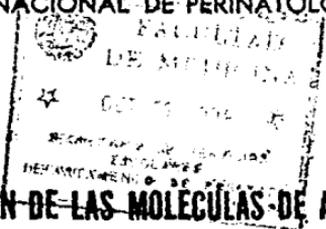


77  
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



**" PARTICIPACION DE LAS MOLECULAS DE ADHESION  
CELULAR DEL ENDOTELIO EN LA ENFERMEDAD  
HIPERTENSIVA ASOCIADA A LA GESTACION "**

**DR. JESUS PEREZ SEGURA**  
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA Y  
EDUCACION PROFESIONAL

**DR. SAMUEL KARCHMER K.**  
DIRECTOR GENERAL  
PROFESOR TITULAR



**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
E S P E C I A L I S T A E N  
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA  
P R E S E N T A  
DR. FRANCISCO GOMEZ JIMENEZ

Profesor titular : Dr. Samuel Karchmer K.  
Tutor : Dra. Edith García González



MEXICO, D. F. 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Al Alma Mater, el Instituto Nacional de Perinatología que me brindó la oportunidad de la superación académica y personal.

Con todo respeto al Dr. Samuel Karchmer K. por el saber y la filosofía que dejó en mí.

Con aprecio a mis distinguidos maestros y compañeros de residencia.

**Tutor:**

**Dra. Edith García González**

Mi especial agradecimiento a la Dra. Edith García González, coordinadora del Area de Inmunodermatología del INPer, por el esfuerzo y dedicación que hicieron posible este trabajo.

Mi sincero reconocimiento por su valiosa ayuda a la Bióloga Raquel Andrade Martínez, parte fundamental del equipo de trabajo.

Agradezco el apoyo otorgado a los Departamentos de Genética, Bioquímica y Patología del INPer, para la realización de este trabajo.

Al Dr. Thomas J. Lawley, Jefe del Departamento de Dermatología de la Universidad de Emory, Atlanta, GA. Por su amable colaboración.

A Paty, mi querida esposa, con el más noble de mis sentimientos por su amor y comprensión y el apoyo incondicional que me han servido de pedestal para alcanzar mis metas y afrontar los fracasos.

Al ser máspreciado de mi vida, aliciente en todo momento para ser mejor y razón del esfuerzo que siempre pondré para brindar lo mejor de mí. Con cariño a Paquito, mi pequeño hijo.

A mi padre, hoy le manifiesto mi admiración y gratitud por los interminables momentos de entrega para con sus hijos, con el afán de forjar hombres de buena voluntad.  
Gracias por sembrar en mí el deseo de superación.

A mi madre, a la cual agradezco infinitamente su cariño y las enseñanzas que me han dado la oportunidad de abrirme camino en la vida.

A mis hermanas Geny, Norma y en especial a mi querida Rosita por el cariño que me profesan y el apoyo brindado en mi realización profesional.

## I N D I C E

- I INTRODUCCION
- II EPIDEMIOLOGIA
- III CLASIFICACION
- IV ETIOLOGIAS
- V LECHO UTERO PLACENTARIO
- VI ENDOTELIO Y PREECLAMPSIA
- VII MOLECULAS DE ADHESION CELULAR Y PREECLAMPSIA
- VIII RAZONES PARA DESARROLLAR LA INVESTIGACION
- IX OBJETIVOS
- X HIPOTESIS
- XI MATERIAL Y METODOS
- XII RESULTADOS
- XIII DISCUSION
- XIV REFERENCIAS

## **PARTICIPACION DE LAS MOLECULAS DE ADHESION CELULAR DEL ENDOTELIO EN LA ENFERMEDAD HIPERTENSIVA ASOCIADA A LA GESTACION**

### **INTRODUCCION**

La preeclampsia o enfermedad hipertensiva asociada a la gestación (EHAG) es una enfermedad multisistémica de etiología desconocida (1) que complica frecuentemente al embarazo (mayor de 20 semanas) o al puerperio (no más de 14 días) (2) y que clásicamente se caracteriza por hipertensión, edema y proteinuria (3,4). Sin embargo el síndrome puede ser pleomórfico y comprometer el sistema de la coagulación (5), el hígado, el riñón y el sistema nervioso central. Cuando esto último ocurre, la preeclampsia puede evolucionar a un estado similar al de las crisis convulsivas; en este caso el trastorno se denomina eclampsia, cuadro que lleva a la posibilidad de muerte a la madre o al feto.

Además de ser la complicación médica más común del embarazo los trastornos hipertensivos se asocian con una elevada morbilidad materna, fetal y neonatal (6,7).

Se sabe que en la EHAG la célula endotelial ocupa un papel central en su fisiopatogenia, siendo el daño endotelial uno de los aspectos fundamentales. Previamente se han estudiado marcadores circulantes de este daño endotelial

como son fibronectina, antígeno del factor VIII, laminina, disminución de prostaciclina y aumento de tromboxano A2 (8).

Ultimamente los mecanismos fisiopatogénicos se han orientado al aspecto molecular y a su participación en procesos iniciales del desarrollo, por lo que el objetivo de este trabajo es el estudio de la participación de moléculas de adhesión celular (MAC) en la EHAG. En base a que las MAC son una gran familia de moléculas que participan en diferentes funciones incluyendo el desarrollo embriológico e inflamación entre otras (9).

#### **EPIDEMIOLOGIA**

Se ha reportado que la preeclampsia se presenta entre el 7 y el 10% de los embarazos (6,10), siendo más común en primigestas (3,4). Se presenta entre un 14 y un 20% de las gestaciones múltiples y en un 25% en mujeres con hipertensión o nefropatía crónicas (4).

En México la frecuencia es del 8%, correspondiendo el 7.56% a toxemia leve, el 0.30% severa y el 0.14% a la eclampsia (11). En el Instituto Nacional de Perinatología en los últimos tres años ha sido alrededor del 7% constituyendo la principal causa de hospitalización (12).

Se han observado algunos factores de riesgo para desarrollar preeclampsia (6):

- \* Nuliparidad
- \* Gestaciones múltiples
- \* Historia familiar de preeclampsia-eclampsia
  
- \* Enfermedad renal o hipertensión preexistente
- \* Preeclampsia-eclampsia previa
- \* Diabetes
- \* Hidrops fetal no inmune
- \* Embarazo molar

#### **CLASIFICACION**

En el Instituto Nacional de Perinatología se ha adoptado la clasificación del Comité Americano de Salud Materna (2):

1. Enfermedad hipertensiva aguda del embarazo.
  - \* preeclampsia leve o severa
  - \* eclampsia
2. Enfermedad vascular crónica hipertensiva con embarazo
  - \* sin toxemia aguda agregada
  - \* con toxemia aguda sobreagregada
3. Toxemia recurrente.
4. Toxemia no clasificada (datos insuficientes para hacer el diagnóstico preciso).

Se considera que existe preeclampsia leve cuando después

de las 20 semanas de gestación aparecen dos o más de los siguientes signos (2):

- Tensión arterial (T.A.) sistólica de 140 mm Hg o más.
- Elevación de la T.A. sistólica 30 mm Hg o más de la cifra habitual.
- T.A. diastólica de 90 mm Hg o más.
- Elevación de la T.A. diastólica 15 mm Hg o más de la cifra habitual.
- T.A. media por arriba de 90 mm Hg.
- Proteinuria menor de 3grs/lt de orina obtenida en dos o más días consecutivos.
- Edema persistente de extremidades o cara.

Se entiende como preeclampsia severa o grave:

A) Cuando están presentes dos o más de los siguientes datos:

- T.A. sistólica de 160 mm Hg o más.
- T.A. diastólica de 110 mm Hg o más.
- Proteinuria de más de 3 grs/lt.
- Edema acentuado

B) Cuando está presente uno de los siguientes datos:

- T.A. sistólica de 180 mm Hg en forma repetida.
- Proteinuria de 5 grs/lt o más.

- Edema generalizado.
- Manifestaciones del inciso A, asociada a síntomas cerebrales, visual, gastrointestinales o renales.

#### ETIOLOGIAS PROPUESTAS

Aunque la causa de la EHAG aún se desconoce, diferentes teorías etiológicas se han propuesto ; dentro de ellas las inmunológicas fundamentan parte de nuestra hipótesis de trabajo, sin embargo es importante mencionar otras etiologías propuestas:

\* Desequilibrio entre Prostaciclina-Tromboxano:

En el embarazo normal las adaptaciones bioquímicas en la vasculatura materna incluyen cambios de las prostaglandinas, que conducen al predominio de efectos vasodilatadores (13).

La prostaciclina es sintetizada por el endotelio vascular y es un vasodilatador que inhibe la agregación plaquetaria. En preeclámpticas se ha visto que el daño endotelial puede causar disminución de la producción de prostaciclina con activación plaquetaria. La activación plaquetaria libera tromboxano A<sub>2</sub> (potente vasoconstrictor y agregante plaquetario) y serotonina causando vasoespasmo el cual favorece mayor agregación plaquetaria creándose un círculo vicioso (14,15,16).

**\* Susceptibilidad Genética:**

Existen algunos estudios que sugieren una participación genética en la patogenia de la preeclampsia. Esto se basa en el hecho de que existe un incremento en la frecuencia de preeclampsia y eclampsia en hijas de mujeres que tenían una historia de eclampsia (17,18). Además existen reportes de la posible participación de un gen autosómico recesivo en la preeclampsia (19).

**\* Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona:**

En la preeclampsia algunos componentes del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona están disminuidos con respecto a los embarazos normales y existe un marcado incremento de la sensibilidad a catecolaminas y péptidos presores (6,20). La causa de la reactividad vascular alterada es desconocida, pero se ha postulado que la vasoconstricción se debe a una absoluta o relativa deficiencia de prostaglandinas vasodilatadoras (14) o bien es causada por daño del endotelio vascular (21) capaz de generar vasoconstricción.

**\* Aspectos Inmunológicos:**

Un aspecto clave desde el punto de vista inmunológico, puede ser una interrelación inadecuada del trofoblasto fetal con el tejido materno en el lecho útero-placentario como factor fundamental en la etiología de la preeclampsia. Esto se sustenta por el hecho de que este síndrome a menudo complica el primer embarazo. Como resultado, se inicia una reacción inmunitaria aberrante en la primera exposición a los antígenos paternos y fetales extraños de la placenta. La incidencia de la preeclampsia aumenta al cambiar de compañero sexual y, en un embarazo posterior, después del uso de métodos de control natal que evitan la exposición a espermatozoides (13).

Además en el proceso de placentación participan macrófagos, células asesinas naturales, linfocitos T y neutrófilos activados. Un desequilibrio entre las células materno-fetales en el lecho placentario puede favorecer la EHAG (13,22). Recientemente se ha identificado un antígeno de histocompatibilidad clase-I no polimórfico, HLA-G, el cual se expresa en el citotrofoblasto y probablemente protege la placenta del rechazo (13).

#### LECHO UTERO-PLACENTARIO

En el proceso de placentación se sabe que el lecho útero-placentario constituye el elemento clave para conocer la causa y la patogenia de la preeclampsia (4). El tejido trofoblástico fetal migra en dos fases hasta las arterias espirales de la madre y desplaza la estructura elástica muscular de ellas. Entre la semana 16 y 18 de gestación se observa la segunda fase de migración trofoblástica y se extiende a las porciones miometriales de las arterias espirales. Los vasos se dilatan, y no pueden contraerse (23). La arteria espiral se transforma de un sistema de alta resistencia a otro de baja resistencia, lo cual ocasiona su dilatación y facilita el intercambio máximo de nutrimentos y gases. El defecto observado en la preeclampsia es la falta de invasión de los trofoblastos en las arterias espirales o la invasión incompleta de ellas (24). Los segmentos miometriales se mantienen intactos desde el punto de vista anatómico y no sufren dilatación.

Además los nervios adrenérgicos situados en la base de la arteria espiral desaparecen normalmente o pierden su función durante el embarazo. Si la mujer está "destinada" a presentar preeclampsia, se advierte "denervación" incompleta (4).

Recientemente Redman y colaboradores (25) han postulado mecanismos fisiopatogénicos en la preeclampsia con dos diferentes etapas. Inicialmente el proceso de placentación deficiente de las arterias espirales ya mencionado y el segundo llamado aterosclerosis aguda. Proceso donde las arterias espirales se obstruyen o ambos mecanismos con un fondo fisiopatogénico de tipo inmunológico (26).

#### **ENDOTELIO Y PREECLAMPSIA**

El endotelio vascular es un órgano complejo y activo con funciones metabólicas, endócrinas y estructurales *sui generis*. Algunos autores proponen que la preeclampsia puede ser explicada por funcionamiento inadecuado de las células endoteliales, iniciado por un factor (es) producido (s) como consecuencia de la reducción en la perfusión del trofoblasto (16). Dentro de las funciones de las células endoteliales destacan:

\* La activación del sistema de la coagulación y la agregación plaquetaria a la superficie endotelial es impedida por productos de las células endoteliales. Productos tales como la proteína C (potente anticoagulante), prostaciclina (que inhibe la agregación plaquetaria y estimula la trombolisis) y el factor de relajación derivado del

endotelio (que inhibe la adherencia y agregación de plaquetas). Además del activador de plasminógeno tisular que estimula la trombolisis y sulfato de heparano que acelera la inactivación de trombina por la antitrombina III (16,23).

\* modulación del tono vascular: las células endoteliales normalmente secretan agentes vasodilatadores tales como la prostaciclina y factor de relajación derivado del endotelio. Sin embargo, en presencia de numerosos estímulos que incluyen hipoxia, distensión de paredes arteriales y exposición a sustancias vasoactivas, las células endoteliales secretan agentes vasoconstrictores como la endotelina (16,23). La membrana superficial de las células endoteliales contiene enzima convertidora de angiotensina, que transforma la angiotensina I en su forma más activa, la angiotensina II, y también inactiva la bradicinina, que es un potente vasodilatador.

Las células endoteliales después de lesionadas no sólo pierden la capacidad de funcionar normalmente, sino también comienzan a expresar nuevas funciones:

- 1) la producción de sustancias vasodilatadoras se reduce por lo cual se favorece el vasoespasmo.

- 2) síntesis de procoagulantes, como el activador del factor XII y factores hísticos y mitógenos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, que también es

un vasoconstrictor (16,23).

3) por aumento de la permeabilidad de la membrana, existe extravasación de líquidos y proteínas al espacio extravascular.

Se han acumulado evidencias morfológicas y bioquímicas que hablan a favor de daño endotelial en la preeclampsia:

\* los hallazgos morfológicos están dados por la lesión característica a nivel renal conocida como endoteliosis glomerular. La cual se presenta en más del 70% de las primigestas con preeclampsia. Esta lesión mejora por completo después de terminada la gestación. Por otra parte se ha demostrado daño de las células endoteliales a nivel de las arterias del cordón umbilical (16).

\* Una vez que hay daño endotelial hay liberación de fibronectina, antígeno del factor VIII y laminina (16,27). Además se sabe que ciertas moléculas de adhesión celular de la familia de las lectinas como ELAM-1 ("endothelial leukocyte adhesion molecule-1") son liberadas a la circulación por daño endotelial en pacientes preeclámpticas (experiencia personal).

## MOLECULAS DE ADHESION CELULAR Y PREECLAMPSIA

Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas de superficie celular que pueden extenderse a través de la membrana celular o estar unidas a la membrana por medio de un lípido (9). Están implicadas en la interacción célula-célula o célula matrix extracelular (28), y juegan un papel importante en funciones celulares como la morfogénesis, inflamación, migración celular, respuesta inmune, metástasis de células malignas, quimiotaxis, etc (28,29).

Dependiendo de su estructura están clasificadas en diferentes familias (30): 1) las integrinas, moléculas heterodiméricas que funcionan como receptores de adhesión célula-substrato y célula-célula; 2) las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cuales están implicadas en la adhesión célula-célula y son especialmente importantes durante la embriogénesis, cicatrización y respuesta inflamatoria; 3) las caderinas, reguladoras del desarrollo, son proteínas de adhesión célula-célula homofílicas calcio-dependientes; 4) las lectinas, moléculas de adhesión celular con sitios afines a la lectina que median la adhesión de células sanguíneas a células endoteliales; y 5) receptores de destino de linfocitos a tejidos linfoides específicos. En particular

dentro del grupo de la superfamilia de las inmunoglobulinas cabe mencionar a ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1") la cual está presente en una gran variedad de células como fibroblastos, células epiteliales, células del endotelio vascular, etc. Esta molécula se une de manera específica a LFA-1 ("lymphocyte function-associated antigen-1") que pertenece a la familia de las integrinas y que interacciona de manera importante en algunos procesos de unión entre leucocitos y endotelio esenciales en fenómenos tales como la inflamación (28,29,30).

Recientemente Zhou y colaboradores (31) han reportado que los defectos en la invasión trofoblástica pueden estar asociados a cambios en el patrón de expresión de las MAC. Se tiene conocimiento que durante el primer trimestre del embarazo normal, se produce un cambio en la expresión de las integrinas en las células citotrofoblásticas del lecho placentario, que consiste en una baja regulación de alfa 6/beta 4 y una adecuada regulación de alfa 5/beta 1 y de alfa 1/beta 1. A partir del segundo trimestre en adelante la alfa 3 se expresa en todos los sitios de reconocimiento y al término del embarazo se expresa alfa 6 pero no beta 4.

Por el contrario, en las pacientes con preeclampsia, alfa 6/beta 4 se encuentran altamente expresados, alfa 1 no es detectado y alfa 3, alfa 5, y beta 1 son similares a los

encontrados en las pacientes normales. Se ha observado que al usar anticuerpos dirigidos contra la subunidad alfa 5 aceleran al doble la invasión trofoblástica y los anticuerpos contra alfa 1 inhiben este proceso. Esto puede desencadenar el mecanismo por el cual se inicia la lesión de las células endoteliales.

#### **RAZONES PARA DESARROLLAR LA INVESTIGACION**

En base a que la hipertensión es la complicación médica más frecuente del embarazo así como la elevada incidencia de la preeclampsia en nuestro instituto es de gran importancia estudiar el estado inmunológico en el que se encuentran las pacientes que cursan con ésta enfermedad.

#### **OBJETIVOS**

Por los trabajos anteriores realizados por nuestro equipo de trabajo sobre las moléculas de adhesión en diferentes tipos de endotelio y en la fisiología del endotelio vascular. Además de la importancia de conocer este padecimiento y aportar pruebas de valor diagnóstico y predictivo, se plantearon los siguientes objetivos:

\* cultivo de células endoteliales de cordones umbilicales.

\* incubar dichas CE con extractos placentarios y/o suero materno para la búsqueda de la expresión de diferentes epítomos de superficie (ICAM-1 y clase-I), a través de citofluorometría de flujo.

\* demostrar la presencia de MAC así como el grado de expresión de las mismas en diferentes estructuras vasculares (placenta y cordón umbilical). Esta búsqueda a través de técnicas histoquímicas como inmunoperoxidasa.

\* correlacionar la expresión de las moléculas de adhesión celular con lo observado en los cortes de placenta y cordón umbilical, así como con el comportamiento clínico de las pacientes.

\* estudiar el papel de las moléculas de adhesión celular en la fisiopatogenia de la enfermedad hipertensiva de la gestación, como potenciales receptores del o de los factores citotóxicos participantes en el daño al endotelio.

## HIPOTESIS

Por la importancia que los aspectos moleculares e inmunológicos tienen en la EHAG, nuestras hipótesis se fundamentan en:

- \* el endotelio vascular posee marcadores de superficie tales como las MAC y se esperaría que se modificara su grado de expresión al presentarse daño endotelial como el observado en la preeclampsia.

- \* la expresión de diferentes MAC en la preeclampsia puede ser la base de otros mecanismos fisiopatogénicos y estos a su vez ocasionar mayor daño endotelial.

- \* al conocer que las moléculas de adhesión celular participan como receptores en varias funciones biológicas, consideramos que también participan como ligandos del o de los factores citotóxicos que desencadenan el mecanismo fisiopatogénico de la enfermedad.

- \* averiguar si existe una correlación entre la expresión de ciertas CAM con el grado de severidad de la EHAG.

**MATERIAL Y METODOS**

Se estudiaron 18 pacientes que acudieron al servicio de urgencias del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), las cuales cursaban embarazos del tercer trimestre. En base a parámetros clínicos (tensión arterial) y de laboratorio (proteinuria) en concordancia con la clasificación de la EHAG adoptada en el INPer se diagnosticaron como preeclámpticas.

**CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION:**

\* Pacientes con EHAG: mujeres embarazadas que hayan rebasado la semana 20 de gestación y que se encuentren diagnosticadas como preeclampsia leve o severa, según la clasificación adoptada (ya referida previamente) por el INPer respecto a los trastornos hipertensivos del embarazo.

\* Pacientes con Eclampsia: Cuando hay presencia de convulsiones o estado de coma ya sea en el embarazo o en el puerperio inmediato, con hipertensión arterial, edema y proteinuria.

\* Pacientes con Enfermedad Vascul ar Crónica Hipertensiva con Embarazo (hipertensión esencial): cuando hay historia de aumento de la tensión arterial antes del embarazo o bien antes de las 20 semanas de gestación y persistencia de la tensión arterial elevada después de la resolución del

embarazo. Con cifras tensionales aceptadas iguales o mayores a 140/90 mm Hg.

\* Pacientes Control: mujeres con embarazos normoevolutivos, sin patología asociada, cuyo control prenatal se haya llevado a cabo en el Instituto, que rebasen las 20 semanas de gestación y con edades gestacionales semejantes a las pacientes problema.

\* Criterios de Exclusión: serán aplicados a aquellas pacientes que no cumplan con las características antes mencionadas. Se excluirán aquellas pacientes con datos insuficientes para hacer el diagnóstico de preeclampsia o bien aquellas que cursen con hipertensión arterial secundaria (patología renal, hiperaldosteronismo primario, etc) o con alguna patología de tipo inmunológico (vgr. lupus eritematoso sistémico)

A todas las pacientes a su ingreso se les tomó muestras de suero y posterior a la resolución del embarazo se obtuvieron fragmentos de placenta y cordón umbilical.

\* Sueros:

Las muestras de suero fueron tomadas durante el tercer trimestre de la gestación (36 semanas en promedio). Se

hicieron alicuotas y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las muestras de suero de los controles correspondieron a pacientes con semejantes edades gestacionales.

\* Extractos placentarios:

Los fragmentos de placenta se obtuvieron una vez resuelto el embarazo, los cuales incluían cara materna y fetal. Fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  o bien preservados en formol al 10% para ser incluidos posteriormente en parafina. Las placentas congeladas se homogenizaron con medio de cultivo M-199 sin suero, se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante se recuperó y se hicieron alicuotas para congelarlo a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Usando el método de Bradford se determinó la concentración de proteínas de los extractos placentarios. Dicho método se realizó con una prueba colorimétrica con azul de Coomassie G-250, usando como referencia albúmina para leerse a 595 nm en el espectrofotómetro.

Durante los experimentos la concentración del suero y de extractos placentarios fué de un 20%, igual a las concentraciones de suero usadas en los cultivos de células endoteliales.

**\* Cultivo de Células Endoteliales:**

Las células endoteliales (CE) fueron aisladas de la vena de cordones umbilicales frescos por digestión con colagenasa al 0.1% (Sigma) durante 15 minutos. Después de la incubación las células fueron eluidas con solución de Hank para centrifugarlas a 1500 rpm por 10 minutos. El botón celular fué resuspendido en medio de cultivo M-199 con 20% de suero fetal humano, antibióticos, mitógeno 400 ug/ml, (Biomedical Technologies Inc.) y heparina (Sigma). Sembradas en cajas Falcon e incubadas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las cultivos estaban a confluencia, se incubaron con suero humano normal ó problema al 20%, o bien con extracto placentario a igual concentración a diferentes períodos de incubación.

**\* Cultivos de Fibroblastos:**

Fibroblastos de piel humana fueron usados como controles. Se cultivó con 10% de suero fetal de bovino y antibióticos en medio de cultivo M-199. Una vez que los cultivos presentaban confluencia, se incubaron en iguales condiciones que las células endoteliales en los diferentes estudios experimentales.

\* Estudios de citometria de flujo:

Las CE así como los fibroblastos se incubaron con sueros o extractos placentarios (en las condiciones antes descritas). Las células fueron tripsinizadas (Sigma) y lavadas para agregar los diferentes anticuerpos por espacio de 30 minutos a 4°C. Se lavaron, se agregó el segundo anticuerpo (cuando era necesario) y se incubó durante el mismo tiempo y condiciones. Nuevamente se lavaron y resuspendieron en amortiguador de fosfatos en proporción de  $5 \times 10^5$  cél/ml para realizar la lectura en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson).

Los anticuerpos utilizados fueron: sobrenadante anti-ICAM-1 (84H10) y anti-clase-I (w632) ambos cortesía del Dr. T.J.Lawley (Universidad de Emory); anti- ICAM-1 purificado (CD54) con ficoeritrina (Becton Dickinson).

\* Técnicas de inmunohistoquímica:

Se realizaron cortes de 5µm de los fragmentos placentarios y cordones umbilicales incluidos en parafina para la búsqueda de diferentes MAC. Se utilizaron anticuerpos contra ICAM-1 y clase-I con técnicas de inmunoperoxidasa y diaminobenzidina (Vectastain, Bulyngame, CA). La interpretación de los resultados fueron

evaluadas cualitativamente por dos investigadores en el microscopio fotónico.

**\* ANALISIS ESTADISTICO**

Los valores independientes correspondientes a los diferentes experimentos se promediaron y obtuvieron desviaciones standard (SD). Por otra parte se usó estadística no paramétrica para la evaluación de los resultados através de la prueba de  $\chi^2$ . Con el fin de comparar un grupo de frecuencias observadas entre los diferentes pacientes (normales y anormales). El tipo de valores analizados fueron la expresión de la MAC llamada ICAM-1 y el antígeno clase I. Todos ellos con las diferentes modalidades de acuerdo a los diferentes experimentos realizados. Los resultados fueron analizados según la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

donde:

$O_i$  = número de pacientes clasificados en la categoría de  $i$

$E_i$  = número de pacientes esperado de acuerdo a la hipótesis formulada

## RESULTADOS

Se estudiaron 18 pacientes en total. El rango de edad de las pacientes fue de 20-39 años con un promedio de 30 años. Las muestras de suero fueron tomadas en el tercer trimestre de la gestación entre la semana 37 con un rango de 28-42. Once de estas pacientes se diagnosticaron como preeclámpticas y 7 de ellas presentaron embarazos normoevolutivos. De las pacientes preeclámpticas, 8 se clasificaron como severas (2 iminencias de eclampsia) y 3 como leves.

Con respecto a la paridad 5 de las 11 pacientes que desarrollaron preeclampsia eran primigestas, en 4 de ellas el comportamiento fue severo. En el resto de pacientes preeclámpticas la paridad fue variable, con un máximo de cuatro gestaciones previas. De las 7 pacientes con embarazos normoevolutivos, 4 eran primigestas y 3 multigestas (hasta 7 embarazos previos).

## ESTUDIOS DE CITOMETRIA DE FLUJO

**NOTA:** los valores anotados en las gráficas de los estudios de citometría están basados en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia MCF ("mean channel fluorescence")

#### EPITOPOS DE CE INCUBADOS CON EXTRACTOS PLACENTARIOS

Los extractos placentarios normales mostraron una basal de 6.6 SD 2.7 como control negativo. La expresión de ICAM-1 fue de 157.8 SD 74 mientras que la de clase I de 67.5 SD 43. Después de 2 h de incubación ICAM-1 mostró valores de 47.7 SD 19 a las 2 hr y de 55.4 a las 21 hr. Por otra parte clase I mostró valores de 90 SD 96 a las 2 hr y de 354.7 SD 73 después de 21 hr (gráfica 1).

En los que respecta a las CE incubadas con suero materno con EHAG mostraron un incremento en la expresión de ICAM-1 a la hora (de 42.2 SD 26 a 105.3 SD 117). Tres horas después este vaor descendió a 7.9 SD 6 (gráfica 2). Por el contrario clase I mostró un efecto opuesto (225 a 187.5) como se ve en la gráfica 2.

En forma paralela los fibroblastos de piel humana se usaron como controles, mostrando solo un incremento para clase I (169 a 258). Mientras que para ICAM-1 se observó un ligero incremento de 6.6 a 20.4 y 22.1 a la hora y 3 hr respectivamente (gráfica 3).

Los mismos estudios de citometría se muestran en forma de histogramas (figura 1) donde observamos un aumento de la intensidad de fluorescencia endotelial al estar coincubado con suero preeclámptico. En forma comparativa la figura 2 ilustra la falta de incremento en la expresión del mismo

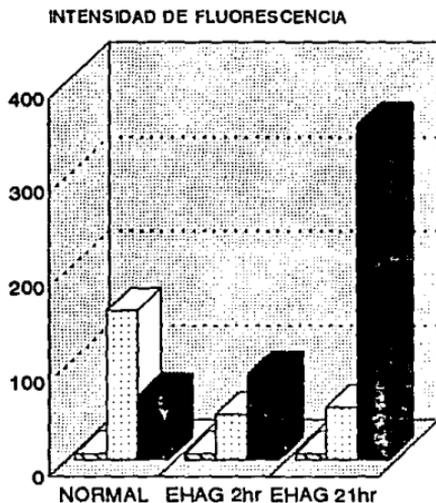
con suero preeclámptico. En forma comparativa la figura 2 ilustra la falta de incremento en la expresión del mismo marcador (ICAM-1) en fibroblastos de piel humana.

En las tablas 1 y 2 se anotan los resultados del análisis estadístico hecho en los diferentes experimentos. Los valores obtenidos en los estudios de expresión de ICAM-1 en endotelio bajo la influencia de suero normal y con EHAG mostraron una  $P < 0.05$ . Por otra parte los otros valores muestran  $P$  mayores de este valor.

#### **ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUIMICA**

La expresión de epítomos tales como ICAM-1 y clase I fueron también valoradas en forma cualitativa. A través de su expresión en cortes de placenta y cordón umbilical. La tabla 3 muestra mayor expresión de ICAM-1 endotelial en placentas preeclámpticas. Por el contrario los cordones umbilicales, tanto en venas como en arterias, no mostraron incremento de los mismos marcadores. Con respecto a clase I no se observó ninguna diferencia en su expresión ni en placentas ni en cordones umbilicales (figuras 3 y 4).

EXPRESION DE EPIPOPOS ENDOTELIALES  
EN EXTRACTOS PLACENTARIOS

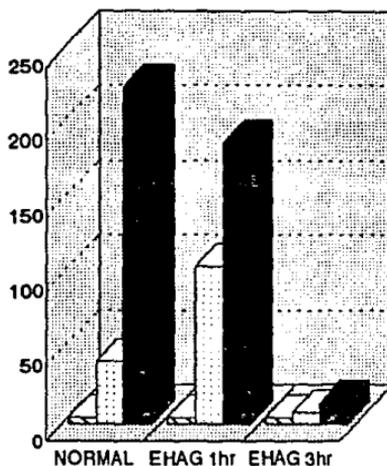


BASAL		6.6	6.6	6.6
ICAM-1		157.8	47.7	55.1
CLASE-I		67.5	90.1	354.7

GRAFICA 1. Representación gráfica del decremento en la expresión de la molécula de adhesión celular ICAM-1 y el incremento de Clase-I en cultivos de células endoteliales con extractos placentarios preeclámpticos.

EXPRESION DE EPITOPOS ENDOTELIALES  
CON SUERO MATERNO

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

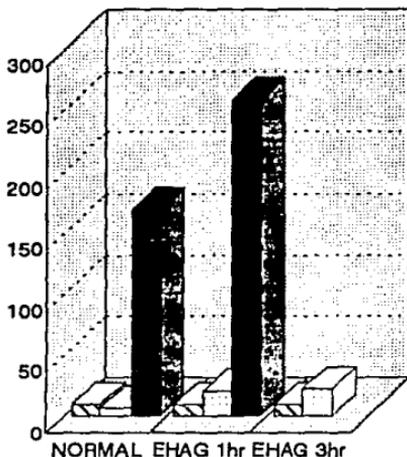


BASAL	4.5	4.5	4.5
ICAM-1	42.2	105.3	7.9
CLASE-I	225	187.5	14.5

GRAFICA 2. Representación gráfica del incremento de la molécula de adhesión celular ICAM-1 a la primera hora de incubación con suero materno preeclámptico. Nótese el decremento de la expresión de Clase-I y de ICAM-1 después de tres horas de incubación.

EXPRESION DE EPITOPOS EN FIBROBLASTOS  
CON SUERO MATERNO

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

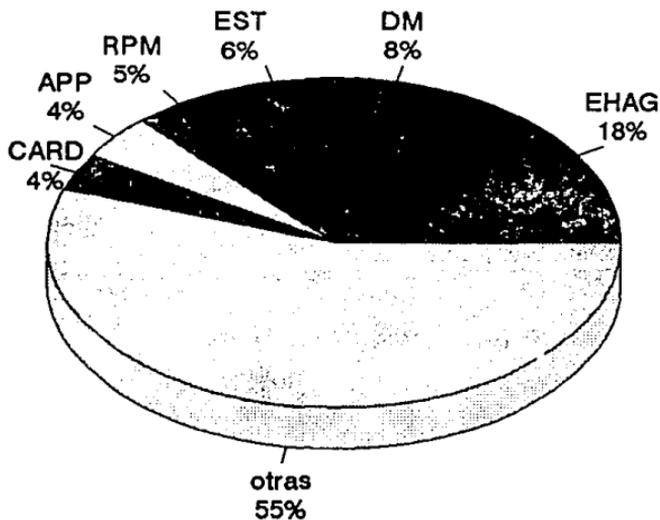


BASAL		9.2	9.2	9.2
ICAM-1		6.6	20.4	22.1
CLASE-1		169	258.2	

GRAFICA 3. Fibroblastos de piel fueron usadas como células control. No se observó ninguna modificación en la expresión de ICAM-1 comparados con las CE. Sí hay incremento de clase-I

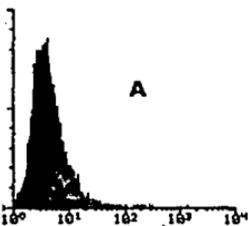
## PRINCIPALES CAUSAS DE HOSPITALIZACION

INPer ene-jun 93



GRAFICA 4. EHAG.-Enfermedad hipertensiva asociada a la gestación. DM.-diabetes mellitus. EST.-esterilidad. RPM.-ruptura prematura de membranas. APP.-amenaza de parto pretermino. CARD.- cardiopatias. Otras (incompetencia cervical, miomatosis uterina, infección de vías urinarias, aborto incompleto).

U3:882493082\FL1-H\FL1-Height



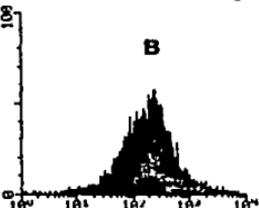
A

U3:882493082\FL1-H\FL1-Height

--- Arithmetic Histogram Statistics for U3:882493082 ---

Parameter	FL1-H	FL1-Height	Ungated						
M	Left,Right	Events	%	Peak	PkCh1	Mean	Median	SD	CV
0	1.00, 9910	10000	100.00	85	4.17	5.58	3.91	16.36	>100.0

U3:882493083\FL2-H\FL2-Height



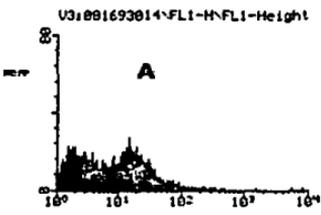
B

U3:882493083\FL2-H\FL2-Height

--- Arithmetic Histogram Statistics for U3:882493083 ---

Parameter	FL2-H	FL2-Height	Ungated						
M	Left,Right	Events	%	Peak	PkCh1	Mean	Median	SD	CV
0	1.00, 9910	10000	100.00	57	235.01	205.00	190.83	404.94	>100.0

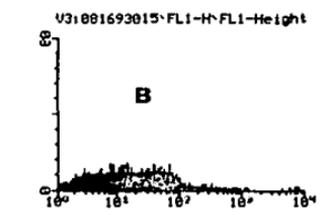
FIGURA 1. El histograma A muestra el control negativo para el endotelio. El histograma B muestra el incremento en la intensidad de fluorescencia bajo la influencia de suero preecláptico.



U3:081693014~FL1-H~FL1-Height

--- Arithmetic Histogram Statistics for U3:081693014 ---

Parameter	FL1-H	FL1-Height	Ungated							
M	Left,Right	Events	%	Peak	PkCh1	Mean	Median	SD	CV	
0	1.00,	9910	5000	100.00	287	1.00	15.67	6.02	141.00	>100.0



U3:081693015~FL1-H~FL1-Height

--- Arithmetic Histogram Statistics for U3:081693015 ---

Parameter	FL1-H	FL1-Height	Ungated							
M	Left,Right	Events	%	Peak	PkCh1	Mean	Median	SD	CV	
0	1.00,	9910	3142	100.00	116	1.00	53.59	13.69	383.03	>100.0

FIGURA 2. El histograma A muestra un control negativo mientras que el histograma B corresponde a ICAM-1 no mostrando mayor diferencia en la intensidad de fluorescencia para ICAM-1, en fibroblastos con suero preclámptico.

**FIGURA 3. Corte de placenta usado como control negativo normal en los estudios de inmunohistoquímica.**

**FIGURA 4. Corte de placenta con EHAG mostrando una gran positividad de ICAM-1 en el lecho placentario.**

ICAM-1 CON SUEROS NORMALES Y PREECLAMPTICOS

	fibroblastos	endotelio
$\chi^2$	0.069	3.36
P	> 0.05	< 0.05

ICAM-1 CON EXTRACTOS PLACENT. NORMALES Y PREECLAMTICOS

	endotelio
$\chi^2$	0.0169
P	> 0.05

Tabla 1. Se señalan los valores de  $\chi^2$  en base al número de pacientes analizados en los diferentes experimentos a fin de estudiar la expresión de ICAM-1.

CLASE I CON SUEROS NORMALES Y PREECLAMPTICOS

	fibroblastos	endotelio
X <sup>2</sup>	0.069	0.187
P	> 0.05	> 0.05

CLASE I CON EXTRACTOS PLACENT. NORMALES Y PREECLAMPTICOS

	endotelio
X <sup>2</sup>	0.079
P	> 0.05

Tabla 2. Se señalan los valores de X<sup>2</sup> en base al número de pacientes analizados en los diferentes experimentos a fin de estudiar la expresión de clase I.

**EXPRESION DE ICAM-1 EN PLACENTA**

**inmunoperoxidasa**

<b>DX</b>	<b>cntrl. neg.</b>	<b>ICAM-1</b>	<b>clase I</b>
<b>normal</b>	-	+	+
<b>EHAG</b>	-	+++	++

Tabla 3. Los hallazgos para la MAC llamada ICAM-1 se encontraron con más frecuencia en pacientes con EHAG. No fue tan evidente la diferencia para clase I.

## DISCUSION

Las diferentes teorías sobre la posible etiología de la EHAG parecen cada vez más congruentes. Muchos de los estudios experimentales han demostrado que el daño al endotelio es uno de los eventos centrales en la fisiopatogenia, sin embargo queda por averiguar cuál es el efecto que motiva este daño. Recientemente se han estudiado los aspectos moleculares y estructurales iniciales de este padecimiento. Ahora se sabe que estructuralmente hay un defecto en los mecanismos de placentación al parecer causados por una deficiencia en la expresión de algunas moléculas de adhesión celular (26).

Pocos estudios (31) se han hecho en relación a las características inmunofenotípicas endoteliales en la enfermedad hipertensiva aguda de la gestación, los cuales demuestran defectos inmunofenotípicos basados en la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular.

En los últimos años la gran familia (s) de moléculas de adhesión celular se ha conocido y caracterizado mejor. Se conoce que participan en diversas funciones biológicas y el papel que desempeñan en el proceso de placentación es determinante para que se lleve a cabo la migración trofoblástica.

El interés principal al realizar este trabajo se basa en la frecuencia de la EHAG en nuestro instituto (gráfica 4). Además de demostrar que el daño endotelial en la enfermedad hipertensiva aguda de la gestación además de acompañarse de consecuencias a nivel bioquímico existen cambios inmunofenotípicos que originan las complicaciones propias de este padecimiento.

En base a los resultados obtenidos podemos decir que existen cambios en algunos de los marcadores de superficie estudiados (ICAM-1 y clase-I). Estos cambios son principalmente originados por la influencia de suero de pacientes con preeclampsia, como se pudo observar en el incremento de la expresión de ICAM-1. Esta molécula de adhesión celular está presente en diferentes estirpes celulares entre las que se encuentra el endotelio. El hecho de encontrar una mayor expresión de ICAM-1 en endotelio bajo la influencia de suero con preeclampsia observamos que entre más severa es la EHAG mayor es la expresión de este tipo de molécula. Ya otros autores han encontrado efecto de suero preeclámptico sobre endotelio, tales como el aumento de RNAm para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas entre otros hallazgos (32).

Los estudios de inmunohistoquímica realizados corroboran en gran medida los hallazgos en estudios de citometría de flujo al encontrar mayor expresión de ICAM-1 en placentas con

EHAG. Este hallazgo es esperable dado que la placenta es rica en endotelio, tejido que seguramente también recibe la influencia de factores circulantes en la preeclampsia.

El hecho de encontrar una mayor expresión de ICAM-1 en endotelio bajo la influencia de suero de pacientes preeclámicas, habla de la existencia de algunos factores circulantes muy posiblemente los llamados modificadores de la respuesta biológica (ej. IL-1, etc). Queda por determinar cuál de este factor (es) son los responsables de este aumento en la expresión de esta no integrina así como de clase I.

Muy posiblemente se trate de la IL-1 cuya producción autócrina es en gran parte proveniente del endotelio. Este tipo de citocinas son liberadas durante procesos de inflamación o de daño celular.

El aumento de esta molécula de superficie endotelial puede ser la base o la consecuencia de otros eventos fisiopatogénicos en la EHAG.

Con respecto a los antígenos de clase I, éstas son glicoproteínas de superficie que poseen diferentes formas de expresión. Su función principal reside en presentar antígenos a los linfocitos CD8 a través de unir fragmentos

peptídicos derivados de la degradación intracelular de antígenos proteicos.

El aumento de esta molécula hallada por nosotros en el endotelio abre nuevas posibilidades fisiopatogénicas en la EHAG. Por observaciones hechas por nosotros, en otros estudios, existe citotoxicidad endotelial en la EHAG. Por lo que en base a que los antígenos de clase I presentan antígenos a los linfocitos CD8 esto puede ser esencial en la participación de procesos citotóxicos en este padecimiento.

El hecho de usar fibroblastos como células control nos permitió comprobar que los hallazgos encontrados son hasta cierto punto específicos para el endotelio, con lo que respecta a la expresión de ICAM-1.

El análisis estadístico demostró que hubo resultados significativos en lo referente a los valores de ICAM-1 con suero preeclámptico en CE. No obstante los valores de los otros resultados a pesar de ser muy claros en las gráficas, estadísticamente no son significativos ya que el número de la muestra es pequeño.

Los resultados anteriores son preliminares. Este es un estudio prospectivo a fin de ampliar la muestra a estudiar. Los hallazgos anteriores dan a conocer un aspecto nuevo en la fisiopatogenia de este padecimiento. Además de constituir la

base para estudiar otras MAC y su expresión endotelial y establecer mecanismos citotóxicos participantes.

Esta también puede ser la base para estudios de diagnóstico y de pronóstico en este tipo de pacientes al correlacionar grado de expresión con condiciones clínicas. Finalmente por primera vez en el INPer se usaron estudios de citometría de flujo correlacionados con estudios de inmunohistoquímica en un padecimiento de tanta importancia para nuestra institución.

## REFERENCIAS

1. Rappaport VJ, Hirata G, Yap HK, Jordan SC: Anti-vascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:138-146.
2. Instituto Nacional de Perinatología: Enfermedad hipertensiva aguda del embarazo. En: *Normas y Procedimientos de Obstetricia y Ginecología*. México D.F; 1990.
3. Cunningham FG, Lindheimer MD: Hypertension in pregnancy. *N Engl J Med* 1992; 326:927-932.
4. Zuspan FP: Nuevos conceptos en el conocimiento de las enfermedades hipertensivas durante el embarazo. En: *Clínicas de Perinatología*. México, D.F:Ed. Interamericana, 1991: vol 4: 637-643.
5. Martin JN, Blake PG, Perry KG, McCaul JF, Hess LW, Martin RW, Mississippi J: The natural history of HELLP syndrome: Patterns of disease progression and regression. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1500-1513.
6. Fairlie FM, Sibai BM: Hypertensive diseases in pregnancy. En: Reece EA, ed: *Medicine of the fetus and mother*. Philadelphia: J.B Lippincott Company, 1992: vol 2: 925-942.
7. Norris LA, Gleeson N, Sheppard BL, Bonnar J: Whole blood platelet aggregation in moderate and severe pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 684-688.
8. Zeeman GG, Dekker GA: Endothelial function in normal and preeclamptic pregnancy: a hypothesis. *Europ J Obst and Rep Biol* 1992; 43: 113-122.
9. Cunningham BA: Cell adhesion molecules and the regulation of development. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 939-48.
10. Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM: Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 908-914.
11. López Llera MM: *La toxemia del embarazo*. 2a Edición. México, D.F. Ed. Limusa, 1985.
12. Instituto Nacional de Perinatología. Unidad de Análisis y Estadística.

13. Zeeman GG, Dekker GA: Patogenia de la preeclampsia: una hipótesis. En: Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. México, D.F: Ed. Interamericana, 1992: vol 2: 311-328.
14. Walsh SW: Preeclampsia: An imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. Am J Obstet Gynecol 1985; 152:335-340.
15. Friedman SA: Preeclampsia: A review of the role of prostaglandins. Obstet Gynecol 1988; 71: 122-137.
16. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK: Preeclampsia: An endothelial cell disorder. Am J Obstet Gynecol 1989; 161: 1200-4.
17. Chesley LC, Cooper DW: Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of preeclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93: 898-908.
18. Cooper DW, Hill JA, Chesley LC, Bryans CI: Genetic control of susceptibility to eclampsia an miscarriage. Br J Obstet Gynaecol 1988; 95: 644-653.
19. Hayward C, Livingstone J, Holloway S, Liston WA: An exclusion map for preeclampsia: assuming autosomal recessive inheritance. Am J Hum Genet 1992; 50: 749-757.
20. O'Brien WF: Predicting preeclampsia. Obstet Gynecol 1990; 75: 445-452.
21. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A: Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. Am J Hypertens 1991; 4 (8): 700-708.
22. Bulmer JN: Immune aspects of pathology of the placenta bed contributing to pregnancy pathology. Baillieres Clin Obstet Gynaecol 1992; 6(3): 461-488.
23. Friedman SA, Taylor RN, Roberts JM: Fisiopatología de la preeclampsia. En: Clínicas de Perinatología. México, D.F: Ed. Interamericana, 1991: vol 4: 645-665.
24. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I: Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93: 1049-1059.

25. Redman CW: Immunological aspects of pre-eclampsia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992; 6 (3): 601-615.
26. Khong T Y, Sawyer H, Heryet AR: An immunohistologic study of endothelialization of uteroplacental vessels in human pregnancy-evidence that endothelium is focally disrupted by trophoblast in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:751-6.
27. Ballegger VC, Spitz B, De Baene LA, Van Assche AF, Hidajat M, Criel AM: Platelet activation and vascular damage in gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 629-33.
28. García-González E, Swerlick RA, Lawley TJ: Cell adhesion molecules. *Am J Dermatopathol* 1990; 12(2): 188- 192.
29. Lasky LA: Lectin cell adhesion molecules ( LEC-CAMs ): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation. *J Cell Bioch* 1991; 45: 139-146.
30. Albelda SM, Buck CA: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-2880.
31. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ: Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91: 950-960.
32. Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN: Sera from preeclamptic women specifically active human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol* 1992; 27:101-108.

\*\*\*