sexo oral con su pareja antes del embarazo, mientras que en el grupo de mujeres sanas solo el 82% <sup>(29)</sup>. Una de las principales hipótesis inmunológicas versa sobre la mala adaptación de la respuesta inmune y la invasión trofoblástica deficiente, bajo la influencia de citocinas producidas en diversas células del sistema inmune y no inmune incluyendo leucocitos, células natural killer, trofoblastos, células del estroma y endotelio <sup>(30)</sup>. Se ha observado que la exposición prolongada al semen del que será el padre, otorga protección contra el desarrollo de preeclampsia <sup>(31)</sup>. Lo anterior sugiere firmemente que la exposición oral al antígeno linfocítico humano soluble del semen, puede conllevar la tolerancia inmunológica y de trasplante <sup>(32)</sup>. Por el contrario, la inseminación artificial, donación de ovocito, embarazos gemelares, cambios de pareja y primigravidez, resultan en un incremento sustancial del riesgo para desarrollar PEE <sup>(33)</sup>. Otros agentes que se han estudiado son: interleucina-10 sérica <sup>(34)</sup>, TNF- $\alpha$  <sup>(35)</sup> y radicales libres <sup>(36)</sup>.

### 2.3.7. Etiología genética de la enfermedad.

Se ha mostrado una tendencia familiar a desarrollar PEE y el modelo de herencia ha sido discutido extensamente. La probabilidad de que exista una interacción entre los genes maternos con genes paternos para la predisposición o como causa de la enfermedad, es todavía una pregunta sin respuesta <sup>(37)</sup>.

Con la intención de evaluar la contribución de los genes y el medio ambiente en el desarrollo de la enfermedad, se han conducido estudios en gemelas monocigotas encontrando porcentajes de heredabilidad tan altos como 55% con contribución no solo de genes maternos sino de genes fetales <sup>(38)</sup>. El estudio más reciente de este tipo fue llevado a cabo en Australia en el año 2001, en éste se consideraron gemelas monocigotas y dicigotas y parejas de estas que en algunos casos fueran hermanos mono y dicigotos sin encontrar concordancia entre pares de gemelas para la enfermedad leve o severa <sup>(39)</sup>.

Ninguno de los estudios llevados a cabo hasta el momento, ha permitido establecer un patrón hereditario definido para la preeclampsia. La predisposición genética a la enfermedad parece ser el producto de la acción concertada de diferentes genes, que en forma aditiva determinan la susceptibilidad genética a desarrollarla.

Una de las estrategias para la asociación de genes con un fenotipo o enfermedad particular es la evaluación de genes candidatos. Estos deben estar localizados en regiones identificadas a través de análisis de ligamiento y estar relacionados con alguno(s) de los proceso(s) fisiopatológicos de la enfermedad.

Se han evaluado al menos 158 genes en la PEE, los cuales se relacionan con diferentes rutas fisiopatológicas relevantes en la enfermedad, tales como aquellos que determinan la expresión de proteínas vasoactivas, trombofilias e hipofibrinólisis, estrés oxidativo y metabolismo de lípidos, daño endotelial y procesos inmunes.

La mayoría de los resultados obtenidos no son concluyentes con respecto a la causalidad de la enfermedad, y el rol que desempeñan varía desde la expresión de biomoléculas hasta invasión trofoblástica <sup>(40)</sup>. Estos genes pueden tener potencial como marcadores moleculares predictivos del desarrollo de la preeclampsia o en la detección de este síndrome. Actualmente, el objetivo principal es la identificación de

factores expresados en la placenta en mujeres con PEE y la probabilidad de usarlos para su predicción o detección temprana <sup>(41)</sup>, tales como *REN* cuyo principal órgano de expresión después del riñón es la placenta <sup>(42)</sup>.

La impronta genómica se refiere a la expresión del fenotipo de la enfermedad dependiendo de si el alelo mutante o el cromosoma anómalo ha sido heredado de la madre o del padre <sup>(43)</sup>, diversos genes en grupos conservados expresan solamente el alelo materno o paterno. Muchos de estos genes tiene efecto sobre el desarrollo embrionario, el desarrollo de los trofoblastos o en el desarrollo fetal <sup>(44)</sup>. Algunos estudios relacionan el desarrollo de PEE a la expresión de genes maternos; se ha encontrado una alta frecuencia en embarazos con gemelos dicigotos debido a una relación entre el gen E requerido para la placentación trofoblástica normal con PEE. La impronta de este gen es de origen paterno, lo que permite que solo el alelo materno sea expresado en el feto; sí este alelo materno tiene mutaciones o está ausente, la preeclampsia es inducida en la madre. Esta hipótesis explica fácilmente la discordancia de gemelos monocigotos <sup>(45)</sup>. Un estudio de Yu y cols. demostró que la pérdida de la impronta del gen H19 en tejido placentario de pacientes con preeclampsia-eclampsia, puede estar asociada con hipertensión severa contribuyendo con el proceso patogénico de PEE, lo cual representa un nuevo mecanismo mutacional en la patogénesis de la enfermedad <sup>(46, 47)</sup>.

### **2.3.8. Marcadores de riesgo de la Preeclampsia-eclampsia**

Existen diferentes pruebas que se han utilizado para tratar de identificar a mujeres en riesgo de padecer la enfermedad. Entre ellas destacan el roll-over test <sup>(48)</sup> que mostró una correlación significativa con la severidad de la enfermedad, en 50 mujeres con PEE leve.

Los marcadores de riesgo para PEE están disponibles entre el segundo y el tercer trimestre, se basan en los cambios fisiopatológicos que caracterizan a la PEE y preceden a la enfermedad clínica. La evaluación de los marcadores puede llevarse a

cabo a través de la medición de los siguiente parámetros: ultrasonografía Doppler de la arteria uterina, usado en el segundo trimestre <sup>(49)</sup>, resistencia vascular, endocrinología de la placenta fetal, función endotelial, interacción endotelial plaquetaria, estrés oxidativo, factores de circulación anti-angiogénicos <sup>(50)</sup>, endoglina soluble, proteína de placenta 13, proteína plasmática A asociada al embarazo y apolipoproteína E <sup>(51)</sup>. La evaluación metabólica de plasma de 87 pacientes con preeclampsia y sus respectivos controles, reveló la presencia de tres metabolitos proteicos no identificados 403, 415 y 427 de los cuales el último se encuentra solamente en mujeres con PEE <sup>(52)</sup>.

De manera individual, ninguno de estos parámetros ha tenido suficiente sensibilidad y/o valor predictivo para ser usado clínicamente, incluso entre mujeres con alto riesgo de desarrollar PEE. Los marcadores de riesgo mejor conocidos para PEE están enlistados en la tabla 2, los cuales se basan en los cambios fisiopatológicos que caracterizan a la PEE y preceden a la enfermedad <sup>(53)</sup>. Sin embargo, aún no existe una prueba clínicamente útil para predecir el desarrollo de PEE <sup>(54)</sup>. Los resultados preliminares de una revisión sistemática conducida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante 2002 y 2003, demuestran que la inmensa mayoría de las pruebas de detección tienen un bajo potencial predictivo para esta enfermedad <sup>(55)</sup>.

Tabla 2. Marcadores de riesgo para Preeclampsia-eclampsia. (Villar y cols. 2004)

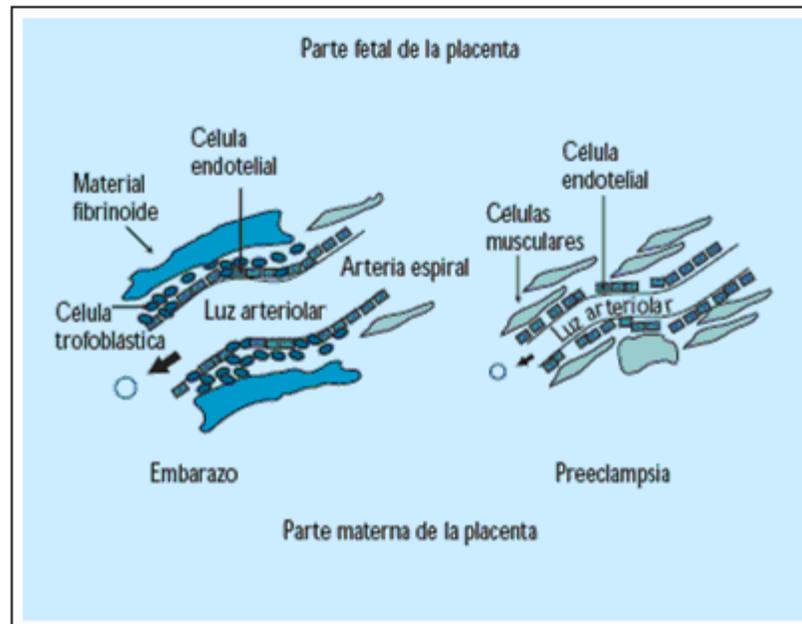
Primer Trimestre			Segundo o Tercer trimestre
Demográficos	Historial	Embarazo actual	
Edad materna $\geq$ 40 años	Preeclampsia previa	Embarazo Múltiple	
	Anticuerpos antifosfolípidos		
	Hipertensión con diastólica $\geq$ 90 mm Hg		
	Enfermedad renal preexistente		
	Diabetes mellitus preexistente		
	Obesidad (IMC $\geq$ 35 Kg/m <sup>2</sup> )	Primigravidez	
	Historia familiar de PEE madre o hermana	Embarazo con un intervalo $\geq$ 10 años	
		Sistólica $\geq$ 130 mmHg o diastólica $\geq$ 80 mmHg	
Etnia: Nórdica, negra, sur de Asia.	No fuma  Trombofilia heredada	Periodo inter genésico <2 años Inseminación artificial	PA Elevada
Estado socioeconómico bajo	Triglicéridos elevados antes del embarazo, historia familiar con enfermedades cardiovasculares, uso de cocaína y metanfetaminas	Nueva pareja, enfermedad trofoblástica gestacional, Peso excesivo durante el embarazo o infección	Screening anormal del suero materno  Arteria uterina anormal velocimetría doppler Volumen cardiaco >7.4 L/min, ácido úrico elevado Marcadores de laboratorio en investigación

También se han propuesto un sin número de marcadores moleculares y bioquímicos para predecir su aparición <sup>(56, 57, 58)</sup>, por ejemplo marcadores de inflamación, producción de citocinas <sup>(59)</sup>, óxido nítrico, endotelina, prostaglandinas, estrés oxidativo y dislipidemias <sup>(60)</sup>. Análisis con microarreglos demostraron que la selectina P está altamente expresada en placentas de mujeres con PEE <sup>(61)</sup>, junto con factores angiogénicos (ADAM12, PP13), factor de necrosis tumoral PTX3, proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A por sus siglas en inglés) y auto anticuerpos agonistas del receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1) <sup>(47)</sup>. Su confiabilidad ha sido inconsistente en diversos estudios y para establecer los mejores marcadores para el uso cotidiano clínico, son necesarios estudios multiétnicos a gran escala y con mujeres que tengan diferentes factores de riesgo.

#### **2.4. Fisiopatología molecular de la Preeclampsia-eclampsia y el sistema renina angiotensina.**

La PEE presenta dos eventos claves para su desarrollo: una invasión trofoblástica deficiente hacia las arterias espirales, siendo limitada de un 30% a 50% en la pared decidual ocasionando un remodelado inadecuado <sup>(58)</sup> (Figura 3), dicho proceso está relacionado con la expresión placentaria del gen *KiSS 1*. El segundo de dichos eventos es la disfunción generalizada de las células endoteliales <sup>(4, 21, 62)</sup>. El factor de inicio en PEE sería la reducción de la perfusión útero-placentaria, como resultado de esta invasión anormal de las arterias espirales por el citotrofoblasto <sup>(56)</sup>.

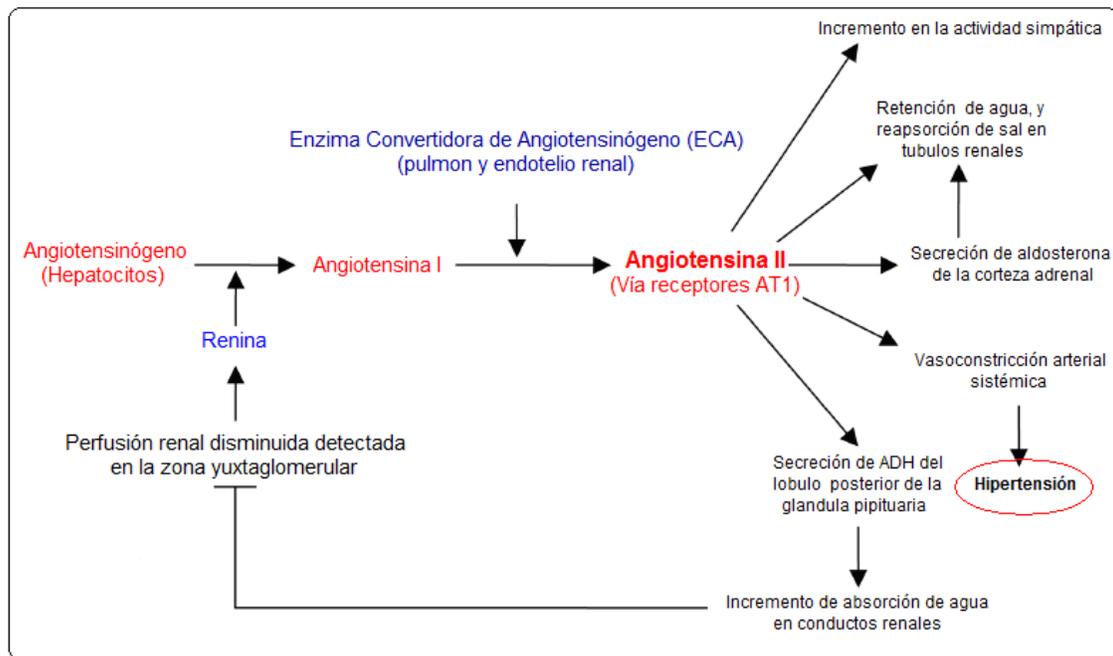
Figura 3. Invasión trofoblastica normal (Izquierda) y preclampsia (derecha) Pacheco 2006.



#### 2.4.1. Descripción del sistema renina angiotensina.

Una de las rutas metabólicas que más se ha estudiado, tratando de relacionarla con la PEE, es el sistema renina angiotensina (SRA) involucrado críticamente en la función cardiovascular y renal. Este sistema es un regulador crítico de la homeostasis electrolítica y la presión arterial en mamíferos, relacionándose con estados de enfermedad <sup>(63)</sup>; de hecho, se han desarrollado estudios moleculares con el gen *ANG II* (angiotensina II), los cuales han mostrado resultados diferentes en cuanto a su asociación con la enfermedad en diferentes poblaciones <sup>(64)</sup>. Los polimorfismos de los receptores de angiotensina II han sido estudiados entre poblaciones de mujeres con PEE y con embarazo normo evolutivo sin encontrar asociación con la enfermedad <sup>(65)</sup>. Los protagonistas de este sistema son: angiotensinógeno, renina y angiotensina I y II (figura 4).

Figura 4. Cascada enzimática del sistema renina-angiotensina. La angiotensina II, la principal molécula de SRA, actúa a través de los receptores AT1 para incrementar la presión sanguínea, los cuales son encontrados en diversos tipos de células( Irani y col. 2008.)



Martin Paul y cols. sugirieron la existencia de un sistema placentario local de producción de los componentes del SRA (angiotensinógeno, renina y enzima convertidora de angiotensinógeno ECA) <sup>(66)</sup>. Por otro lado, la síntesis de angiotensinógeno aumenta por la presencia de estrógeno producido por el crecimiento de la placenta, provocando un incremento de angiotensina II y en los niveles de aldosterona. La ECA es el único componente del SRA que disminuye durante el embarazo, como puede observarse en la tabla 3, donde Irani y cols. comparan los niveles en suero de los componentes del SRA entre mujeres embarazadas normo-tensas y con PEE contra mujeres no embarazadas <sup>(67)</sup>.

Tabla 3. Comparación de los componentes de SRA en mujeres embarazadas normo-tensas y con PEE contra mujeres no embarazadas (Irani y col. 2008.)

Componentes de RAS en Suero	Embarazo Normotenso	Preeclampsia
Renina	++	+
angitensina I	++	+
ACE	-	+
Aldosterona	++	+
ANG -(1-7)	++	-
Angiotensina II	++	+
Sencibilidad de Angitensina II AT1-AA	-- (sistema refractario) Ausente	++ (sistema altamente sensible) Presente
AT1 receptor	Producción basal materna Decidua	Altaregulación en la decidua materna

++ Altamente incrementado en mujeres no embarazadas.

+ Ligeramente Incrementado en mujeres no embarazadas.

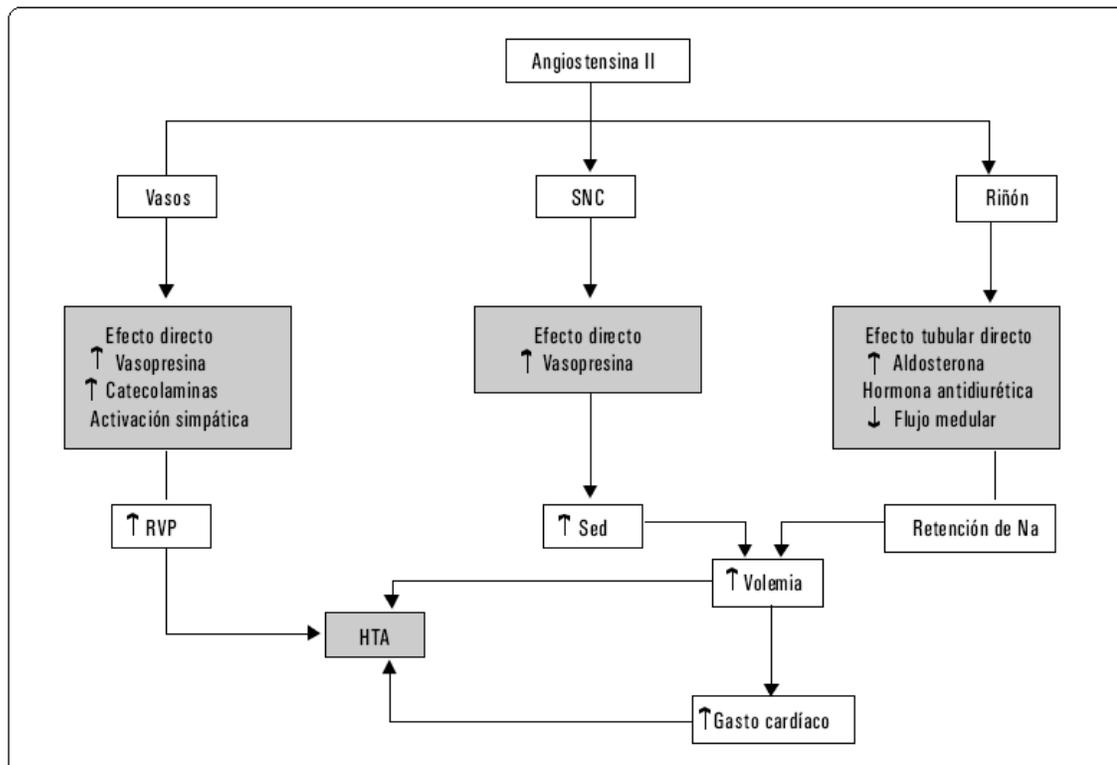
- Disminuido comparado contra mujeres no embarazadas.

Es importante destacar que al contrario de lo que se esperaría, las mujeres embarazadas normo-tensas expresan un incremento notable de renina, angiotensinógeno I, aldosterona y angiotensina II en comparación con las mujeres no embarazadas. Las mujeres con PEE muestran un ligero incremento de estos mismos componentes en comparación con las mujeres no embarazadas. Sin embargo, las mujeres embarazadas preéclámpicas tienen diferencias importantes en el incremento de la ECA, una sensibilidad altamente incrementada a la angiotensina II, el principal efector del SRA, la presencia de auto anticuerpos AT1 (AT1-AA) los cuales tienen una región de 7 aminoácidos que se unen a la segunda asa extracelular de los receptores AT1 y una alta regulación de los receptores AT1 en la decidua materna, cerrándose el ciclo del SRA <sup>(65)</sup> (figura 3).

### 2.4.2. Renina: activación del sistema renina angiotensina.

La estructura primaria del precursor de renina consiste en 406 aminoácidos con un segmento pre y uno pro de 20 y 46 aminoácidos, respectivamente. La forma madura de la renina contiene 340 aminoácidos y tiene una masa de 37kDa <sup>(68)</sup>. La fuente primaria de renina son las células yuxtaglomerulares renales y el tejido coriodecidual de la membrana fetal, ambos tienen factores de transcripción similares <sup>(69)</sup>. La renina es una aspartil proteasa que inicia la cascada enzimática del SRA y resulta en la producción del péptido vaso activo angiotensina II (Ang-II), el principal efector del SRA <sup>(70)</sup>. Este es un vasoconstrictor muy potente que puede estar involucrado en la angiogénesis <sup>(71)</sup> y estimula la liberación de aldosterona, promoviendo así la retención de fluidos y sodio (figura 5) <sup>(72)</sup>. Este papel de estimulador distingue al enhancer de los elementos promotores basales <sup>(73)</sup> y está definido usualmente por secuencias específicas de ADN <sup>(74)</sup>.

Figura 5. Mecanismos hipertensinógenos de la angiotensina II (Vázquez y cols.1998).



### 2.4.3. Gen *REN*.

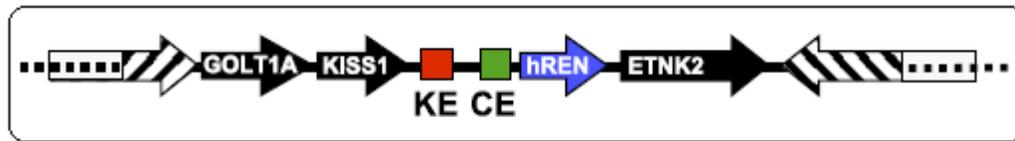
El gen *REN*, se encarga de codificar la enzima renina. Se localiza en el cromosoma 1q32, tiene 169 SNP's, 15 de ellos en regiones codificantes, su longitud es de 24 kb<sup>(75)</sup>. Algunos estudios de Ahmed y cols. sugieren una posible asociación entre la expresión del gen *REN* con la presión sanguínea alta y la influencia de sus polimorfismos. Según Hana y cols. individuos con la variación nucleotídica G/A en el enhancer renal del gen *REN*, tienen una ocurrencia mayor de presentar hipertensión severa<sup>(71)</sup>.

En las mujeres embarazadas se presenta un aumento de renina, debido a la expresión extra renal llevada a cabo en la placenta, además la síntesis de angiotensinógeno aumenta en el hígado debido al estrógeno producido por el crecimiento de la placenta<sup>(76)</sup>. En el año 2000, Shah y cols. demostraron un incremento en la expresión de renina en la decidua de mujeres con PEE en comparación con mujeres embarazadas sanas<sup>(77)</sup>. Un estudio desarrollado por nuestro grupo demostró variaciones importantes en los niveles de expresión del gen *REN* en placentas de mujeres con PEE comparados con los de mujeres con embarazo normoevolutivo<sup>(78)</sup>.

Se cree que la decidua materna actúa como un sitio adicional de activación del sistema SRA y que la poca cantidad producida localmente, encuentra su camino en la circulación materna, siendo suficiente para disminuir la producción de ANG II en el tejido renal como se observa en mujeres con PEE (Tabla 3)<sup>(79)</sup>. Estas variaciones en el sistema placentario local, justifican el estudio de los polimorfismos en las regiones enhancer renal y coriónico en mujeres con PEE y embarazo normo-evolutivo.

Las regiones llamadas enhancer son potenciadoras de la expresión del gen, también son definidas como elementos reguladores del ADN que estimulan la transcripción, independientemente de su posición y orientación con respecto al sitio de inicio de la transcripción<sup>(80)</sup> (Figura 6).

Figura 6. Ilustra los enhancer renal (KE) y coriónico (CE) en la región intergénica de los genes *KiSS 1* y *REN*. (Zhou y col. 2007).



El estudio de los polimorfismos -5312 C/T en el enhancer coriónico y el -11003 G/A en el enhancer renal de pacientes con PEE puede proporcionar más conocimiento sobre la patogenia de esta enfermedad.

#### 2.4.4. Métodos de identificación de mutaciones.

PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa fue diseñada por Mullis en 1986; permite amplificar de manera exponencial un fragmento de ADN, a partir de tan solo una molécula de ADN. Es llevada a cabo con oligonucleótidos (forward y reverse) también conocidos como cebadores o iniciadores de 18-26 pares de bases que delimitan la región del gen a amplificar, posicionándose por complementariedad de bases, a la muestra de ADN de interés, posteriormente se genera una copia de ésta por medio de la enzima Taq (*Thermophilus aquaticus*) polimerasa, enzima termoestable que extiende la secuencia de interés usando desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) dATP, dGTP, dCTP y dTTP.

La reacción es llevada a cabo en tres etapas <sup>(81)</sup>.

**Desnaturalización.** El ADN es sometido a una temperatura de 95° C lo que provoca que la cadena ADN de se abra es decir se desnaturalice.

**Alineamiento.** La cadena desnaturalizada de ADN permite el posicionamiento de los oligonucleótidos sobre la secuencia complementaria al disminuir la temperatura entre 40-68°C que es dependiente de la secuencia de los oligonuclétidos utilizados.

Extensión. Una vez posicionados los oligonucleótidos en la secuencia de interés, es necesario extender la nueva cadena de ADN a través de la incorporación 5'>3' de los dNTP's por medio de la Taq polimerasa <sup>(82)</sup>.

### **Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés)**

Se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción. La técnica RFLP se usa como marcador para identificar grupos particulares de personas en riesgo a presentar ciertas enfermedades genéticas, en ciencia forense, en pruebas de paternidad y en otros campos, ya que puede mostrar la relación genética entre individuos <sup>(83)</sup>.

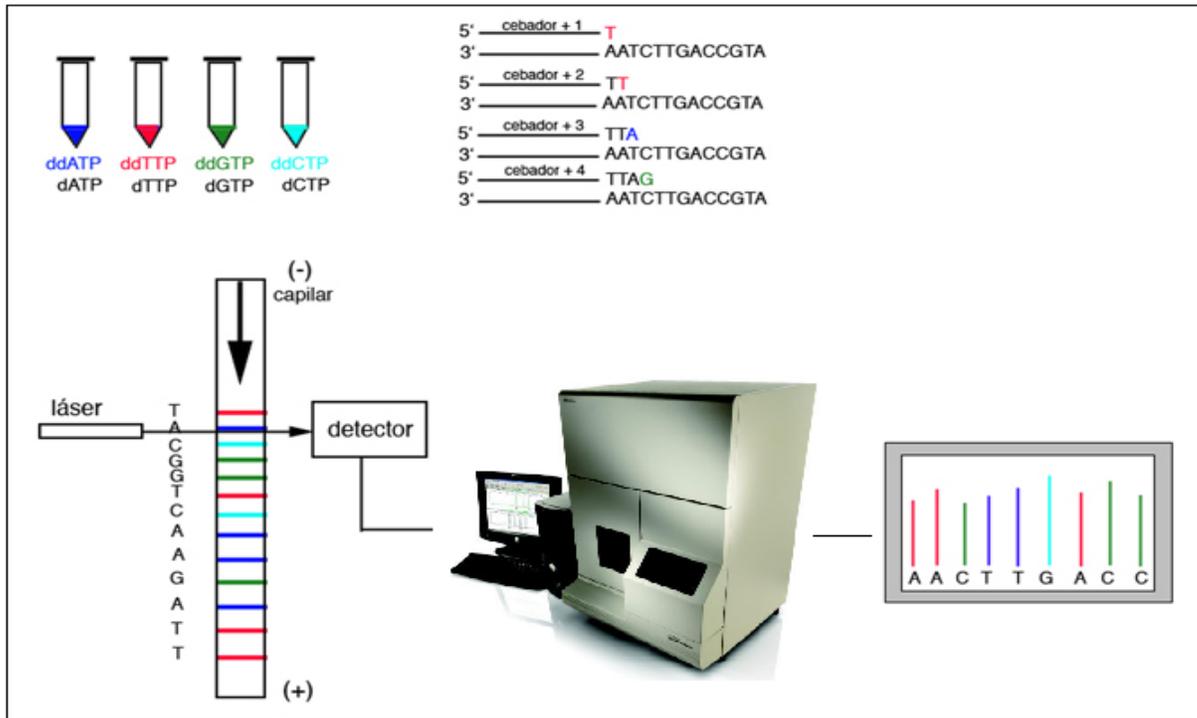
La técnica consiste en extraer y purificar el ADN de un individuo. El ADN es amplificado usando la técnica molecular PCR (antes descrita) y luego es tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un ADN en particular <sup>(84)</sup>.

### **Secuenciación automatizada.**

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de la secuencia de los nucleótidos (A,C,G, y T) en el ADN. Se fundamenta en la incorporación de nucleótidos modificados (ddNTP's) y marcados con diferentes fluoróforos los cuales al integrarse a la cadena creciente, impiden la incorporación del siguiente nucleótido. Esto permite identificar a este último, estableciéndose así la identificación del mismo en la cadena. Así es posible generar la secuencia de interés (Figura7).

Esta técnica es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en campos aplicados como la investigación. La tecnología actual permite realizar este procedimiento a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala como el proyecto del genoma humano. <sup>(85)</sup>

Figura 7. Secuenciación.



Actualmente los métodos más utilizados para secuenciar son los automáticos; Applied Biosystems 3130 genetic analyzer es la última generación de aparatos de electroforesis capilar, ofrece un rendimiento líder en la industria, además de sofisticadas capacidades de automatización que le permite ahorrar tiempo, reducir costos y aumentar la productividad.

### **III. JUSTIFICACIÓN.**

La preeclampsia-eclampsia es un problema mundial de salud pública. Las causas de la enfermedad no están bien definidas y se han estudiado múltiples mecanismos tratando de explicar su aparición. Dentro de estos, se han encontrado alteraciones en el sistema renina-angiotensina en pacientes afectadas con preeclampsia-eclampsia destacando variaciones en la expresión del gen *REN*. Estas variaciones son determinadas en parte por la presencia de elementos potenciadores (enhancer) tanto a nivel renal como a nivel placentario por lo que resulta pertinente el estudio de los polimorfismos -5312 C/T en el enhancer coriónico y -11003 G/A en el enhancer renal del gen *REN* en pacientes con preeclampsia-eclampsia comparadas con mujeres con embarazo normo-evolutivo.

### **IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Existe asociación de los polimorfismos -5312 C/T en el enhancer coriónico y -11003 G/A en el enhancer renal del gen *REN* con preeclampsia-eclampsia?

### **V. HIPÓTESIS.**

Los polimorfismos -5312 C/T en el enhancer coriónico y -11003 G/A en el enhancer renal del gen *REN* se asocian con preeclampsia-eclampsia.

## VI. OBJETIVOS.

### 6.1. Objetivo General.

Determinar la asociación de los polimorfismos -5312 C/T del enhancer coriónico y -11003 G/A del enhancer renal del gen *REN* con la preeclampsia-eclampsia.

### 6.2. Objetivos Específicos.

- Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -5312 C/T del enhancer coriónico del gen *REN* en mujeres con PEE y mujeres con embarazo normo-evolutivo.
- Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -11003 G/A del enhancer renal del gen *REN* en mujeres con PEE y mujeres con embarazo normo-evolutivo.
- Comparar los grupos estudiados.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1. Diseño del estudio.

Retrospectivo, transversal, casos y controles.

### 7.2. Universo.

7.2.1 Grupo de estudio.- Pacientes preeclámpticas de entre 37 a 40 semanas de gestación que acudan al servicio de Tococirugía del Hospital General de los Servicios de Salud de Durango.

7.2.2 Grupo control.- Pacientes embarazadas sanas pareadas por edad cronológica y gestacional sin antecedentes personales o heredofamiliares de preclampsia.

7.2.3 Tamaño de la muestra.- Las frecuencias alélicas de los polimorfismos en estudio son desconocidas. Se propuso y aceptó la realización de un estudio con 50 casos y 50 controles para explorar la hipótesis de estudio.

### **7.3. Criterios de Inclusión.**

- Pacientes con preclampsia-eclampsia de acuerdo a los criterios de Sibai <sup>(10)</sup>
- Embarazadas aparentemente sanas (EAS).
- Edad gestacional entre las 32 a 40 semanas.
- Edad cronológica entre los 13 años a los 39.
- Firma de carta de consentimiento informado (anexo 1).

### **7.4. Criterios de exclusión.**

- Embarazadas con enfermedad renal y/o hepática subyacentes, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, hipertensión arterial esencial, obesidad mórbida y cualquier otra enfermedad que se considere como un factor de riesgo.
- Tabaquismo.

### **7.5. Criterios de Eliminación.**

- Pacientes con preclampsia-eclampsia y EAS que decidieron retirarse voluntariamente del estudio.
- Muestras de ADN degradadas sin opción a recuperar nueva muestra.

## **7.6. Variables.**

### **7.6.1. Variable Dependiente.**

Preeclampsia-eclampsia.

### **7.6.2. Variable Independiente.**

Polimorfismos -5312 C/T del enhancer coriónico y -11003 G/A del enhancer renal del gen *REN*.

### **7.6.3. Variables Intervinientes.**

#### **Edad.**

Variable cuantitativa continua; para efectos de este estudio se consideró un rango de edad de las pacientes mayor a 13 años y menor de 39 años cumplidos.

#### **Gestas.**

Variable cuantitativa discreta; se tomó en cuenta ya que en mujeres primigestas es más frecuente el desarrollo de la enfermedad que en mujeres con 2 o más gestas.

#### **Semanas de Gestación.**

Variable cuantitativa discreta; se asignó un rango entre 37-40 semanas de gestación debido a que en este periodo se tiene la seguridad de la presencia o no de la enfermedad.

## VIII. METODOLOGÍA.

- 8.1.1** Las muestras utilizadas en el estudio fueron recolectadas en trabajos previos, los cuales cuentan con aprobación correspondiente del comité de ética e investigación del Hospital General de la Ciudad de Durango.
- 8.1.2** El proceso de selección de las participantes se realizó en pacientes hospitalizadas en el Hospital General de Durango.
- 8.1.3** A las mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión, se les explicaron los objetivos del estudio invitándolas a participar.
- 8.1.4** A las mujeres que aceptaron participar en el estudio se les pidió que firmaran la carta de consentimiento informado, donde explica que la muestra podrá ser utilizada en otras investigaciones relacionadas con la preeclampsia-eclampsia.
- 8.1.5** Las muestras de análisis fueron asignadas en dos grupos dependiendo de sus datos clínicos.

**Grupo de casos.** Mujeres embarazadas con diagnóstico de Preeclampsia-eclampsia.

**Grupo de controles.** Mujeres embarazadas sanas.

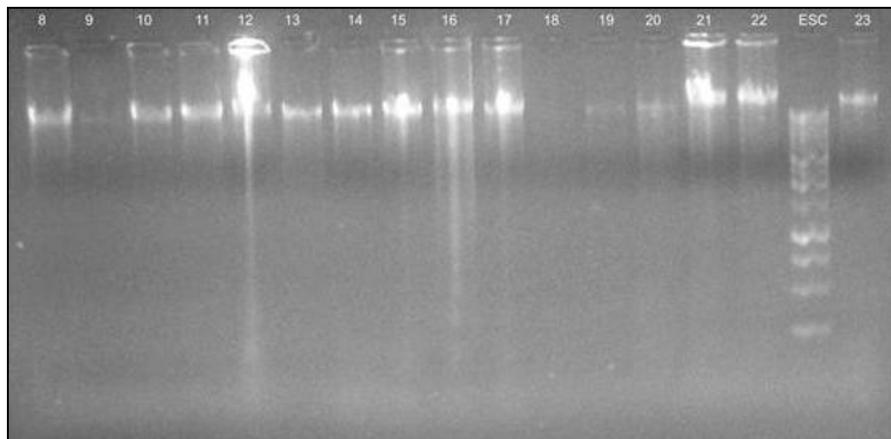
**Criterios de Pareamiento:**

Numero de gestas, edad cronológica, semanas de gestación

- 8.1.6** De cada una de las pacientes se registró su historia clínica con los siguientes datos: Numero de gestas, partos, abortos y cesáreas, edad, semanas de gestación, tensión arterial y proteinuria.

- 8.1.7** Se realizó la toma de muestra sanguínea a cada paciente y se colectaron 5 ml de sangre en tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante.
- 8.1.8** Las muestras sanguíneas fueron transportadas al laboratorio de biología molecular del CIIDIR-IPN-DURANGO para realizar la extracción de ADN.
- 8.1.9** Se realizó la extracción del ADN por el método de Dally (anexo 2) y por el kit Macherey-nagel® (anexo 3) para muestras con mayor antigüedad.
- 8.1.10** Se preparó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (anexo 4) sometiéndolo a electroforesis a 90 volts por una hora para verificar la integridad del ADN genómico (figura 8).

Fig 8. Muestra gel de agarosa con ADN genómico.

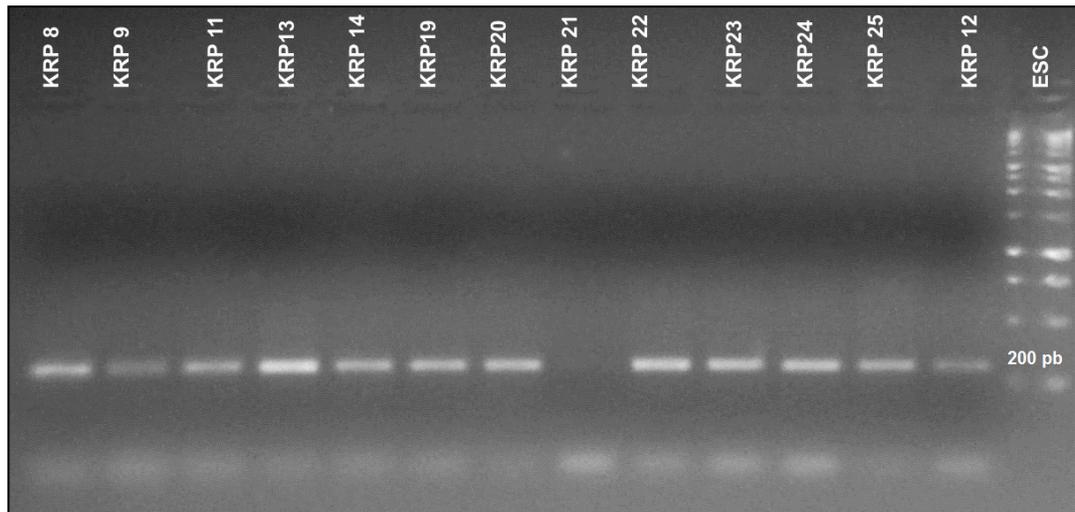


- 8.1.11** Para determinar la concentración de ADN en las muestras se usó un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000. Que utiliza solo 1 µl de muestra.

### 8.2.1. Metodología para el análisis del enhancer renal.

- 8.2.1.1. Se realizó PCR (anexo 5) de cada uno de los casos y controles utilizando oligonucleótidos específicos (anexo 6) diseñados por nosotros mismos a través del programa PRIMER 3 y verificándolos en la página [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el programa BLAST.
- 8.2.1.2. Se comprobó la amplificación exitosa de la reacción de PCR a través de electroforesis con gel de agarosa al 2%, 90 volts, 60 min, con 12  $\mu$ l de producto de PCR esperando un fragmento de 203 pb. (figura 9).

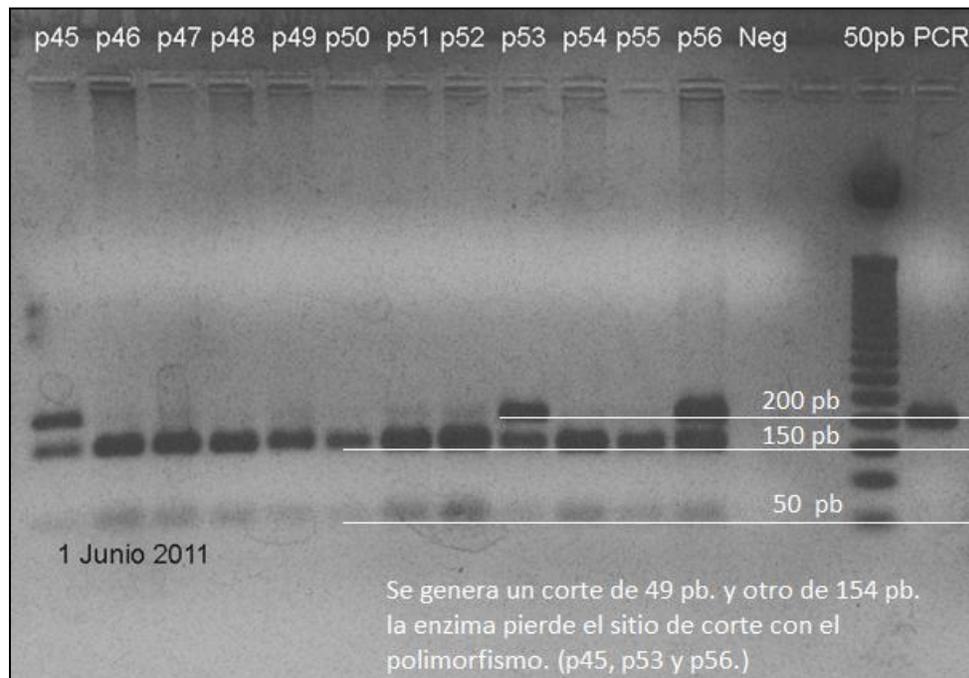
Fig. 9. Comprobación de PCR. Con algunas muestras de los casos y escalera 50pb.



- 8.2.1.3. Se realizó la digestión del producto de PCR (anexo 7) utilizando la enzima *Sfi*I. En caso de encontrarse el cambio nucleotídico G/A, se pierde el sitio de reconocimiento (corte) para la enzima. En caso contrario se generan dos fragmentos de 154 pb y otro de 49 pb. (Figura 9, carriles p45, p53, p56).

8.2.1.4. Se comprobó la reacción de digestión a través de electroforesis con gel de agarosa al 2%, 90 volts, 40 min. (Figura 10)

Fig. 10. Muestra la comprobación de la digestión de algunas de las muestras de los casos, las líneas blancas indican la longitud de cada fragmento del marcador molecular, la extrema derecha muestra un producto de PCR sin digestión.



8.2.1.5. Análisis estadístico ver punto 8.4

### 8.3. Metodología para el análisis del enhancer coriónico.

8.3.1.1. Se realizó PCR (anexo 8) de cada uno de los casos y controles utilizando oligonucleótidos específicos (anexo 9) diseñados por nosotros mismos a través del programa PRIMER 3 y

verificándolos en la página [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el programa BLAST.

- 8.3.1.2. Se comprobó la reacción de PCR a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%, 90 volts, 60 min, con 25 µl de producto de PCR esperando un fragmento de 211 pb.
- 8.3.1.3. Una vez comprobada la correcta amplificación, se cortaron las bandas de cada una de las muestras depositándolas en tubos eppendorf de 1.5ml (anexo 10).
- 8.3.1.4. Se realizó la purificación de cada una de las bandas cortadas, con el kit de extracción QIAquick Gel Extraction Kit®, QIAGEN™ (anexo 11).
- 8.3.1.5. Se cuantificó cada muestra para asegurar la presencia mínima necesaria de ADN (1-3 ng) para un fragmento de 200 pb.
- 8.3.1.6. Se realizó la amplificación de la secuencia patrón, llamada reacción de secuencia, utilizando uno solo de los oligonucleótidos (F o R) y el kit Big Dye terminator V3.11. (anexo 12).
- 8.3.1.7. Se llevó a cabo la precipitación con etanol de la reacción de secuencia Big Dye y se resuspendió en 20 µl de formamida. (anexo13).
- 8.3.1.8. Las reacciones precipitadas fueron colocadas en tubos con septas en un secuenciador ABI Prism 310®, Applied Biosystems™. Se observaron los electroferogramas para cada una de las muestras, no identificando en ninguna el polimorfismo previamente reportado (-5312 C/T); sin embargo la evaluación nos permitió identificar sistemáticamente otra variación polimórfica 8 pares de bases corriente arriba (-5320 G/A). De acuerdo a esta nueva variante los resultados fueron: Homocigotos GG (Figura 11), heterocigotos GA (Figura 12) y homocigotos AA (Figura 13).

Figura 11. Homocigoto GG enhancer coriónico. Marcado con flecha.

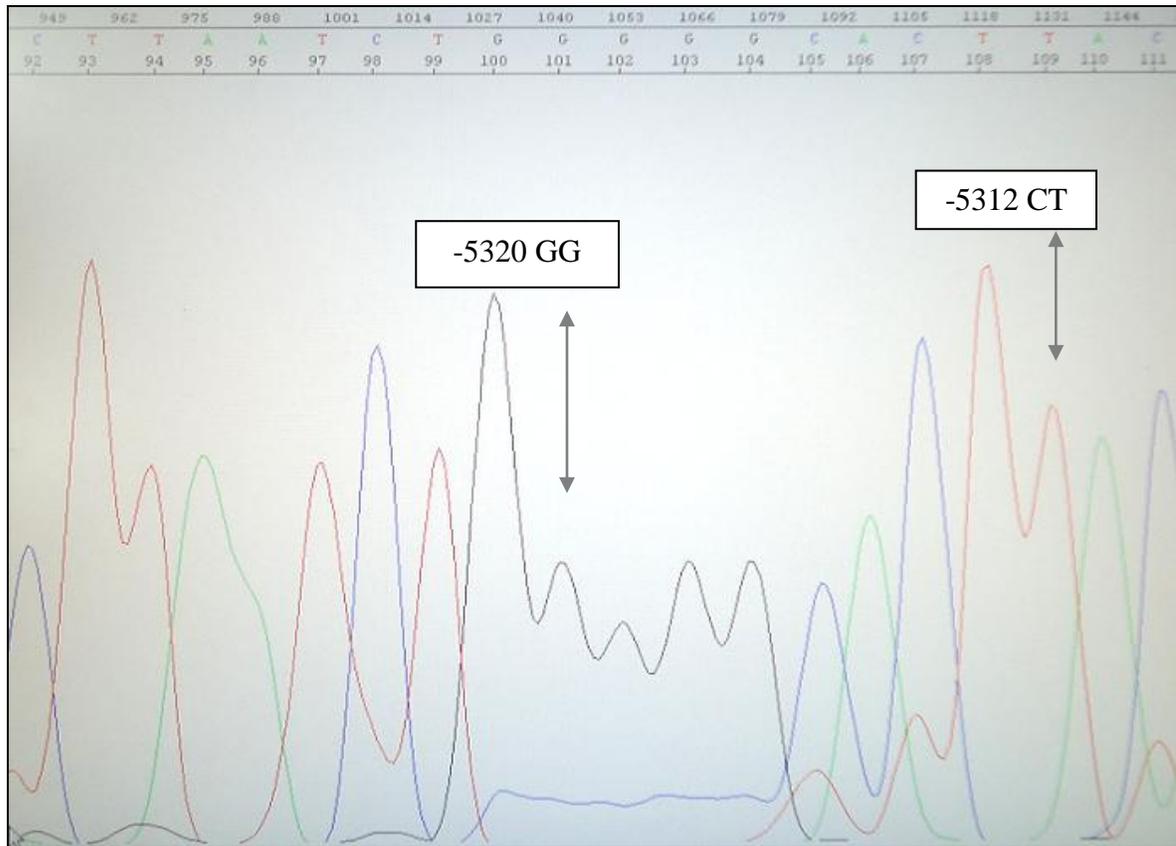


Figura 12. Heterocigoto GA. Nótese que en la parte superior el equipo no puede definir la base, como G ó A debido a esto registra una "N", en este caso se define como heterocigoto; obsérvese cómo se levanta el pico de lectura de ambas bases; para la base "A" fluoróforo verde y "G" negro.

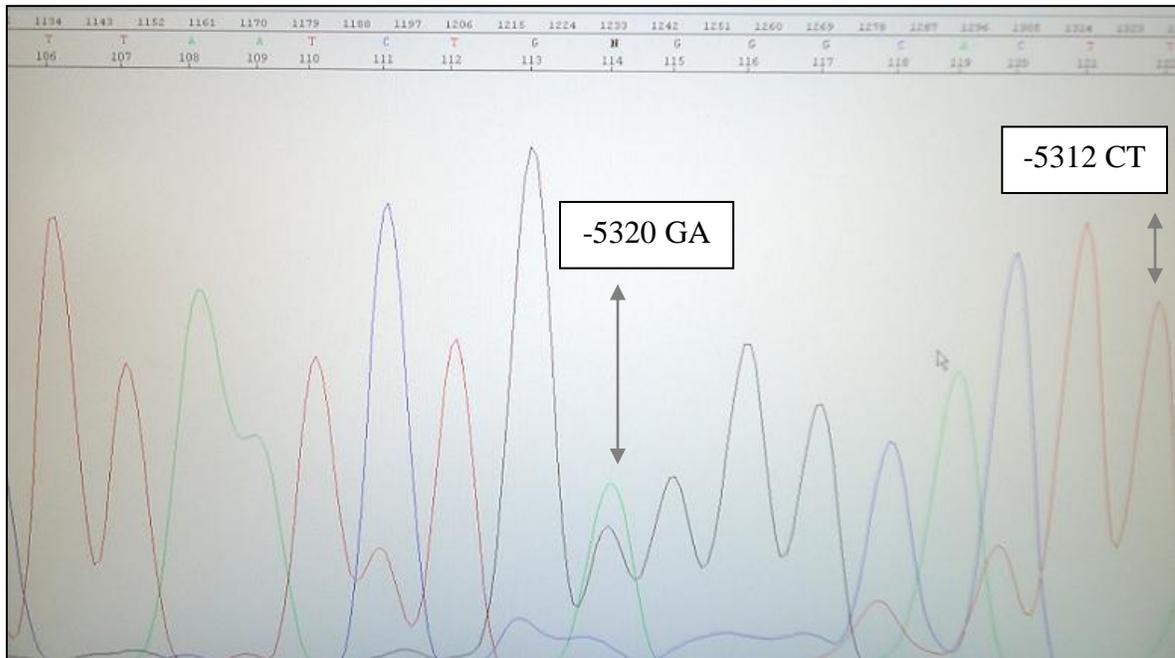
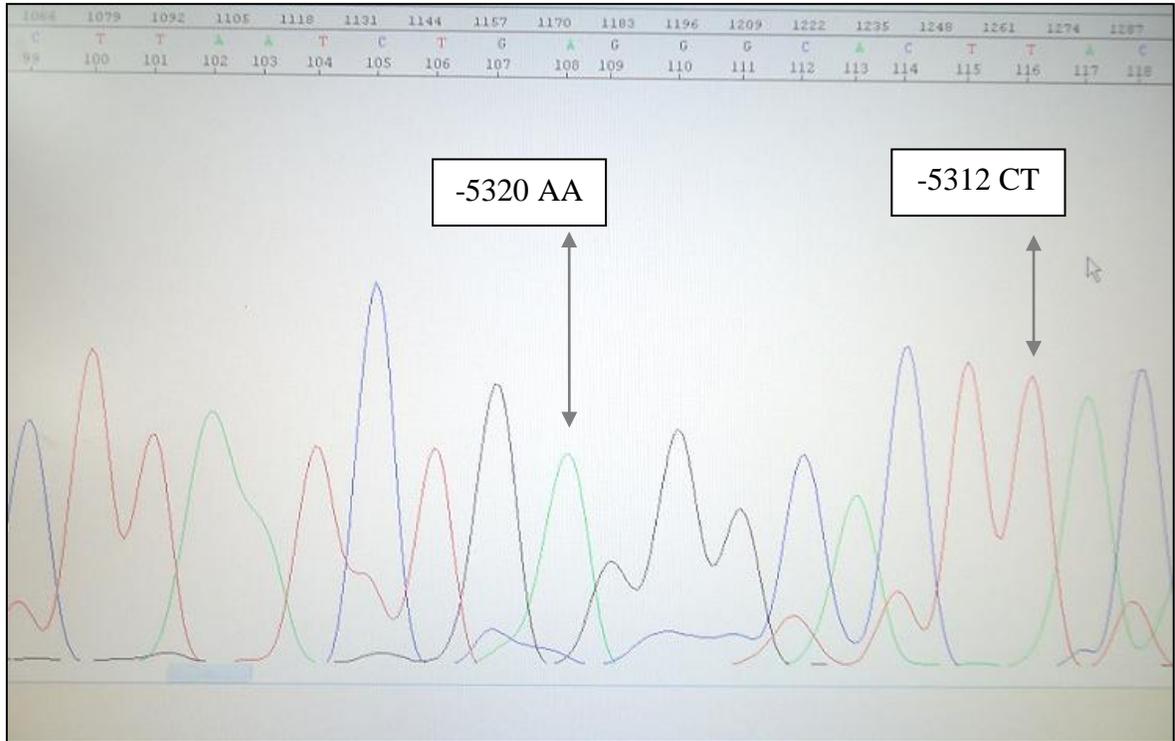


Figura 13. Homocigoto A. Nótese cómo el pico de lectura de la base “G” no se levanta, en cambio se define perfectamente la base “A”.



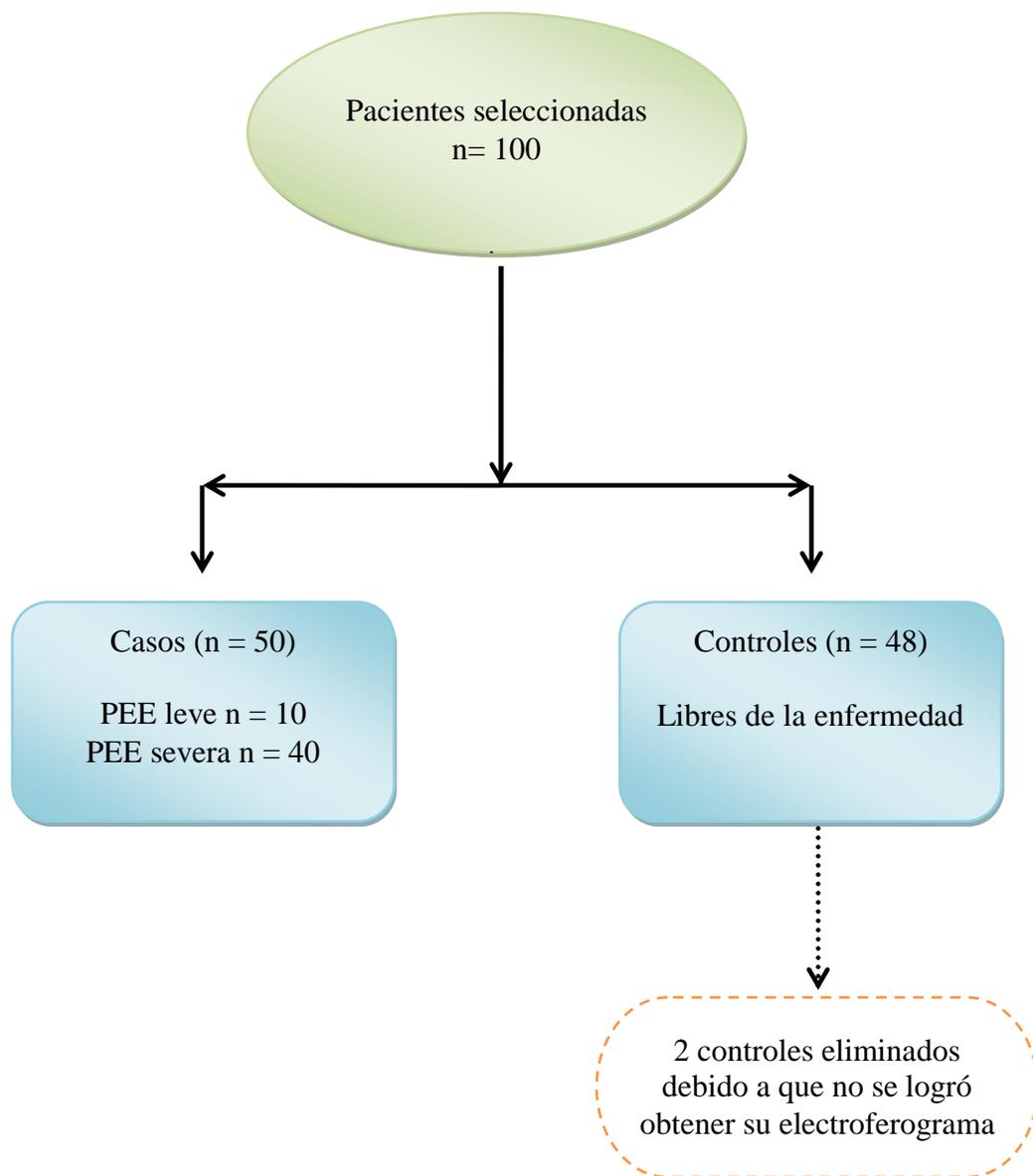
#### 8.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en el estudio fueron analizados de la siguiente manera. Las variables continuas se compararon entre casos y controles utilizando una *t* de student (asumiendo que las varianzas fueron similares). En el caso de los datos obtenidos para número de partos, cesáreas y abortos se realizaron las comparaciones entre los grupos de casos y controles utilizando la U de Mann-Whitney ya que la distribución de los mismos no respeta las características de normalidad requeridas por las pruebas paramétricas. Para variables nominales se utilizó la prueba de  $\chi^2$  y exacta de Fisher cuando los valores esperados de las celdas fueron menores de 5, tanto en la comparación entre casos y controles como la comparación de severidad y proteinuria al interior de los casos. Para determinar asociación se calculó la razón de momios (OR) con sus respectivos intervalos de confianza del 95 %.

## IX. RESULTADOS.

El estudio se realizó en diferentes etapas, en las cuales se seleccionó a las participantes, se integraron los grupos de estudio (Figura 14), se realizó el análisis experimental y finalmente el estadístico.

Fig. 14. Diagrama de flujo del agrupamiento de muestras.



El análisis estadístico de los resultados comparando 50 casos contra 48 controles, dio como resultado diferencias estadísticamente significativas en las variables de edad, TA sistólica, TA diastólica, presión arterial media (PAM) (Tabla 4). Y para las variables: numero de gestas, partos, cesáreas y abortos no hay diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

Tabla 4. Comparación entre casos y controles de las variables medidas en el estudio

	<b>Casos n=50 Media ± DS</b>	<b>Controles n=48 Media ± DS</b>	<b>P</b>
<b>Edad (años)</b>	23.43 ± 5.93	21.1 ± 3.88	0.02
<b>Semanas de gestación</b>	36.1 ± 3.86	36.5 ± 3.85	0.65
<b>TA Sistólica</b>	157.4 ± 14.71	107.2 ± 10.75	< 0.001
<b>TA Diastólica</b>	105.7 ± 12.49	64.75 ± 8.60	< 0.001
<b>PAM</b>	122.9 ± 12.21	78.9 ± 8.67	< 0.001

*t* de Student. SDG; semanas de gestación, TA; tensión arterial, PAM; presión arterial media.

Tabla 5. Comparación entre casos y controles.

	<b>Casos n=50 Mediana (rango)</b>	<b>Controles n=48 Mediana (rango)</b>	
<b>No. de gestas</b>	1 (1-5)	1(1-5)	P= 0.64
<b>No. de partos</b>	1 (1-4)*	1(1-3)*	P= 0.19
<b>No. de cesáreas</b>	1(1-3)*	1(1-3)*	P= 0.90
<b>No. de abortos</b>	1(1-2)*	1(1-3)*	P= 0.90

U de Mann-whitney; \*fueron excluidos del análisis los casos y controles con valores de cero en alguna de las variables.

La diferencia de edad radica en que en el grupo de casos hay dos pacientes mayores de 36 años, de las cuales, una no está pareada y la otra esta pareada por mayor

similitud por las semanas de gestación y el número de gestas con un control de 20 años de edad.

El cuadro clínico que caracteriza a las mujeres con PEE (casos) está definido por cifras elevadas de tensión arterial, por lo que las diferencias en los valores de TA sistólica y TA diastólica entre casos y controles eran esperadas. Estas mismas diferencias fueron observadas en el análisis de la presión arterial media (PAM).

Haciendo el análisis intragrupal de los casos; comparando la PEE severa contra la PEE leve; obtuvimos 40 pacientes con PEE severa y 10 pacientes con PEE leve, (Tabla 6 y 7).

Debido a que la proteinuria fue tomada con tira reactiva y no con medición de orina por 24 hrs, se generaron valores categóricos por lo que se evaluó la moda considerando el número de cruces con mayor presencia. La tira reactiva es un procedimiento de apreciación en donde el resultado se reporta en número de cruces; de 1 a 3, en donde el valor 1 y el valor 3 determinan los valores menor y mayor de la cantidad de proteínas encontradas en orina.

Tabla 6. Diferencias de las características intrgrupales de la población estudiada de casos comparando PEE severa contra PEE leve y significancia de la diferencia de medias con *t* de Student.

	<b>PEE Severa n= 40 Media ± DS</b>	<b>PEE leve n= 10 Media ± DS</b>	<b>P</b>
<b>Edad (años)</b>	23.8 ± 5.63	22.1 ± 7.43	0.45
<b>Semanas de gestación</b>	35.6 ± 4.20	37.7 ± 1.17	0.13
<b>TA Sistólica</b>	159.07 ± 14.42	152.5 ± 15.13	0.20
<b>TA Diastólica</b>	107 ± 12.18	101.0 ± 13.70	0.18
<b>MAP</b>	124.36 ± 12.1	118.16 ± 12.23	0.15

Tabla 7. Diferencias de las características intragrupalas de la población estudiada de casos comparando PEE severa contra PEE leve utilizando U de Mann-Whitney.

	<b>PEE severa n =40</b>	<b>PEE leve n =10</b>	
	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	
<b>No. de gestas</b>	1 (1-5)	1 (1-5)	P=0.94
<b>No. de partos</b>	1 (1-4)*	1 (1-1)*	P=0.18
<b>No. de cesáreas</b>	1 (0-3)	1 (0-3)	P=0.57
<b>No. de abortos</b>	1 (1-1)*	1.5 (1-2)*	P=0.67

U de Mann-whitney; \*fueron excluidos del análisis los casos y controles con valores de cero en alguna de las variables.

En la tabla 7 fueron excluidos del análisis estadístico del grupo de PEE severa 22 pacientes con cero partos y 36 muestras con cero abortos. En el grupo de PEE leve fueron excluidas 8 muestras de embarazadas normo-evolutivas con cero partos y 8 muestra con cero abortos. Ya que no es posible reportar mediana igual a cero.

El valor de proteinuria más frecuente en PEE severa fue de 3 cruces mientras que en la leve fue de 1 cruz lo cual es de esperarse ya que la proteinuria se eleva conforme se incrementa la gravedad de la PEE.

### 9.1. Resultados del análisis genético del enhancer renal

Dado que no se tiene información respecto a la presencia de las variaciones nucleotídicas en el enhancer renal (-11003 G/A), se hizo una evaluación no comparativa de las frecuencias genotípicas y alélicas en la población de estudio. (Tabla 8).

Tabla 8 frecuencias genotípicas y alélicas del enhancer renal

<b>Polimorfismo -11003 G/A (enhancer renal)</b>			
<b>Genotipo</b>	<b>Casos + controles</b>	<b>Alelos</b>	<b>Casos + controles</b>
<b>GG</b>	89 (0.90)	G	187(0.95)
<b>GA</b>	9 (0.10)	A	9 (0.05)
<b>AA</b>	0		
<b>Total</b>	98 (1)	Total	196 (1)

El análisis comparativo de las frecuencias genotípicas del enhancer renal, no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados y tampoco se encontró el genotipo homocigoto mutado (AA) en ninguno de los grupos (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias genotípicas del enhancer renal

<b>Enhancer Renal (-11003 G &gt; A)</b>		
<b>Frecuencias Genotípicas</b>		
<b>Genotipo</b>	<b>Casos n(f)</b>	<b>Controles n(f)</b>
<b>GG</b>	45 (0.90)	44 (0.92)
<b>GA</b>	5 (0.10)	4 (0.08)
<b>AA</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	50 (1)	48 (1)
p = 0.52 OR = 0.82 (0.17-3.03)		

De igual forma las frecuencias alélicas del enhancer renal (-11003 G > A) mostraron un comportamiento similar sin hallar diferencias intergrupales (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias alélicas del enhancer renal.

Enhancer Renal (-11003 G > A)		
Frecuencias Alélicas		
Alelo	Casos n(f)	Controles n(f)
<b>G</b>	95 (0.95)	92 (0.96)
<b>A</b>	5 (0.05)	4 (0.04)
<b>Total</b>	100 (1)	96 (1)
p = 0.52 OR = 0.83 (0.18-3.9)		

También comparamos intragrupalmente las frecuencias genotípicas (Tabla 11) y alélicas (Tabla 12) de PEE leve contra PEE severa. Observando que no existe asociación entre la severidad de la enfermedad con el genotipo del enhancer renal de las pacientes.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas del enhancer renal comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve.

Enhancer Renal (-11003 G > A)		
Frecuencias Genotípicas casos		
Genotipo	PEE leve n(f)	PEE severa n(f)
<b>GG</b>	8 (0.8)	37 (0.93)
<b>GA</b>	2 (0.2)	3 (0.07)
<b>AA</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	10 (1)	40 (1)
p= 0.25 OR = 3.08 (0.30-29.4)		

Tabla 12. Frecuencias alélicas del enhancer renal comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve

Enhancer Renal (-11003 G > A)		
Frecuencias Alélicas		
Alelo	PEE leve n(f)	PEE severa n(f)
<b>G</b>	18 (0.90)	77 (0.96)
<b>A</b>	2 (0.10)	3 (0.04)
<b>Total</b>	20 (1)	80 (1)
p= 0.26 OR = 2.85 (0.31-23.4)		

## 9.2. Resultados del análisis genético del enhancer coriónico.

La evaluación por secuenciación del polimorfismo -5312 C/T en el enhancer coriónico, no reveló su presencia en ninguna de las pacientes estudiadas, Llama la atención sin embargo el hallazgo consistente de un polimorfismo G/A, 8 pares de bases corriente arriba en varias de las pacientes en la posición -5320 G/A, se realizó una evaluación no comparativa de las frecuencias genotípicas y alélicas en la población de estudio. (Tabla 13).

Tabla13 Frecuencias genotípicas y alélicas del enhancer coriónico (-5320 G/A)

Polimorfismo -5320 G/A (enhancer coriónico)			
Genotipo	Casos + controles	Alelos	Casos + controles
<b>GG</b>	63 (0.64)	G	146 (0.74)
<b>GA</b>	20 (0.20)	A	50 (0.26)
<b>AA</b>	15 (0.16)		
<b>Total</b>	98 (1)	Total	196 (1)

El análisis de dicho polimorfismo G/A no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados obteniéndose los siguientes resultados:

La distribución de los genotipos mostró que 33 casos y 30 controles presentaron el genotipo GG, 12 casos y 8 controles presentaron el genotipo GA, mientras que el genotipo AA (homocigoto mutado) lo presentaron 5 casos y 10 controles. Con estos datos no se encontró ninguna relación entre los genotipos del enhancer coriónico y la ausencia o presencia de la enfermedad. (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencias genotípicas del enhancer coriónico

Enhancer coriónico (-5320 G/A)		
Frecuencias Genotípicas		
Genotipo	Casos n(f)	Controles n(f)
<b>GG</b>	33 (0.66)	30 (0.63)
<b>GA</b>	12 (0.24)	8 (0.16)
<b>AA</b>	5 (0.10)	10 (0.21)
<b>Total</b>	50 (1)	48 (1)
P = 0.27 OR = 1.16 (0.47-2.89)		

Llama la atención la mayor frecuencia de pacientes dobles homocigotas para el alelo mutante en el grupo de controles.

El comportamiento fue similar en el análisis comparativo de las frecuencias alélicas del enhancer coriónico pues no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los alelos y la presencia o ausencia de la enfermedad. (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencias alélicas del enhancer coriónico.

Enhancer coriónico (-5320 G/A)		
Frecuencias Alélicas		
Alelo	Casos n(f)	Controles n(f)
<b>G</b>	78 (0.78)	68 (0.70)
<b>A</b>	22 (0.22)	28 (0.30)
<b>Total</b>	100 (1)	96 (1)
P = 0.25 OR = 1.46 (0.73-2.93)		

También comparamos intragrupalmente las frecuencias genotípicas (Tabla 16) y alelicas (Tabla 17) de PEE leve contra PEE severa. Observando que no existe relación entre la severidad de la enfermedad con el genotipo del enhancer coriónico de las pacientes.

Tabla 16. Frecuencias genotípicas del enhancer coriónico comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve

Enhancer Coriónico (-5320 G/A)		
Frecuencias Genotípicas casos		
Genotipo	PEE leve n(f)	PEE severa n(f)
<b>GG</b>	6 (0.60)	27 (0.68)
<b>GA</b>	2 (0.20)	10 (0.25)
<b>AA</b>	2 (0.20)	3 (0.07)
<b>Total</b>	10 (1)	40 (1)
P = 0.71 OR = 1.38 (0.27-7.04)		

Tabla 17. Frecuencias alélicas del enhancer coriónico comparando intragrupalmente la PEE severa contra la PEE leve

Enhancer Coriónico (-5320 G/A)		
Frecuencias Alélicas		
Alelo	PEE leve n(f)	PEE severa n(f)
<b>G</b>	14 (0.70)	64 (0.80)
<b>A</b>	6 (0.30)	16 (0.20)
<b>Total</b>	20 (1)	80 (1)
P = 0.37 OR = 1.71 (0.49-5.81)		

Se realizó la comparación del genotipo del enhancer renal (Tabla 18) y del coriónico (Tabla 19) con respecto a la evaluación cualitativa de la proteinuria. Como puede observarse, en el enhancer renal no existe relación del genotipo con la proteinuria. Se observó que los pacientes con el genotipo silvestre GG tienen mayor tendencia a dar

valores elevados en el nivel de proteínas en orina, mientras que las pacientes heterocigotas GA muestran resultados menores en la cantidad de proteinuria.

El enhancer coriónico mostró un comportamiento similar; no existe diferencia estadísticamente significativa y sugiere que no hay relación del genotipo con el nivel de proteinuria.

Tabla 18. Comparación del genotipo del enhancer renal contra proteinuria.

	<b>Enhancer Renal</b>			
	<b>Proteinuria</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>Genotipo</b>				<b>TOTAL</b>
<b>GG</b>	5 (0.83)	16 (0.88)	24 (0.92)	45 (0.90)
<b>GA</b>	1 (0.17)	2 (0.12)	2 (0.08)	5 (0.10)
<b>TOTAL</b>	6 (1)	18 (1)	26 (1)	50 (1)
<b>P = 0.78 OR = 1.71 (0.20-16.55)</b>				

Tabla 19. Enhancer coriónico. Comparación del genotipo contra proteinuria.

	<b>Enhancer Coriónico</b>			
	<b>Proteinuria</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>Genotipo</b>				<b>TOTAL</b>
<b>AA</b>	1 (0.16)	2 (0.11)	2 (0.08)	5 (0.10)
<b>GA</b>	1 (0.16)	3 (0.17)	8 (0.30)	12 (0.24)
<b>GG</b>	4 (0.68)	13 (0.72)	16 (0.62)	33 (0.66)
<b>TOTAL</b>	6 (1)	18 (1)	26 (1)	50 (1)
<b>P = 0.8 OR = 0.66 (0.17-2.50)</b>				

### 9.3. Haplotipos.

Al realizarse el análisis por haplotipos entre casos y controles se observaron los siguientes resultados (Tabla 20).

Tabla 20. Haplotipos entre casos y controles

<b>Análisis por haplotipos</b>				
<b>Enh. Coriónico</b>	<b>Enh. Renal</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>TOTAL</b>
GG	GG	30 (0.52)	27 (0.48)	57 (1)
GG	GA	3 (0.50)	3 (0.50)	6 (1)
GA	GG	11 (0.61)	7 (0.39)	18 (1)
GA	GA	1 (0.50)	1 (0.50)	2 (1)
AA	GG	4 (0.23)	10 (0.77)	14 (1)
AA	GA	1 (1)	0 (0)	1 (1)
<b>TOTAL</b>		50 (0.51)	48 (0.49)	98 (1)
<b>p= 0.47 OR 1.17 (0.48-2.82)</b>				

El análisis por haplotipos entre PEE leve y severa no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 21).

Tabla 21. Haplotipos comparados contra severidad.

<b>Análisis por haplotipos</b>				
<b>Enh. Coriónico</b>	<b>Enh. Renal</b>	<b>PEE leve</b>	<b>PEE Severa</b>	<b>TOTAL</b>
<b>GG</b>	GG	5 (0.17)	25 (0.83)	30 (1)
<b>GG</b>	GA	1 (0.25)	2 (0.75)	3 (1)
<b>GA</b>	GG	2 (0.18)	9 (0.82)	11 (1)
<b>GA</b>	GA	0 (0)	1 (1)	1 (1)
<b>AA</b>	GG	1 (0.25)	3 (0.75)	4 (1)
<b>AA</b>	GA	1 (1)	0 (0)	1 (1)
<b>TOTAL</b>		10 (0.20)	40 (0.80)	50 (1)
<b>p= 0.43 OR = 0.66 (0.17-2.50)</b>				

Puede apreciarse sin embargo que el genotipo GG del enhancer renal es más frecuente en las pacientes con preeclampsia severa, independientemente del genotipo al que se encontró asociado en el enhancer coriónico: GG, GA o AA.

Esto nos condujo a realizar un análisis extra, excluyendo del grupo de pacientes a aquellas con la forma leve de la enfermedad. De esta manera se compararon los haplotipos entre las pacientes con PEE severa y las mujeres controles (Tabla 22). No encontrando diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 22. Haplotipos comparados contra PEE severa y controles

Análisis por haplotipos				
Enh. Coriónico	Enh. Renal	PEE Severa	Ctrls	TOTAL
<b>GG</b>	<b>GG</b>	25 (0.48)	27 (0.52)	52 (1)
<b>GG</b>	<b>GA</b>	2 (0.40)	3 (0.60)	5 (1)
<b>GA</b>	<b>GG</b>	9 (0.57)	7 (0.43)	16 (1)
<b>GA</b>	<b>GA</b>	1 (0.50)	1 (0.50)	2 (1)
<b>AA</b>	<b>GG</b>	<b>3 (0.23)</b>	<b>10 (0.77)</b>	<b>13 (1)</b>
<b>AA</b>	<b>GA</b>	0 (0)	0 (0)	0
<b>TOTAL</b>		40 (.46)	48 (0.54)	88 (1)
<b>p= 0.60 OR= 0 1.12 (0.19-6.84)</b>				

La única combinación haplotípica en la que se encuentran diferencias entre las pacientes con preeclampsia severa y las embarazadas del grupo control, es AA/GG con frecuencias de 0.23 y 0.77, respectivamente. A diferencia del análisis efectuado en las pacientes de acuerdo al grado de severidad, las pacientes del grupo control son ahora quienes presentan una mayor frecuencia del genotipo GG para el enhancer renal.

## X. DISCUSION

La preeclampsia-eclampsia es la complicación médica más frecuente del embarazo que presenta altos índices de morbilidad y mortalidad perinatal. La etiología de la enfermedad no se conoce con precisión, sin embargo se han propuesto diversos mecanismos que han permitido la evaluación de hasta 158 genes candidatos relacionados con diferentes eventos fisiopatológicos <sup>(40)</sup>. Dentro de estos eventos se encuentran genes relacionados con la expresión de proteínas vaso-activas, trombofilia, hipofibrinólisis, estrés oxidativo, metabolismo lipídico, daño endotelial e inmunogenética <sup>(51)</sup>.

El embarazo normal presenta cambios hemodinámicos importantes compensatorios que requieren de una regulación precisa de las funciones cardiovascular y renal. Dicha regulación es llevada a cabo por el sistema renina-angiotensina (SRA). La preeclampsia presenta una alteración importante del estado hemodinámico, lo que asociado a la presencia de un sistema SRA placentario, ha justificado el estudio de varios de los genes encargados de la regulación de dicho sistema. Así, se han evaluado variaciones genéticas en la enzima convertidora de angiotensinógeno (ECA), angiotensinógeno y los receptores 1 y 2 de la angiotensina II <sup>(64)</sup>.

Uno de los genes componentes de dicho sistema es *REN*, el cual codifica para la enzima renina encargada de la conversión de angiotensinógeno a angiotensina I. A pesar de desempeñar un papel importante en el sistema SRA, no se han hecho estudios que busquen asociar a este gen con la preeclampsia.

Los niveles de expresión del gen *REN* están determinados por la presencia de dos polimorfismos en elementos enhancer en la placenta y en el riñón. Estos se localizan en la posición -5312 C/T en el enhancer coriónico y en -11003 G/A en el enhancer renal, por lo que consideramos que su evaluación en mujeres con preeclampsia y mujeres con embarazo normal es fundamental.

La revisión bibliográfica, no muestra trabajos previos que hayan estudiado los polimorfismos -11003 C/T en el enhancer renal y -5312 C/T en el enhancer coriónico del gen *REN* en mujeres embarazadas con PEE y sanas. La única referencia al

estudio de estos polimorfismos es el estudio realizado por Itani et al. 2007, quienes evaluaron a población afroamericana y caucásica con hipertensión esencial. En la población estudiada encontraron una frecuencia del polimorfismo -11003 de 0.021 en población afroamericana y de 0.074 en población caucásica. La frecuencia del alelo A de este polimorfismo reveló una frecuencia de 0.05, intermedia a la descrita previamente.

Es importante aclarar que el polimorfismo original -5312 C/T descrito por Itani et al.,<sup>(64)</sup> en el enhancer coriónico no fue encontrado en la muestra y la secuenciación reveló sistemáticamente la presencia de un polimorfismo no descrito en la posición -5320, es decir 8 pb corriente arriba.

En virtud de que los polimorfismos analizados no se han evaluado en la población mexicana, se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas en la población total de estudio, las cuales fueron para el enhancer renal (-11003 G>A): GG= 0.90, GA= 0.10; no se encontró ninguna muestra con el genotipo AA. Las frecuencias alélicas encontradas fueron G= 0.95, A= 0.05. Para el enhancer coriónico (-5320 G/A) se encontraron las siguientes frecuencias genotípicas: GG= 0.64, GA= 0.20 y AA= 0.16. Las frecuencias alélicas observadas fueron: G= 0.74 y A= 0.26.

Esto demuestra claramente que el alelo G es considerablemente mayor que el A en nuestra población.

La comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas del enhancer renal (-11003G/A) entre casos y controles no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo se observa una mayor frecuencia del genotipo GG en las pacientes diagnosticadas con PEE severa.

Se hizo la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del enhancer renal (-11003 G/A) entre las pacientes con preeclampsia leve y severa. En este análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; sin embargo se advierte una mayor frecuencia del genotipo GG y el alelo G en las pacientes diagnosticadas con PEE severa.

La evaluación del enhancer coriónico (-5320 G/A) mostró en el grupo de los casos: 33 pacientes con el genotipo GG, 12 pacientes con el genotipo GA y 5 pacientes con AA. En el grupo de los controles las frecuencias observadas fueron: 30 pacientes GG,

8 pacientes GA y 10 pacientes AA. Al realizar el análisis de  $\chi^2$  de las frecuencias genotípicas entre casos y controles para determinar la asociación de los genotipos con la enfermedad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. También se realizó la  $\chi^2$  con las frecuencias alélicas y tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa. Se procedió a analizar los datos intragrupalmente con las frecuencias genotípicas y alelicas del grupo de los casos para buscar una asociación entre el genotipo y la severidad de la enfermedad; los resultados no fueron estadísticamente significativos, pero se observó una tendencia del genotipo GG y el alelo G (tabla 14 y tabla 16) a presentarse en las pacientes con PEE severa.

Esta tendencia del genotipo GG a presentarse con PEE severa aumentó al realizar el análisis de Haplotipos intragrupal de casos. Se encontró que 25 de las 30 pacientes con el genotipo GG en ambos enhancer fueron diagnosticadas con PEE severa; estas representan el 83% de las pacientes con este haplotipo, y el 5 restante con PEE leve. El Haplotipo GA-GG coriónico y renal, respectivamente, mostró un comportamiento similar al encontrarse que de las 11 pacientes en total, 9 fueron diagnosticadas con PEE severa y 2 con PEE leve, representando las primeras el 82% del total de las pacientes con este haplotipo. Los haplotipos AA-GG de ambos enhancers fueron encontrados en un total de 4 pacientes, de las cuales 3 (75%) presentaron PEE severa. Estas cifras sugieren que la variación nucleotídica -11003 G/A en el enhancer renal tiene una actividad funcional más significativa que la observada en el enhancer coriónico (-5320 G/A), sin embargo para categorizar esto a nivel de conclusión es necesario el aumento de la muestra. Una explicación posible para la presencia del genotipo “silvestre” GG en las pacientes con PEE severa es que podría conducir a un estado de sobre-expresión del gen *REN* conduciendo a una mayor síntesis de la enzima y por lo tanto a una conversión incrementada de angiotensinógeno a angiotensina I.

## **XI. CONCLUSIONES.**

No hay estudios que hayan evaluado la frecuencia de estos polimorfismos en mujeres embarazadas por lo que este es el primer estudio en analizarlas.

No se encontró asociación entre el polimorfismo -11003 G/Adel enhancer renal y la presencia de preeclampsia.

El polimorfismo -5312 C>T en el enhancer coriónico no fue encontrado en nuestra población de estudio. La evaluación de esta región por secuenciación reveló la presencia de una nueva variación nucleotídica en la posición -5320 G>A.

No se encontró asociación del polimorfismo -5320 G/A en el enhancer coriónico con la presencia de preeclampsia.

La evaluación de las diferentes combinaciones haplotípicas no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio, manifestando solo una tendencia de asociación con la presencia del genotipo GG en el enhancer renal con la PEE severa.

## **XII. SUGERENCIAS.**

Ya que se observa una tendencia del genotipo GG a presentarse con mayor frecuencia en PEE severa, es necesario ampliar el estudio con un mayor número de pacientes con diferentes grados de severidad para poder establecer su influencia.

Se hace necesario determinar la proteinuria en forma cuantitativa a partir de muestra de orina de 24 hrs.

### XIII. BIBLIOGRAFIA.

- <sup>1</sup> Gerulewicz–Vannini D., Camero Y., Salas J., Hernández–Andrade E., 2006; High androgen plasmatic levels in women affected with pregnancy–induced hipertensión. *Rev. invest. Clín.* 58: pp 228-233.
- <sup>2</sup> Lía Crosa V., Ruda Vega H., Vázquez Blanco M., 2001. Trastornos hipertensivos del embarazo. *Revista del consejo argentino de residentes de cardiología.* 17: pp 296.
- <sup>3</sup> Diagnosis and management of preeclampsia end eclampsia. 2002. *Internacional journal of gynecology and obstetrics,* 77: pp 67-75.
- <sup>4</sup> Quintana NP., Rey FD., Sisi TG., Antonelli CA., Ramos MH., 2003. Preeclamsia. revista de posgrado de la vía cátedra de medicina. Facultad de medicina, UNNE. 133: pp 16-20.
- <sup>5</sup> Lapidus A., Carroli G., Avalos E., Uranga A., Sanguinetti R. y cols. 2004. Dirección nacional de salud materno infantil. Guía para el diagnóstico y tratamiento para la hipertensión en el embarazo. pp 18-20.
- <sup>6</sup> Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnant women. *N Engl J Med.* 1996; 335: pp 257-265.
- <sup>7</sup> Avena JL., Joerin VN., Dozdor LA., Brés SA. 2007. Preeclampsia eclampsia. *Revista de posgrado de la vía cátedra de medicina.* 165: pp 20-25.
- <sup>8</sup> Anyaegbunam A., Edwards C. 1994. Hypertension in pregnancy *journal of the national medical association.* 86: pp 289-293.
- <sup>9</sup> Vázquez Vigoa A., Gómez GR., Román Rubio P., Guzmán Parrado R., Méndez Rosabal A. 2005. Trastornos hipertensivos del embarazo. *Rev. Cubana med.* 44: pp 3-4.
- <sup>10</sup> Sibai, 2001. Hypertensive Disorders in women. Chapter 2 Mild Gestational Hypertensión and Preeclampsia. pp 9-23.
- <sup>11</sup> Tálosi G., Endreffy E., Túri, S., Németh I. 2000; Molecular and genetic aspects of preeclampsia: State of the art. *Molecular genetics and metabolism.* 71: pp 565-572.
- <sup>12</sup> Ferrys TF. 1995. Preeclampsia and post partum renal failure: examples of pregnancy induced microangiopathy; *American J med.* 99: pp 343-347.

- <sup>13</sup> Treem WR. 2002. Mitochondrial fatty acid oxidation and acute fatty liver of pregnancy. *Semin gastrointest dis*; 131: pp 55-66.
- <sup>14</sup> Hashiguchi., Inamura T., Irita K., Abe M., Noda E., Yani S. y cols. 2001. Late occurrence of diffuse cerebral swelling after intracranial hemorrhage in a patient with the HELLP syndrome-case report. *Neurol med chir*; 41: pp 144-148.
- <sup>15</sup> Sánchez sarabia E., Gómez Dias J., Morales García V. 2005. Preeclampsia severa, eclampsia, síndrome HELLP, comportamiento clínico. *Rev. Fac. Med. UNAM*. 48: pp 145-150.
- <sup>16</sup> Barrio MC., Fusco JP., da Luz P A. 2006. Hipertensión en la embarazada: Caso clínico. *Revista del posgrado de la vía cátedra de medicina*. 156: pp 4-6.
- <sup>17</sup> Villanueva Egan LA., Collado Peña SP. 2007. Conceptos actuales sobre la preeclampsia-eclampsia. *Rev Fac Med UNAM.*; 50: pp 57-61.
- <sup>18</sup> Centro nacional equidad de género y salud reproductiva, 2007. Secretaria de salud, Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia; cuarta edición. Tríptico.
- <sup>19</sup> Bellart J. Coca A, de la Sierra A. 2002. Conducta ante una hipertensión inducida por el embarazo: Decisiones clínicas y terapéuticas en el paciente hipertenso. 3ª ed. Editorial JIMS. pp 399-408.
- <sup>20</sup> Wagner LK. 2004. Diagnosis and Management of Preeclampsia. *American Family Physician*. 70: pp 2317-2324.
- <sup>21</sup> Sankaralingam S., Arenas IA., Lalu MM., Davidge ST. 2006. Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction. *Expert reviews in molecular medicine*. 8: pp 1-20.
- <sup>22</sup> Hasbún AJ. 1994. Preeclampsia-eclampsia. En: Botero J, Jubiz A, Henao G, ed. *obstetricia y ginecología texto integrado 5ta edición Medellín*. Intermedicina. pp 167-177.
- <sup>23</sup> Maynard SE., Min JY., Merchan J., Lim KH., Li J., Mondal S., y cols. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*. 111: pp 649-658.
- <sup>24</sup> Salonen Ros H., Cnattingius S., Lipworth L. 1998. Comparison of Risk Factors for Preeclampsia and Gestational Hypertension in a population based Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*. 147: pp 1062-1070.

- <sup>25</sup> Davison JM., Homuth V., Jeyabalan A., Conrad KP., Karumanchi SA., Quaggin S., y cols. 2004. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* 15: pp 2440-2448.
- <sup>26</sup> [Sood R.](#), [Zehnder JL.](#), [Druzin ML.](#), [Brown PO.](#), 2006. Gene expression patterns in human placenta, *Proc Natl Acad Sci*; 103: pp 5478–5483.
- <sup>27</sup> Duda J. 1996. Preeclampsia Still an Enigma. *West J Med.* 164: pp 315-320.
- <sup>28</sup> Dekker GA., Sibai BM., 1999. The Immunology of preeclampsia *Seminars in Perinatology.* 23: pp 24-33.
- <sup>29</sup> Dekker GA. 1996. Oral toleration to paternal antigens and preeclampsia. *Am. J Obstet. Gynecol.* 174: pp 516 .
- <sup>30</sup> Matthiesena L., Berg G., Ernerudhb J., Ekerfeltb C., Jonssonb Y., Sharmac U. 2005. Immunology of preeclampsia. *Chem. Immunol. Allergy.* 89: pp 49–61.
- <sup>31</sup> Seminal 'priming' for protection from pre-eclampsia—a unifying hypothesis 2003. *Journal of Reproductive Immunology.* 59: pp 253-26 .
- <sup>32</sup> Koelman CA., Coumans AB., Nijman HW., Doxiadis II., Dekker GA., Claas FH. 2000. Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid?. *J. Reprod. Immunol.* 46: pp 155-66.
- <sup>33</sup> Dekker GA., Robillard PY., Thomas C. 1998. Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: A review of corroborative epidemiologic studies. *Obstet Gynecol Sur.* 53: pp 377-82.
- <sup>34</sup> Romero Adrián T., Ruiz A., Molina Vílchez R., Heredia W., Atencio R. 2000. Interleucina-10 sérica en preeclampsia. *Rev. Obstet. Ginecol Venez.* 60: pp 165-167.
- <sup>35</sup> Rinehart BK., Terrone DA., Lagoo-Deenadayalan S., Barber WH., Hale EA., Martin JN., Bennett WA. 1999. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor, interleukin 1 and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J. Obstet. Gynecol,* 181: pp 915–920.
- <sup>36</sup> Maarten TM., Raijmakers., Dechend R. Poston L. 2004. Oxidative stress and preeclampsia american heart association. *Hypertension.* 44: pp 373-380.
- <sup>37</sup> Lachmeijer AM., Dekker GA., Pals G., Aarnoudse JG., Leo P., Ten Kate LP., Arngrimsson R. 2002. Searching for preeclampsia genes: the current position. *European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology.* 105: pp 94-113.

- <sup>38</sup> O'shaughnessy KM, Ferraro F, Fu B, Downing S, Morris NH. 2000 Identification of monozygotic twins that are concordant for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* May;182(5): pp 1156-7.
- <sup>39</sup> Treloar SA, Cooper DW, Brennecke SP, Grehan MM, Martin NG. An Australian twin study of the genetic basis of preeclampsia and eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Feb;184(3): pp 374-81.
- <sup>40</sup> Smets Eva ML., Visser A., Go Attie TJI., VanVougt Jhon MG., Oudejans Cees BM. 2005. Novel biomarkers in preeclampsia, Elsevier. 364: pp 22-32.
- <sup>41</sup> Grill S., Rusterholz C., Zanetti-Dallenbach R., Tercanli S., Holzgreve W., Hahn S., Lapaire O. 2009. Potencial markers of preeclampsia-a review. *Reproductive biology and endocrinology.* 7: pp 1-14.
- <sup>42</sup> Shaw K J., Do YS., Kjos S., Anderson PW., Shinagawa T., Dubeau L. y cols. 1989. Human decidua is a major source of renin. *J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation, Inc.* 83: pp 2085-2092.
- <sup>43</sup> Thompson, Thompson. 2008. *Genética en medicina. Principios de citogenética clínica.* 7 edición. Editorial el sevier masson. pp 76.
- <sup>44</sup> Miozzo M., Simoni G. 2002. The role of imprinted genes in fetal growt. *Biol Neonate.* 81: pp 217-228.
- <sup>45</sup> Graves JA., 1998. Genomic imprinting, development and disease--is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene?. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: pp 23-30.
- <sup>46</sup> Yu L., Chen M., Zhao D., Yi P., Lu L., Han J., y cols. 2009. the H19 Gene Imprinting in Normal Pregnancy and Pre-eclampsia Placenta. 30: pp 443-447.
- <sup>47</sup> Yan J., Zhang C., Yao H., Zhang R. 2000. Genomic imprinting of H19/IGF2 in trophoblast and its relation to the development of pre-eclampsia. *Society for the study of reproduction Submission Number. JIA-4.* pp 24-6.
- <sup>48</sup> Yemini M, Lancet M, Mass M, Feinstein M, Katz Z. Predictive value of roll-over test in women with mild preeclampsia. *Am J obstet Gynecol.* 1985: 1; 153: pp 77-78.
- <sup>49</sup> Cnossen JS., Morris RK., Riet GT., Mol Ben WJ., van der Post AM., Joris Coomarasamy., Winderman AH y cols. 2008. Use of uterine artery Doppler itrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis *CMAJ.* 78: pp 701-711.

- <sup>50</sup> Levine RJ., Lam C., Qian C., Yu KF., Maynard SE., Sachs BP, y cols. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355: pp 992-1005.
- <sup>51</sup> Carty DM., Delles C., Dominiczak AF. 2008. Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia. *Trends Cardiovasc. Med.* 18: pp 186–194.
- <sup>52</sup> Kennya LC., Dunnb WB., Ellisb DI., Myersa J., Bakera PN. Kell DB. 2005. Novel biomarkers for pre-eclampsia detected using metabolomics and machine learning. *Metabolomics.* 1: pp 227-234.
- <sup>53</sup> Magee LA., Helewa M., Moutquin JM., Dadelszen Von P. 2008. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada.* 30: pp 1-48.
- <sup>54</sup> Pacheco J. 2006. Preeclampsia/eclampsia: Reto para el ginecoobstetra. Simposio Hipertensión Arterial *Acta Med. Per.* 23: pp 110-111.
- <sup>55</sup> Villar J., Say L., Shennan A., Lindheimer M., Duley L., Conde- Agudelo A., Merialdi M. 2004. Methodological and technical issues related to the diagnosis, screening, prevention, and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. *International Journal Gynecol. Obstet.* 85: pp 28-41.
- <sup>56</sup> Harrison GA., Humphrey KE., Jones N., Badenhop R., Guo G., Elakis G., y cols. 1997. Genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *Am J. Hum. Genet.* 60: pp 1158-67.
- <sup>57</sup> Broughton FP. 1999. Genetics of pre-eclampsia: ideas at the turn of the millennium. *Curr. Obst. & Gynaecol.* 9: pp 178-182.
- <sup>58</sup> Scholl TO., Leskiw M., Chen X., Sims M., Stein TP. 2005. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: pp 1390–1396.
- <sup>59</sup> La Marca BD., Ryan MJ., Gilbert JS., Murphy SR., Granger JP. . 2007. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Current Medicine Group LLC.* 9: pp 480-485.
- <sup>60</sup> Granger JP., Alexander BT., Llinas MT., Bennett WA., Khalil RA. 2001. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction hypertension. 38: pp 718-722.
- <sup>61</sup> [Purwosunu Y.](#), [Sekizawa A.](#), [Farina A.](#), [Wibowo N.](#), [Okazaki S.](#), [Nakamura M.](#), y cols. 2007. Cell-free mRNA concentrations of CRH, PLAC1 and selectin-P are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Interscience.* 27: pp 772-777.

- <sup>62</sup> Dekker GA., Sibai BM. 1998. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am. J. Obst. Gynecol.* 179: pp 1359-1375.
- <sup>63</sup> [Oudit GY.](#), [Crackower MA.](#), [Backx PH.](#), [Penninger JM.](#) 2003. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *13*: pp 93-100.
- <sup>64</sup> Itani HA., Liu X., Pratt JH., Sigmund CD. 2007. Functional Characterization of Polymorphisms in the Kidney Enhancer of the Human Renin Gene *Endocrinology.* 148: pp 1424–1430.
- <sup>65</sup> Morgan L., Crawshaw S., Baker PN., Brookfield JF., Pipkin FB., Kalsheker N. 1998. Distortion of maternal-fetal angiotensin II type 1 receptor allele transmission in pre-eclampsia, *J Med. Genet.* 35: pp 632-636.
- <sup>66</sup> Paul M., Wagner J., Dzau VJ. 1993. Gene Expression of the Renin-Angiotensin System in Human Tissues. *J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation.* 91: pp 2058-2064.
- <sup>67</sup> Irani RA., Xia Y. 2008. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta.* 29: pp 763– 771.
- <sup>68</sup> Imai T., Miyazaki H., Hirose S, y cols. 1983. Cloning and sequence analysis of cDNA for human rennin precursor. *Proc, Natl. Acad. Science.* 24: pp 7405-9.
- <sup>69</sup> [Fuchs S.](#), Philippe J., [Germain S.](#), [Mathieu F.](#), [Jeunemaitre X.](#), [Corvol P.](#), [Pinet F.](#) 2002. Functionality of two new polymorphisms in the human renin gene enhancer region. *J. Hypertens.* 20: pp 2391-2398.
- <sup>70</sup> Barber Fox MO., Barber Gutiérrez E. 2003. El sistema renina angiotensina y el riñón en la fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. Facultad de Ciencias Médicas. Enrique Cabrera. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas. Victoria de Girón. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 22: pp 192-198.
- <sup>71</sup> Ahmed A., Li XF., Shams M., Terry Rollason JG., Barnes NM., Newton JR. 1995. Localization of the angiotensin II and Its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin 11 binding site. *J. Clin. Invest.* 96: pp 848-857.
- <sup>72</sup> Vázquez Vigoa A., Cruz Álvarez A., González Valle Del Z., Vázquez Cruz A. 1998. Antagonistas de los recetores de angiotensina II. *Rev. Cubana Med.* 37: pp 83-92.
- <sup>73</sup> Smale ST., Kadonaga JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72: pp 449–479.

- <sup>74</sup> Carroll SB., Grenier JK., Weatherbee SD. 2001. From DNA to diversity: Molecular genetics and the evolution of animal design. 2 edición, editorial Malden: Blackwell Science. pp 192.
- <sup>75</sup> NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. consultado en 15 agosto 2010.
- <sup>76</sup> Hsueh WA., Luetscher JA., Carlson EJ., Grislis G., Frazee E., McHargue A. 1982 Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 54: pp 1010–1016.
- <sup>77</sup> Shah DM., Banu JM., Chirgwin JM., Tekmal RR. 2000 Reproductive tissue renin gene expression in preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy.* 19: pp 341–351.
- <sup>78</sup> Fernando Vazquez-Alanis, Carlos Galaviz-Hernandez y cols. 2011. Comparative expression of profiles for KiSS-1 and REN genes in preeclamptic and healthy placental tissues. *European Journal of obstetrics gynecology and reproductive biology.*
- <sup>79</sup> Anton L., Merrill DC., Neves LA., Stovall K., Gallagher PE., Diz DI. y cols. 2008. Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but not angiotensin (1-7) in preeclampsia. *Hypertension.* 51: pp 1066-1072.
- <sup>80</sup> Arnosti DN., Kulkarni MM. 2005. Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards?. *Journal of Cellular Biochemistry.* 94: pp 890–898.
- <sup>81</sup> Mullis KB., Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods enzymol.* 155: pp 335-350.
- <sup>82</sup> Joseph Sambrook, David W. Russel. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory, N.Y. 2001, 3rd ed. edición.
- <sup>83</sup> NCBI 2011  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml> Restriction fragment length polymorphism. Consultado el 1 noviembre 2011.
- <sup>84</sup> Biology pages 2011.  
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RFLPs.html> Restriction fragment length polymorphism. consultado el 1 noviembre 2011.
- <sup>85</sup> Sanger F., Nicklen S., Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12): pp 5463-5467.

## XIV. ANEXOS.

### Anexo 1. Carta de consentimiento informado.

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

**Dado que las muestras de este estudio fueron recolectadas de pacientes estudiadas previamente, se consideró la siguiente carta de consentimiento informado.**

**Proyecto de Investigación: Estudio molecular del gen *PLAC9* asociado a invasión trofoblástica como probable marcador predictivo para el desarrollo de preeclampsia eclampsia.**

**Investigador responsable: Dr. Carlos Galaviz Hernández.**

Investigador Titular, Academia de Genómica, CIIDIR-Durango, IPN

**Investigadores corresponsables:**

**Dr. José de Jesús Guijarro Bustillos**

Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital General de Durango

La toma de muestra se realizará en el Hospital General de Durango. El procesamiento de las muestras se hará en 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.
- 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 Biomedicina Molecular del CIIDIR Durango IPN. 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, 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.
- 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.

Nombre (paciente/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:

El Q.F.B. \_\_\_\_\_ 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)

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:

---

## **Anexo 2. Método de extracción de Dally y cols. A partir de 500 µl de sangre total con EDTA.**

1. Colocar 500 µl 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 10mM pH 8.0; sacarosa 320 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; y triton x-100 al 1%)
3. Mezclar 2 minutos en vortex.
4. Centrifugar a 3500 RPM por 10 minutos.
5. Decantar.
6. Resuspender el botón celular en 1 ml de solución B ( Tris-HCl 400 mM; EDTA 60 mM; NaCl 150 mM y SDS 1%)
7. Mezclar en el vortex.
8. Añadir 250 µl de perclorato de sodio al 5mM.
9. Mezclar a temperatura ambiente por 15 min. (lentamente)
10. Incubar a 65° C por 30 minutos.
11. Añadir 1000 µl de cloroformo almacenado a -20° C.
12. Mezclar a temperatura ambiente por 10 minutos (lentamente).
13. Centrifugar a 3500 RPM por 10 min.
14. Se obtienen 3 capas, y se transfiere la capa superior transparente (con pipeta pasteur) a otro tubo de 13 x 100.
15. Añadir 1000 µl de etanol absoluto previamente almacenado a 4° C.
16. Mezclar lentamente por inversión varias veces, se observa una hebra semitransparente.
17. Transferir el contenido del tubo a un tubo eppendorf de 2 ml previamente rotulado.
18. Centrifugar a 13 RPM por 3 min y desechar el sobrenadante.
19. Lavar con 500 µl de etanol al 80 %.
20. Desechar el sobrenadante de etanol.
21. Repetir el paso 20 y 21.
22. Liofilizar por 10 minutos.

23. Resuspender en agua libre de RNAsas y DNAsas Gibco ® o buffer tris-EDTA 10/0.1.
24. Incubar a 64° C durante 1 hr.
25. Conservar a 4° C.

**Anexo 3. Protocolo para purificación de ADN a partir de sangre total.  
Macherey-Nagel®.**

1. Tomar 200 µl de sangre total y colocarlos en tubo colector propuesto.
2. Añadir 25 µl de proteinasa K.
3. Añadir 200 µl de reactivo B3
4. Mezclar e incubar a 70° C por 10-15 min.
5. Agregar 201 µl etanol y mezclar.
6. Vaciar el total del contenido del tubo colector y colocarlo en la columna propuesta.
7. Centrifugar a 11 000 g, por 1 min.
8. Primer lavado; colocar la columna en un tubo colector nuevo y adicionar 500 µl de buffer BW; centrifugar por 11 000 g, 1 minuto.
9. Segundo Lavado; colocar la columna en un nuevo tubo colector y adicionar 600 µl de buffer B5 y centrifugar por 1 min a 11 000 g. decantar.
10. Secado de la membrana de silica de la columna centrifugando por 1 min a 11 000 g.
11. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 µl
12. Agregar 100 µl de buffer BE previamente calentado a 70° C.
13. Centrifugar por 1 min. A 11 000 g.
14. Retirar la columna y almacenar el tubo de 1.5 µl a -20° C.

---

#### **Anexo 4. Preparación del gel de agarosa para electroforesis al 1%.**

1. Se pesó 0.5 g de agarosa en una balanza analítica.
2. Se mezclan con 50 ml de buffer TAE en un matraz 1 de 250 ml.
3. Se calienta por 90 segundos en horno de microondas.
4. Dejar reposar el matraz a temperatura ambiente y preparar la cámara de electroforesis.
5. Transferir el matraz 1 al matraz 2 especial para adicionar Bromuro de etidio.
6. Vaciar en la cámara de electroforesis y colocar el peine.
7. Dejar solidificar y retirar el peine.
8. Cargar las muestras a correr (90 volts por 60 minutos).
9. Retirar el gel y tomar fotografía.

Nota. La concentración del gel varía según el fragmento analizado, modificando la cantidad de agarosa utilizada.

**Anexo 5.** Reacción estandarizada de PCR para el enhancer renal.

Reactivo	Concentración	Cantidad 1x
H <sub>2</sub> O		10.3 µl
Buffer	5x	5.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µM	3.0 µl
Olifo forward	10 µM	1.0 µl
Oligo Reverse	10 µM	1.0 µl
DMSO		1.5 µl
DNTP´s	10 µM	1.0 µl
Taq Pol		0.2 µl
AND		2.0 µl
<b>Total</b>		25.0 µl

Programa del termociclador Labnet Multigene ®. Para PCR del enhancer renal.

- Desnaturalización inicial 95° C, 2 minutos.
- Desnaturalización 95° C, 45 segundos.
- Alineación 62.0° C, 45 segundos.
- Extensión 72.0° C, 1.0 minutos.
- Extensión final 72.0° C, 5.0 minutos.
- Ciclos 35.
- Almacenamiento a -20° C.

**Anexo 6.** Oligonucleótidos utilizados para el enhancer renal.

Oligonucleótido Forward				Grupo: EX
<b>Clave:</b> <b>EnhRenF</b>	Longitud: 20	Secuencia (5' - > 3') AGA GGA GGG GTG AGG TTG TT		
<b>Coef: 237.5</b>	A (260): 0.476	Vol (ul): 500	OD's totales 35.18	Conc. (ug/ul): 2.32
<b>C+G (%): 55</b>	Tm (1): 66.45	Tm (2): 62.0	p.m: 6656.0	Picomol/ul: 348.87

Oligonucleótido Reverse				Grupo: EX
<b>Clave:</b> <b>EnhRenR</b>	Longitud: 20	Secuencia (5' - > 3') CAC ACA CTC CCT GCT GTC AT		
<b>Coef: 197.9</b>	A (260): 0.460	Vol (ul): 500	OD's totales 34.0	Conc. (ug/ul): 2.24
<b>C+G (%): 55</b>	Tm (1): 66.45	Tm (2): 62.0	p.m: 6296.0	Picomol/ul: 356.42

**Anexo 7.** Digestión del producto de PCR para el enhancer renal.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>1x</b>
<b>H2O</b>		0.6 $\mu$ l
<b>Buffer</b>	10x	1.5 $\mu$ l
<i>Sfi</i> I	10u/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
<b>Producto de PCR</b>		12.5 $\mu$ l
<b>BSA</b>	10 $\mu$ g/ $\mu$ l	0.15 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>		15 $\mu$ l

La digestión fue llevada a cabo en el termociclador Labnet Multigene ®. A 50° C por 4 horas.

**Anexo 8.** Reacción estandarizada de PCR para el enhancer coriónico.

Reactivo	Concentración	Cantidad 1x
H <sub>2</sub> O		10.6 µl
Buffer	5x	5.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µM	2.5 µl
Olifo forward	10 µM	1.0 µl
Oligo Reverse	10 µM	1.0 µl
DMSO		1.5 µl
DNTP's	10 µM	1.0 µl
Taq Pol		0.4 µl
AND		2.0 µl
<b>Total</b>		25.0 µl

Programa del termociclador Labnet Multigene ®. Para PCR del enhancer coriónico.

- Desnaturalización inicial 95° C, 2 minutos.
- Desnaturalización 95° C, 45 segundos.
- Alineación 61.0° C, 45 segundos.
- Extensión 72.0° C, 1.0 minutos.
- Extensión final 72.0° C, 5.0 minutos.
- Ciclos 35.
- Almacenamiento a -20° C.

**Anexo 9.** Oligonucleótidos utilizados para el enhancer coriónico.

<b>Oligonucleótido Forward</b>				<b>Grupo: EX</b>
<b>Clave:</b> <b>EnhCorF</b>	Longitud: 20	Secuencia (5' - > 3') CTT ACC AAA TGG CGT CCC TA		
<b>Coef: 210.2</b>	A (260): 0.556	Vol (ul): 500	OD's totales 41.10	Conc. (ug/ul): 2.71
<b>C+G (%):</b> <b>50.0</b>	Tm (1): 64.75	Tm (2): 60.0	p.m: 6360.0	Picomol/ul: 426.47

<b>Oligonucleótido Reverse</b>				<b>Grupo: EX</b>
<b>Clave:</b> <b>EnhCorR</b>	Longitud: 20	Secuencia (5' - > 3') AAT GCC TCC CAA GAT TGA TG		
<b>Coef: 222.5</b>	A (260): 0.528	Vol (ul): 500	OD's totales 39.03	Conc. (ug/ul): 2.58
<b>C+G (%):</b> <b>45.0</b>	Tm (1): 63.05	Tm (2): 58.0	p.m: 6424.0	Picomol/ul: 400.96

---

**Anexo 10.** Escisión de las bandas del enhancer coriónico a partir de gel de agarosa.

1. Preparación del gel de agarosa al 2%.
2. Cargar el gel con los productos de PCR correspondientes.
3. Una vez terminado el tiempo de corrimiento el gel es llevado a la lámpara U.V.
4. Se visualizan las bandas y son cortadas con navajas estériles.
5. Los cortes se realizan lo más cerca a la banda para evitar exceso de agarosa.
6. Una vez cortadas las bandas son colocadas en tubos eppendorf previamente rotulados con las muestras que se cargaron en el gel.
7. Se almacenan a  $-20^{\circ}$  C cubriéndolos de la luz.

---

**Anexo 11.** Purificación del DNA a partir de geles de agarosa; QIAquick® Gel Extraction Kit.

1. Con los fragmentos escindidos del gel y depositados en los tubos eppendorf
2. Adicionar 3 volúmenes del buffer QG por un volumen de gel (100mg~ 100 µl).
3. Incubar a 50° C por 10 minutos hasta que el gel se disuelva completamente, y mezclar en el vortex cada 2 minutos durante la incubación.
4. Una vez disuelto debe tener un color amarillo similar al buffer QG.
5. Agregar isopropanol a la mezcla, 1 volumen del gel. (100mg~100 µl).
6. Colocar una columna QIAquick dentro del tubo colector.
7. Aplicar la muestra a la columna y centrifugar 1 minuto 13 000 RPM.
8. Decantar y colocar la columna en el mismo tubo.
9. Agregar 0.5 ml de Buffer QG a la columna y centrifugar 1 minuto 13 000 RPM.
10. Decantar.
11. Para lavar se agrega .75 ml de buffer PE a la columna se deja reposar 3 minutos.
12. Centrifugar 1 minuto a 13 000RPM, decantar y colocar la columna en el mismo tubo.
13. Centrifugar una vez mas 1 minuto a 13 000 RPM.
14. Colocar la columna en un tubo limpio.
15. Agregar 30 µl de buffer EB al centro de la columna y dejar reposar 4 minutos.
16. Almacenar a -20° C.

**Anexo 12.** Reacción de secuencia del enhancer coriónico.

Reactivo	Concentración	Cantidad 1x
Big Dye		2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		15 $\mu$ l
Oligo	3.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
ADN		2 $\mu$ l
Total		20 $\mu$ l

Programa del termociclador Labnet Multigene ®. Para la reacción de secuencia del enhancer coriónico.

- Desnaturalización inicial 96° C, 1.0 minutos.
- Desnaturalización 96° C, 10.0 segundos.
- Alineación 50.0° C, 0.05 segundos.
- Extensión 60.0° C, 4.0 minutos.
- Extensión final 72.0° C, 5.0 minutos.
- Ciclos 25.
- Almacenamiento a -20° C.

---

**Anexo 13.** Precipitación con etanol de la reacción de secuencia Big Dye.

1. Tomar la totalidad el producto de la reacción de secuencia (20  $\mu$ l) y vaciarlo en un tubo de 1.5 ml.
2. Agregar 2  $\mu$ l de acetato de sodio al 3M.
3. Agregar 50  $\mu$ l de etanol al 100% previamente almacenado a -20° C.
4. Invertirlo 4 veces lentamente para mezclar los reactivos.
5. Incubar a -20° C por 25 minutos.
6. Centrifugar durante 30 minutos a 4° C; 2500 g. (equipo labnet; HERMLE, z216 MK).
7. Decantar para remover el etanol, centrifugar menos de 1 minuto a 4° C; 185 g. y remover el exceso de etanol.
8. Agregar 70  $\mu$ l de etanol al 70% almacenado previamente a -20° C.
9. Centrifugar durante 15 minutos a 4° C; 2500 g.
10. Decantar para remover el etanol, centrifugar menos de 1 minuto a 4° C; 185 g. y remover el exceso de etanol.
11. Dejar secar el pellet durante 10 minutos.
12. Resuspender en 20  $\mu$ l de formamida.