

11217

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZALEZ

EXPRESION DE LOS PROTOONCOGENES c-ras y
c-fos EN PLACENTAS PREECLAMPTICAS VERSUS
PLACENTAS NORMALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALIDAD EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

276544

P R E S E N T A L A :

DRA. MARIA DEL ROSARIO ARTERO CLAROS

TUTORES: DR. LUIS ALBERTO VILLANUEVA EGAN
BIOL. MAURICIO RODRIGUEZ DORANTES



MEXICO, D. F.

MARZO 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA
GONZALEZ

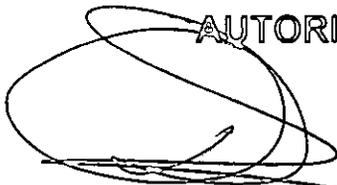
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

INVESTIGADOR RESPONSABLE
DR. LUIS ALBERTO VILLANUEVA EGAN

INVESTIGADOR PRINCIPAL
DRA. MARIA DEL ROSARIO ARTERO CLAROS

INVESTIGADORES ASOCIADOS
DRA. SUMIKO MORIMOTO MARTINEZ
BIOL. MAURICIO RODRIGUEZ DORANTES

AUTORIZACIONES



**HOSPITAL GENERAL
DR. MANUEL GEA GONZALEZ**

**DIRECCION DE
INVESTIGACION**

**Dra. Ma. De los Dolores Saavedra Ontiveros
Directora de Investigación**

**Dr. Hector Villarreal Velarde
Director de Enseñanza**

**HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"**

DIRECCION DE ENSEÑANZA

**Dra. Ma. Teresa Velasco Jimenez
Subdirectora de Enseñanza**

HOSPITAL GENERAL

"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"



SUBDIRECCION DE

INVESTIGACION

**Dr. Luis Alberto Villanueva Egan
Subdirector de Investigación**



Dr. Enrique García Lara

Subdirector de Ginecología y Obstetricia

Profesor Titular del Curso de Ginecología y Obstetricia



Dr. Luis Alberto Villanueva Egan
Asesor de Tesis

INDICE

	PAGINA
ANTECEDENTES	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
JUSTIFICACION	18
OBJETIVO	19
HIPOTESIS	19
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	25
DISCUSION	25
ANEXOS	27
BIBLIOGRAFIA	29

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios Mío por darme la vida y por el privilegio de ser un instrumento tuyo.

Gracias Virgen de Guadalupe Madre Divina por estar siempre a mi lado.

A mis padres, hermanos, tíos, primos, sobrinos y a Mercedes gracias por su apoyo paciencia y comprensión.

A mi esposo gracias por ayudarme a crecer.

A mi hija Rosario Paola gracias por comprender estos cuatro años de mi ausencia.

A mis Maestros, compañeros, al Hospital Gea Gonzalez gracias por compartir cuatro años de mi vida.

Gracias mujer mexicana por haberme dejado aprender de ti.

A mis tutores Dr. Luis Villanueva y Dra. Sumiko Morimoto y Biol. Mauricio Rodriguez gracias por hacer posible la realización de esta tesis.

ANTECEDENTES.

La Preeclampsia representa la primera causa de mortalidad materna en 6 de 23 países analizados por la OPS y la segunda en nueve más y se encuentra entre las primeras 5 causas de morbilidad materna.¹

Cada año medio millón de mujeres mueren por causas relacionadas con el embarazo en el mundo, el 99% de estas muertes ocurren en los países en desarrollo. Del 10 al 15% de las muertes maternas están asociadas con trastornos hipertensivos y el 10% esta asociado con Preeclampsia / Eclampsia.²

En México, las estadísticas de mortalidad relacionada con la salud reproductiva de 1980 a 1997, destacan el papel preponderante de la Preeclampsia que alcanza el 32.8% respecto al total de defunciones en mujeres de 15 a 49 años, con tasas elevadas en las edades extremas, ocupando el segundo lugar dentro de las causas obstétricas directas.³

CLASIFICACIÓN

La Preeclampsia se considera la complicación médica más frecuente que ocurre durante el embarazo, y forma parte de los trastornos hipertensivos del mismo.

Acorde con el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia, la hipertensión durante el embarazo se diagnostica por la presencia de los siguientes criterios:

- 1.- Aumento de la presión arterial sistólica en 30mmHg o mayor.
- 2.- Aumento de la presión arterial diastólica en 15mmHg o mayor.
(El incremento se valora en relación a cifras pregestacionales o a las medidas durante el primer trimestre del embarazo actual).
- 3.- Presión arterial sistólica de 140mmHg o superior.
- 4.- Presión arterial diastólica de 90mmHg o superior.

Estas alteraciones de la presión arterial deben estar presentes en dos tomas diferentes, con 6 horas o más de diferencia.^{4,5}

El grupo de trabajo National High Blood Pressure Education Program (1990), recomienda utilizar la clasificación original de Hughes (1972) que a continuación se transcribe.

- 1.- Hipertensión inducida por el embarazo.
 - a) Preeclampsia.
 - b) Eclampsia.
- 2.- Hipertensión crónica de cualquier causa pero independiente de la gestación.
- 3.- Preeclampsia o eclampsia sobreañadida a hipertensión crónica.
- 4.- Hipertensión transitoria.^{4,5}

CUADRO CLINICO

La Preeclampsia es un síndrome caracterizado por:

1.- Hipertensión.

Presión diastólica > 110mmHg en una ocasión.

Presión diastólica > 90mmHg en dos o más ocasiones, con intervalo de 4 horas.

2.- Proteinuria: igual o mayor a 300 mg en 24 horas o 2 muestras obtenidas por sonda vesical con un intervalo de 4 horas.

1.0 g. de albúmina por litro o >2+ en tira reactiva.

0.3 g. de albúmina por litro o >1+ en tira reactiva si la densidad urinaria es < 1030 o el pH urinario es < 8.

3.- Edad gestacional: > de 20 semanas^{4,5,6}

La Preeclampsia Severa esta presente si uno o mas de los siguientes signos se encuentran:

1.- Presión arterial sistólica > 160 mmHg o diastólica >110mmHg.

2.- Proteinuria de 5.0 g. o mas en 24 horas. 3-4+ en tira reactiva.

3.- Incremento de creatinina >1.2 mg/dl

4.- Cuenta plaquetaria menor de 100.000/ml. o evidencia de anemia hemolítica microangiopática. (con incremento de DHL).

5.- Elevación de enzimas hepáticas . alaninoaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST).

6.- Cefalea u otras alteraciones visuales u otros signos cerebrales.

7.- Dolor epigastrio o dolor en cuadrante superior derecho.

8.- Descompensación cardiaca. Edema pulmonar.^{5,7}

9.-Oliguria, cianosis y dolor torácico.

La Eclampsia es la presencia de convulsiones en una paciente con preeclampsia que no pueden ser atribuidas a otras causas.⁵

FISIOPATOLOGIA DE LA PREECLAMPSIA

La Preeclampsia es una enfermedad que a pesar de su frecuencia y de la gravedad de sus complicaciones continúan siendo desconocidas las causas que la provocan.⁷

Se han identificado los siguientes factores de riesgo:

- Las mujeres primigestas son 6 a 8 veces mas susceptibles que las mujeres múltiparas.⁵
- Cerca de un tercio de mujeres primigrávidas que tuvieron eclampsia tienen hipertensión en un 20% de sus embarazos posteriores.⁵
- Existe una tendencia hereditaria. Mayor incidencia de preeclampsia en hijas de madres que tuvieron preeclampsia.⁸
- Los embarazos gemelares incrementan el riesgo 5 veces.⁵
- La diabetes incrementa el riesgo.⁵
- La enfermedad trofoblástica gestacional incrementa el riesgo 10 veces tanto en primigestas como en múltiparas.⁵
- El hidrops fetal incrementa el riesgo 10 veces.⁵
- Las mujeres múltiparas tienen un riesgo mayor cuando cambian de pareja.⁹
- La inseminación por donador o donación de oocito están asociadas a un mayor riesgo de preeclampsia.⁹
- Un periodo corto de exposición al espermatozoides, así como el uso del condón incrementan el riesgo.⁹

Diversos autores han postulado diferentes rutas fisiopatológicas que intentan explicar los mecanismos que participan en el origen y desarrollo de esta enfermedad.

En el embarazo normal los citotrofoblastos invaden las arteriolas espirales hasta el primer tercio del miometrio destruyendo la capa muscular y la inervación autonómica de las mismas, de esta manera se mantiene la circulación uteroplacentaria como un sistema de baja resistencia, baja presión y flujo elevado que permiten el incremento del suministro sanguíneo al feto en crecimiento.^{10,11}

Robertson y Khong refieren que en la preeclampsia existe una alteración de la invasión trofoblástica de las arterias espirales que siguen teniendo la arquitectura presente fuera del embarazo y en consecuencia no se dilatan.¹¹

Zhou Yan y cols., demostraron que los citotrofoblastos normalmente transforman su fenotipo por el del endotelio de los vasos sanguíneos maternos asemejándose a estas células endoteliales que reemplazan; en la preeclampsia existe una reducción en la invasión de las arterias espirales por los citotrofoblastos que no transforman su fenotipo de adhesión vascular conservando los vasos arteriales su alta resistencia hasta el término del embarazo resultando en una reducción del flujo sanguíneo placentario lo que es un factor de riesgo para el desarrollo de la preeclampsia.^{7,11}

Se han propuesto mecanismos genéticos e inmunológicos que participan en la placentación defectuosa.^{1,7}

Chesley y cols., postularon una tendencia familiar para el desarrollo de la preeclampsia al encontrar un 26% de incidencia de preeclampsia en hijas de mujeres que tuvieron la enfermedad y sólo un 8% en las nueras. El desarrollo de la preeclampsia podría estar asociado a un gen único recesivo o a una herencia de origen multifactorial.^{7,12}

En las primeras etapas del desarrollo los genes paternos son los que controlan el desarrollo placentario y los genes maternos desempeñan un papel más importante en el desarrollo del embrión. En el desarrollo existen diferencias que dependen del origen paterno o materno de los genes que se heredan. Esta selección paterna o materna se realiza mediante la inactivación de uno u otro de los alelos a través de un proceso de metilación. Al mecanismo se le conoce como impresión genómica o huella genómica y permite explicar patrones de herencia que no pueden ser interpretados mediante los mecanismos mendelianos clásicos.^{1,13,14}

Graves sugiere que la preeclampsia podría originarse con la mutación de un gen paterno (metilación del gen paterno) y la expresión de un gen materno (demetilación del gen materno) lo que afectaría el desarrollo placentario.¹⁵

La expresión de HLA-G de Clase I en el citotrofoblasto que esta contiguo a los tejidos maternos hace que el citotrofoblasto sea capaz de invadir la decidua porque los linfocitos granulares grandes del útero reconocen a este citotrofoblasto como propio.^{7,12}

Colbern y cols., observaron en la preeclampsia niveles bajos en la expresión de HLA-G.¹⁵

Lim y cols., demostraron que en la preeclampsia hay una alteración en la expresión de HLA-G y por esta razón podría ser que al no ser reconocido el citotrofoblasto como propio, pudiera ser atacado por los linfocitos granulares grandes del útero lo que provocaría una reducción en la invasión del citotrofoblasto.^{7,16}

Se ha propuesto el daño endotelial generalizado como el mecanismo patogénico más importante en la preeclampsia.¹

Las células del endotelio vascular secretan sustancias con acciones locales: La PGI₂ (prostaciclina) y el óxido nítrico (Factor Relajante del Endotelio Vascular) son vasodilatadores e inhibidores de la adhesión plaquetaria; la Endotelina I y la Angiotensina II que son vasoconstrictores.^{1,11}

Wang y cols., comunicaron que los embarazos normotensos se caracterizaban por aumentos progresivos en la PGI₂ en relación con el tromboxano A₂, y aumentos progresivos en la relación de la vitamina E con los peróxidos lipídicos. En la preeclampsia ambas relaciones se invierten, por lo tanto el tromboxano A₂ elevado produce mayor vasoespasmo y agregación plaquetaria con la formación consecuente de microtrombos lo que afecta invariablemente la perfusión tisular. Además la disminución de Vitamina E, uno de los más importantes antioxidantes, conduce a un incremento en los radicales libres de oxígeno, los que provocan daño endotelial generalizado a través de la peroxidación de lípidos.^{1,11,12}

De Groot, Friedman y Roberts de manera independiente postulan que la hipoxia placentaria da como resultado la producción de factores desconocidos en la circulación materna lo que lleva a la activación del endotelio vascular con cambios difusos en la función endotelial dando el síndrome clínico de la preeclampsia.¹²

Taylor, postula que la activación de la célula endotelial se define como una alteración en el estado de diferenciación celular inducida como resultado de una estimulación por citocinas. Se han encontrado un incremento del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) en la preeclampsia.^{7,12}

Conrad argumenta que el TNF alfa y la IL-1 producidas en la placenta por la hipoxia incrementan la generación de trombina, Factor Activador de Plaquetas,

la permeabilidad endotelial y la adhesividad intercelular lo que conduce a la lesión endotelial.^{7,17}

MECANISMOS INTRACELULARES DE TRANSDUCCION DE SEÑALES ACOPLADOS A FACTORES DE CRECIMIENTO

Desde una perspectiva molecular existe una intrincada red de genes y otras biomoléculas que participan en la regulación de los mecanismos de diferenciación y proliferación celular. Entre estos destaca la de los genes *c-ras* y *c-fos*. El gen *c-ras* esta presente como parte del genoma normal del ser humano. Las alteraciones en este gen causan en la célula la pérdida del control del crecimiento normal.¹⁹ Este protooncogen codifica una pequeña proteína G monómera que reside en la superficie interna de la membrana plasmática y que posee actividad de GTPasa intrínseca; es decir hidroliza GTP a GDP y se denomina Ras.^{18,19} La proteína Ras se descubrió originalmente como un gen presente en ciertos virus tumorales que es capaz de malignizar células normales, y desempeña un papel clave en varias vías internas para transmisión de señales como aquellas acopladas a la actividad de proteína tirosina cinasa (PTK) que media respuestas como la proliferación y diferenciación celulares.^{18,19} La proteína cinasa C (PKC) y la proteína Ras convergen en la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que después de su activación inducen a través de una cascada enzimática de fosforilación a nivel de sustrato la activación de factores de transcripción como Fos y Jun.^{18,19}

La proteína Fos es junto con la proteína Jun un componente del Factor de Transcripción (proteína que regula la expresión de los genes) heterodimérico denominado AP-1.¹³

El gen *c-fos* es el homólogo celular del oncogen *V-fos* acarreado por el virus del sarcoma murino. La expresión de *c-fos* activa genes cuyos promotores poseen un sitio de unión AP-1. El producto de *c-fos* (la proteína Fos) es una fosfoproteína nuclear que no puede formar homodímeros pero sí puede formar heterodímeros al unirse a Jun. La capacidad de formar dímeros es una parte crucial de la interacción de estos factores con el DNA. El factor AP-1 reconoce una secuencia corta en el DNA (TGACTCA).¹³

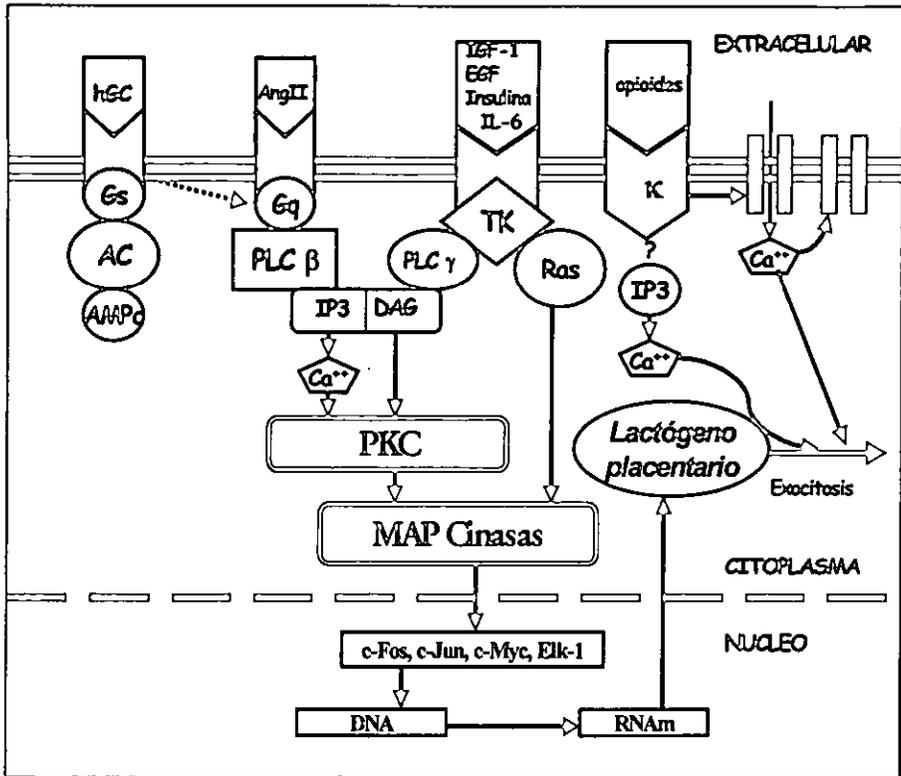


Fig. 1. Hipótesis sobre los mecanismos de transducción intracelular de señales implicados en la síntesis y secreción de Lactógeno Placentario. Se indican las moléculas que participan en los mecanismos de diferenciación celular.

GENERALIDADES SOBRE LOS PROTO-ONCOGENES.

Los proto-oncogenes son genes celulares normales que al presentar mutaciones pueden transformarse en oncogenes activos. Los proto-oncogenes pueden clasificarse funcionalmente dentro de tres grandes categorías: a) factores de crecimiento y sus receptores, b) mediadores de vías de transducción de señales intracelulares y c) factores de transcripción²⁰. La interacción y cooperación entre los productos de las diferentes clases de proto-oncogenes juegan un papel primordial durante el crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo. Algunos proto-oncogenes que codifican para proteínas nucleares son: myc, myb, fos, jun, erbA, ski, rel, y E1A.

Los proto-oncogenes nucleares presentan las siguientes características en común: a) una rápida inducción transitoria en respuesta a numerosos agentes capaces de promover crecimiento, desarrollo y diferenciación; b) una vida media corta tanto de su RNA mensajero como de su proteína; c) las oncoproteínas nucleares son invariablemente modificadas post-traduccionalmente, por lo general son fosforiladas en residuos de serina ; y d) un número de oncoproteínas nucleares se unen al DNA de manera específica²¹.

El proto-oncogen *c-fos*.

El proto-oncogen *c-fos* fue descrito originalmente como el homólogo celular del oncogen encontrado en dos retrovirus murinos, FBR y FBJ, que participaban en la generación de osteosarcomas inducidos por radiaciones²². El gen de *c-fos* se expresa en un nivel basal, en la mayoría de las células. Sin embargo, su expresión es inducida temporalmente hasta altos niveles por una gran variedad de estímulos extracelulares.

El proto-oncogen *c-fos* es miembro de un conjunto de genes conocidos como genes de expresión temprana. Este conjunto se define por el hecho de que su expresión es inducida rápidamente por una variedad de estímulos extracelulares, aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto que los genes de expresión temprana llevan a cabo su acción al acoplar el estímulo de corto plazo a cambios a largo plazo en el fenotipo celular, como pueden ser el crecimiento y la diferenciación celular. Esta hipótesis fue reforzada por el descubrimiento de que la proteína Fos actuaba como un regulador de la transcripción.

Estructura y funciones de la proteína Fos

El producto de *c-fos* es una proteína (Fos) que está constituida por 380 residuos de aminoácidos. Esta proteína sufre extensas modificaciones postraduccionales debido a la fosfoesterificación de los residuos de serina en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Fos contiene un dominio en el que se repite periódicamente un residuo de leucina cada siete aminoácidos. A este dominio se le denomina "zipper" de leucina. Cuando este dominio se estructura en una α -hélice, los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Adyacente a éste, se encuentra un dominio rico en aminoácidos básicos.

Los residuos de leucina de una α -hélice interactúan con los residuos de leucina de otra α -hélice de una proteína diferente, con lo cual se facilita la dimerización a través de interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, el dominio de "zipper" de leucina facilita la formación de heterodímeros. Esta secuencia está presente en diversos factores de transcripción, como las oncoproteínas Fos, Myc y Jun, los factores de transcripción de la levadura GCN4 Y AP-1 y la proteína que une al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB)²³⁻²⁶.

La región rica en aminoácidos básicos, adyacente al "zipper" de leucina, media la unión del heterodímero a una región específica del DNA, ya que inserciones o deleciones en esta región disminuyen o anulan dicha unión pero no la formación del dímero. El heterodímero se une a regiones promotoras que contienen el elemento de respuesta a TPA (12-*o*-tetradecanoil-*forbol*-13 acetato) llamado TRE (TPA response element) o sitio de unión a AP-1.

No obstante que el "zipper" de leucina es el dominio de dimerización principal y que la región básica es el dominio principal de unión al DNA, se debe de considerar que la proteína completa interactúa y que aminoácidos fuera de estos dominios también contribuyen a la dimerización y unión al DNA.

En los primeros estudios realizados sobre Fos se determinó que esta proteína podría formar parte de un complejo proteínico nuclear que se puede unir al DNA en presencia de extractos nucleares. En seguida se buscó la secuencia de nucleótidos que es reconocida por el complejo de Fos. Por medio de diferentes metodologías como la mutágenesis, estudios de competencia y ensayos de afinidad al DNA, finalmente se identificó el sitio de unión como la secuencia consenso del factor de transcripción AP-1.

Estos estudios establecieron una conexión entre Fos, Jun y los sitios AP-1, pero aún no era claro si Fos se unía directamente al sitio AP-1, o indirectamente por medio de la asociación con la proteína p39 u otra proteína. Por medio de comparaciones estructurales e inmunológicas se identificó a p39 como el producto proteínico del proto-oncogen *c-jun*²⁷. Más aún, se demostró que en células de mamífero transfectadas, la cooperación entre estas dos oncoproteínas nucleares se requiere para la completa transcripción de los genes que tienen en su región promotora el elemento de respuesta a TRE.

Fos modula directamente la función de Jun por medio de la formación del heterodímero Fos-Jun²⁷. La proteína de Jun por sí sola puede formar un homodímero que se une a TRE, pero es un transactivador ineficiente. Por otro lado, Fos forma homodímeros, pero éstos son inestables, no se une como monómero al DNA ni activan la transcripción; sin embargo, en un heterodímero Fos-Jun, Fos no solamente contribuye a la unión específica al DNA, sino que también coopera en la transactivación.

Las hormonas sexuales y en particular los estrógenos, participan en la formación de varios circuitos neuronales durante el desarrollo fetal y/o neonatal y en los adultos controlan diferentes funciones cerebrales al actuar sobre su receptor intracelular²⁸. La acción de los estrógenos sobre su receptor nuclear provoca un cambio conformacional en el receptor que aumenta la afinidad de unión al DNA y así el complejo receptor-hormona (H-R), interactúa con secuencias específicas, en este caso los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), modificando así la transcripción de varios genes²⁹.

PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DEL TROFOBlasto

El equilibrio entre la proliferación y la diferenciación es lo que finalmente determina la estructura y la función de la placenta en desarrollo.¹²

El trofoblasto posee capacidad invasora, elevado grado de proliferación y privilegio inmune, todo esto debe estar estrictamente regulado teniendo en cuenta el trasfondo genético molecular de la placenta. Es importante el papel que desempeñan en esta regulación los protooncogenes, los factores de crecimiento y sus receptores. Esta regulación podría estar sometida al mecanismo de impresión genómica.

El citotrofoblasto posee receptores capaces de reconocer las actividades promotoras del crecimiento que se hallan en la sangre materna.

En la placenta se expresan los protooncogenes c-fos y c-ras entre otros muchos. El gen c-fos participa de manera general en los efectos a corto plazo provocados por estímulos externos como los factores de crecimiento, el estrés y en las alteraciones a largo plazo en la expresión de genes. Así mismo regula la proliferación y diferenciación celulares. El gen c-ras también participa como regulador de la proliferación y diferenciación celulares.¹²

Aún no se conocen bien los mecanismos que regulan el crecimiento placentario especialmente en lo que respecta a los productos de los protooncogenes, así como a las vías estimuladas por los factores/receptores de crecimiento. Parece existir una trama intrincada de funciones interactivas a nivel celular de manera que la disminución en la concentración del factor de crecimiento en su sitio de acción o la regulación a la baja en la expresión de sus receptores afectan la proliferación celular.¹²

Los genes y protooncogenes del factor de crecimiento están generalmente unidos a un fenotipo proliferativo durante el desarrollo, la expresión de tales genes suele regularse a la baja a medida que se diferencian los citotrofoblastos.¹²

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina 1 y 2 se expresan en la placenta. IGF1 en el sincitiotrofoblasto e IGFII en el citotrofoblasto. La función de dichos factores es el control sobre la proliferación del trofoblasto.

Aun continúan sin conocerse los mecanismos intracelulares que ocurren en la diferenciación y proliferación trofoblástica normal y si existen diferencias en el caso del trofoblasto preecláptico, más aún considerando que entre las condiciones que incrementa el riesgo de aparición de preeclampsia están presentes entidades con grandes superficies de extensión placentaria (vgr. diabetes, hidrops fetal, embarazo múltiple y enfermedad trofoblástica gestacional).

En la preeclampsia se han identificado alteraciones en la citodiferenciación y proliferación del trofoblasto que pueden afectar su capacidad de invasión. Es el objetivo de nuestro estudio demostrar la presencia de diferentes patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular en la placenta preecláptica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existen diferencias en la expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en la placenta preecláptica en comparación a las placentas normales?

JUSTIFICACIÓN

Si bien es cierto que en los países en desarrollo la hemorragia y la infección son las primeras causas de muerte materna que deberían ser prevenibles por medio de procedimientos relativamente simples sin la ayuda de tecnología sofisticada, no sucede lo mismo con la mortalidad materna asociada a trastornos hipertensivos del embarazo como la Preeclampsia. Esta representa la primera causa de mortalidad materna en 6 de 23 países analizados por la OPS y cuya causa continúa siendo desconocida habiéndose postulado diferentes teorías acerca de la fisiopatología de esta enfermedad, lo que hace más difícil buscar rutas para su prevención. De ahí la importancia de integrar conocimientos y concentrar todos los recursos en la búsqueda de diferentes factores que puedan estar involucrados en el desarrollo de la Preeclampsia para así poder encontrar marcadores que puedan ayudarnos en la identificación temprana de la enfermedad y lograr su prevención para evitar primero la mortalidad materna y la morbilidad maternofetal asociada a la preeclampsia.

En éste estudio queremos demostrar los patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular del trofoblasto en la Preeclampsia.

En la preeclampsia se han identificado alteraciones en la citodiferenciación y proliferación del trofoblasto que pueden afectar su capacidad de invasión. Es el objetivo de nuestro estudio demostrar la presencia de diferentes patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular en la placenta preeclámpica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existen diferencias en la expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en la placenta preeclámpica en comparación a las placentas normales?

JUSTIFICACIÓN

Si bien es cierto que en los países en desarrollo la hemorragia y la infección son las primeras causas de muerte materna que deberían ser prevenibles por medio de procedimientos relativamente simples sin la ayuda de tecnología sofisticada, no sucede lo mismo con la mortalidad materna asociada a trastornos hipertensivos del embarazo como la Preeclampsia. Esta representa la primera causa de mortalidad materna en 6 de 23 países analizados por la OPS y cuya causa continúa siendo desconocida habiéndose postulado diferentes teorías acerca de la fisiopatología de esta enfermedad, lo que hace más difícil buscar rutas para su prevención. De ahí la importancia de integrar conocimientos y concentrar todos los recursos en la búsqueda de diferentes factores que puedan estar involucrados en el desarrollo de la Preeclampsia para así poder encontrar marcadores que puedan ayudarnos en la identificación temprana de la enfermedad y lograr su prevención para evitar primero la mortalidad materna y la morbilidad maternofetal asociada a la preeclampsia.

En éste estudio queremos demostrar los patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular del trofoblasto en la Preeclampsia.

En la preeclampsia se han identificado alteraciones en la citodiferenciación y proliferación del trofoblasto que pueden afectar su capacidad de invasión. Es el objetivo de nuestro estudio demostrar la presencia de diferentes patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular en la placenta preecláptica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existen diferencias en la expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en la placenta preecláptica en comparación a las placentas normales?

JUSTIFICACIÓN

Si bien es cierto que en los países en desarrollo la hemorragia y la infección son las primeras causas de muerte materna que deberían ser prevenibles por medio de procedimientos relativamente simples sin la ayuda de tecnología sofisticada, no sucede lo mismo con la mortalidad materna asociada a trastornos hipertensivos del embarazo como la Preeclampsia. Esta representa la primera causa de mortalidad materna en 6 de 23 países analizados por la OPS y cuya causa continúa siendo desconocida habiéndose postulado diferentes teorías acerca de la fisiopatología de esta enfermedad, lo que hace más difícil buscar rutas para su prevención. De ahí la importancia de integrar conocimientos y concentrar todos los recursos en la búsqueda de diferentes factores que puedan estar involucrados en el desarrollo de la Preeclampsia para así poder encontrar marcadores que puedan ayudarnos en la identificación temprana de la enfermedad y lograr su prevención para evitar primero la mortalidad materna y la morbilidad maternofetal asociada a la preeclampsia.

En éste estudio queremos demostrar los patrones de expresión de genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular del trofoblasto en la Preeclampsia.

OBJETIVO

Determinar la expresión de los genes *c-ras* y *c-fos* en las placentas preeclámpicas y en placentas normales.

HIPOTESIS

Si en la preeclampsia se han identificado alteraciones en la citodiferenciación y proliferación del trofoblasto entonces la expresión de los genes *c-ras* y *c-fos* estará modificada en las placentas preeclámpicas en comparación a las placentas normales.

MATERIALES Y METODOS.

Se trata de un estudio de investigación experimental, prospectivo, comparativo, ciego y transversal, en el que se estudiaron placentas obtenidas de mujeres embarazadas que acudieron al Departamento de Obstetricia de Hospital General "Dr. Manuel Gea González" para su atención. El grupo I (n=6) estuvo conformado por mujeres con preeclampsia severa y el grupo II (n=5) por mujeres con embarazos sanos que sirvieron como grupo control.

Se incluyeron primigestas o secundigestas con embarazo previo normal, de 15 a 25 años de edad, embarazo con producto único vivo de 35 a 41 semanas de gestación. Se excluyeron a las pacientes con antecedente de hipertensión arterial crónica, diabetes mellitus, cardiopatías y nefropatías. Así como aquellas con consumo de fármacos o preparados hormonales durante el embarazo. En todos los casos, la interrupción del embarazo se realizó por vía abdominal por indicaciones médicas u obstétricas.

Se utilizó la técnica de RT-PCR ya que es una técnica muy sensible y una metodología especializada para detectar expresión de genes, particularmente para analizar RNAs mensajeros de baja abundancia o cuando la cantidad de muestra disponible es limitada. En este tipo de análisis es necesario utilizar un control de expresión constitutiva para poder determinar que los resultados obtenidos sean confiables, en este caso se utilizó el gen de gliceraldehído fosfato deshidrogenasa ya que su expresión no se ve alterada por hormonas esteroides.

La expresión de los genes se analizó a través de un procesador de imágenes y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densidad óptica.

ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis de los datos, se presentaron en la forma de media y desviación estándar de las unidades arbitrarias de densidad óptica.

Las diferencias en la expresión de los genes entre ambos grupos se evaluaron a través de la prueba t de Student para grupos independientes.

Se consideró una diferencia como estadísticamente significativa con un valor de p menor de 0.05.

CONSIDERACIONES ETICAS.

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Artículo 17 Fracción II. Investigación con riesgo mínimo.

Extracción del RNA total.

1. El RNA total se extrajo de 5 muestras de placentas de mujeres sanas y 6 placentas de mujeres con preeclampsia. Para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

En tubos nuevos y estériles se homogenizaron con un politrón, 100 mg de tejido con 1 ml de TRIzol a 4° C.

2. Se transfirieron las muestras homogenadas a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado. Se taparon los tubos y se agitaron con vortex por 30 seg.

3. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.

ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis de los datos, se presentaron en la forma de media y desviación estándar de las unidades arbitrarias de densidad óptica.

Las diferencias en la expresión de los genes entre ambos grupos se evaluaron a través de la prueba t de Student para grupos independientes.

Se consideró una diferencia como estadísticamente significativa con un valor de p menor de 0.05.

CONSIDERACIONES ETICAS.

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Artículo 17 Fracción II. Investigación con riesgo mínimo.

Extracción del RNA total.

1. El RNA total se extrajo de 5 muestras de placentas de mujeres sanas y 6 placentas de mujeres con preeclampsia. Para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

En tubos nuevos y estériles se homogenizaron con un politrón, 100 mg de tejido con 1 ml de TRizol a 4° C.

2. Se transfirieron las muestras homogenadas a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado. Se taparon los tubos y se agitaron con vortex por 30 seg.

3. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.

4. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4° C durante toda la noche.
5. Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12,000 rpm a 4° C. El RNA se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta.
6. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80%. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4° C.
7. Se removió el sobrenadante y se colocaron los tubos en sentido inverso sobre una gasa estéril y se secó la pastilla en un homo con vacío a temperatura ambiente sin que se seicara por completo la pastilla para evitar la insolubilidad de la misma.
8. Se disolvió la pastilla de RNA en 30 μ l de H₂O-DEPC. Se hicieron diluciones 1:250 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda : 260, 280 y 310 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de Absorbancia a 260 nm = 40 μ g de RNA /ml. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm).

Electroforesis del RNA.

1. Se preparó un gel desnaturalizante de agarosa al 1% de la siguiente manera:

	Concentración final	Cantidad necesaria para preparar 120 ml de gel
Agarosa	1 %	1.2 g
Formaldehído 37%	6 %	19 ml
MOPS 12X	1 X	10 ml
Agua estéril/DEPC	—	91 ml

La agarosa se disolvió en el agua tratada con DEPC. Posteriormente se agregaron el formaldehído y el MOPS, se mezcló la solución y se vertió en el molde de la cámara de electroforésis.

2. Para el corrimiento electroforético se prepararon las muestras de la siguiente manera:

	Concentración final.
RNA	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6.5 %
MOPS	1 X
Amortiguador Loading para RNA	1 X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

El RNA se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS y se calentó a 75° C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos. Se le agregó el amortiguador Loading y el bromuro de etidio.

3. Se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 90 volts por 120 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA-TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)

La técnica de la Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) ha sido utilizada para estudiar la expresión de genes amplificándolos a partir de sus secuencias de RNA. Esta técnica requiere de la conversión del RNA mensajero a DNA complementario (cDNA) por medio de una Transcripción Reversa (RT) y amplificación del DNA complementario por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR). El RT-PCR es ahora una metodología especializada para detectar genes cuya expresión es muy baja. Este método es particularmente útil para analizar RNAs mensajeros de baja abundancia o cuando la cantidad de muestra disponible es limitada.

La técnica de PCR es un método enzimático para amplificar fragmentos específicos de DNA *in vitro*. La PCR se basa en el uso de dos oligonucleótidos como iniciadores para la síntesis catalizada por la DNA polimerasa, desde cadenas opuestas, a través de una región determinada por los sitios de estos dos oligonucleótidos. Por repetición de ciclos de desnaturalización de las cadenas de DNA, unión de oligonucleótidos iniciadores y síntesis del DNA, se puede alcanzar un incremento exponencial de un fragmento discreto de DNA

Síntesis de oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó de acuerdo a la secuencia del cDNA para el proto-oncogen *c-fos* de rata y *c-Kras* de humano. La secuencia de los oligonucleótidos para *c-fos* fue 5'-[CCC CTG TCA ACA CAC AGG AC]-3' (sentido) y 5'-[CCG ATG CTC TGC GCT CTG C]-3' (contrasentido), que delimitan un fragmento de 250 pares de bases (+258 a +505) y para *c-Kras* la secuencia fue 5'-[TTC CTA CAG GAA GCA AGT AG]-3' (sentido) y 5'-[CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA]-3' (contrasentido), delimitando un fragmento de 120 pb y fueron sintetizados por OPERON Technologies, Inc.

Los oligonucleótidos para el gen de la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se utilizó como un control de expresión, se diseñaron de acuerdo a la secuencia del cDNA para el gen de GAPDH de humano (Tso et al. 1985). La secuencia de los oligonucleótidos fue 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' (sentido) y 5'-[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' (contrasentido) que delimitan un fragmento de 480 pares de bases (+517 a +969).

Retrotranscripción (RT)

Se realizó la retrotranscripción del RNA total. Para esto se preparó la siguiente mezcla para cada una de las muestras:

Concentración Final

RNA Total	2 µg (en un volumen máximo de 2.5 µl)
Buffer RT (5X)	50 mM Tris-HCl pH=8.3 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RT M-MLV (200 U/µl)	400 unidades
Oligo d-T	0.05 µg

El RNA se calentó a 75° C por 5 minutos y se puso en hielo por otros 5 minutos. Se le agregó la mezcla y se incubó a 37°C por una hora. El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del RNA.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El proto-oncogen *c-fos* y el gen de GAPDH se amplificaron por medio de la técnica de PCR. Para lo cual se preparó la siguiente mezcla para cada una de las muestras:

	Concentración Final
Buffer PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH=8.4
	50 mM KCl
MgCl ₂ (50 mM)	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo I	0.5 mM
Oligo II	0.5 mM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades
Agua	cbp 40 µl

A 10 µl de reacción de RT de cada muestra se le agregó la mezcla de PCR. La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto de hibridación de los oligos iniciadores a 50°C, 1 minuto de extensión a 72° C y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72° C. Para el caso de *c-Kras* se procedió de la misma forma, cambiando únicamente la temperatura de hibridación de los oligos iniciadores que fue de 60°C

Electroforesis de los productos de RT-PCR

Una vez que se realizó el RT-PCR, se realizó la separación por electroforesis de los de los productos obtenidos. Se corrieron 30 µl de los productos de RT-PCR con Amortiguador de carga 6X para DNA en un gel de agarosa al 2% preparado con TBE 0.5 X .

Se prepararon 180 ml de gel, se pesó la agarosa y se le agregó el TBE 0.5 X y 4 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml (0.2 µg/ml concentración final). Las muestras se separaron con un voltaje de 90 voltios por 1.5 h en el amortiguador TBE 0.5 X.

RESULTADOS

Se compararon los patrones de expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en tejido placentario obtenido de mujeres con embarazo normal y de mujeres con embarazo complicado con preeclampsia severa. El análisis fué realizado mediante la técnica de RT-PCR y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densidad óptica.

La expresión del protooncogen *c-ras* no demostró ser diferente entre las placentas normales y las placentas preeclámplicas (Fig. 3).

En el caso de la expresión de *c-fos*, se demostró una disminución ligera en el caso del tejido placentario obtenido en casos de preeclampsia severa en comparación con las placentas normales (Fig. 4).

DISCUSION.

La preeclampsia es un trastorno propio del embarazo con origen en la placenta, como se ha demostrado por la existencia de esta enfermedad aún en ausencia de feto como en el caso de la enfermedad trofoblástica gestacional. Además, ocurre más frecuentemente en presencia de grandes superficies placentarias como en los casos de diabetes mellitus, hidropesía fetal y embarazo múltiple. Se ha señalado que la preeclampsia es un trastorno primario de la circulación uteroplacentaria debida a una alteración en los mecanismos de placentación, lo que pudiera corresponder a una modificación en la diferenciación del trofoblasto. Los procesos que determinan la proliferación y la diferenciación celular requieren de la participación de genes celulares denominados protooncogenes, tales como los genes *c-fos* y *c-ras*.

Diferentes investigadores han estudiado la expresión de diversas moléculas de transducción intracelular de señales, sin haber encontrado diferencias en la expresión de las diferentes proteínas G³² y *c-fos*³³. Se ha identificado un mayor nivel de expresión de *c-jun* en las placentas de los embarazos complicados con preeclampsia³³.

RESULTADOS

Se compararon los patrones de expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en tejido placentario obtenido de mujeres con embarazo normal y de mujeres con embarazo complicado con preeclampsia severa. El análisis fué realizado mediante la técnica de RT-PCR y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densidad óptica.

La expresión del protooncogen *c-ras* no demostró ser diferente entre las placentas normales y las placentas preeclámpticas (Fig. 3).

En el caso de la expresión de *c-fos*, se demostró una disminución ligera en el caso del tejido placentario obtenido en casos de preeclampsia severa en comparación con las placentas normales (Fig. 4).

DISCUSION.

La preeclampsia es un trastorno propio del embarazo con origen en la placenta, como se ha demostrado por la existencia de esta enfermedad aún en ausencia de feto como en el caso de la enfermedad trofoblástica gestacional. Además, ocurre más frecuentemente en presencia de grandes superficies placentarias como en los casos de diabetes mellitus, hidropesía fetal y embarazo múltiple. Se ha señalado que la preeclampsia es un trastorno primario de la circulación uteroplacentaria debida a una alteración en los mecanismos de placentación, lo que pudiera corresponder a una modificación en la diferenciación del trofoblasto. Los procesos que determinan la proliferación y la diferenciación celular requieren de la participación de genes celulares denominados protooncogenes, tales como los genes *c-fos* y *c-ras*.

Diferentes investigadores han estudiado la expresión de diversas moléculas de transducción intracelular de señales, sin haber encontrado diferencias en la expresión de las diferentes proteínas G³² y *c-fos*³³. Se ha identificado un mayor nivel de expresión de *c-jun* en las placentas de los embarazos complicados con preeclampsia³³.

RESULTADOS

Se compararon los patrones de expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en tejido placentario obtenido de mujeres con embarazo normal y de mujeres con embarazo complicado con preeclampsia severa. El análisis fué realizado mediante la técnica de RT-PCR y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densidad óptica.

La expresión del protooncogen *c-ras* no demostró ser diferente entre las placentas normales y las placentas preeclámpticas (Fig. 3).

En el caso de la expresión de *c-fos*, se demostró una disminución ligera en el caso del tejido placentario obtenido en casos de preeclampsia severa en comparación con las placentas normales (Fig. 4).

DISCUSION.

La preeclampsia es un trastorno propio del embarazo con origen en la placenta, como se ha demostrado por la existencia de esta enfermedad aún en ausencia de feto como en el caso de la enfermedad trofoblástica gestacional. Además, ocurre más frecuentemente en presencia de grandes superficies placentarias como en los casos de diabetes mellitus, hidropesía fetal y embarazo múltiple. Se ha señalado que la preeclampsia es un trastorno primario de la circulación uteroplacentaria debida a una alteración en los mecanismos de placentación, lo que pudiera corresponder a una modificación en la diferenciación del trofoblasto. Los procesos que determinan la proliferación y la diferenciación celular requieren de la participación de genes celulares denominados protooncogenes, tales como los genes *c-fos* y *c-ras*.

Diferentes investigadores han estudiado la expresión de diversas moléculas de transducción intracelular de señales, sin haber encontrado diferencias en la expresión de las diferentes proteínas G^{32} y *c-fos*³³. Se ha identificado un mayor nivel de expresión de *c-jun* en las placentas de los embarazos complicados con preeclampsia³³.

Fué el objetivo de este trabajo identificar las diferencias en los patrones de expresión de los protooncogenes *c-ras* y *c-fos* en la placenta preecláptica y en la placenta normal en un intento de vislumbrar los mecanismos que participan en las alteraciones en la diferenciación celular placentaria.

En este estudio se demostró una disminución ligera en la expresión del gen *c-fos* en la placenta preecláptica en comparación con la placenta normal.

El significado biológico de este hallazgo debe interpretarse con cautela, sin embargo pudiera tratarse de una evidencia que apunta hacia los procesos que intervienen en las alteraciones celulares del trofoblasto preecláptico.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
c-Kras 120 pb

gapdh 480 pb

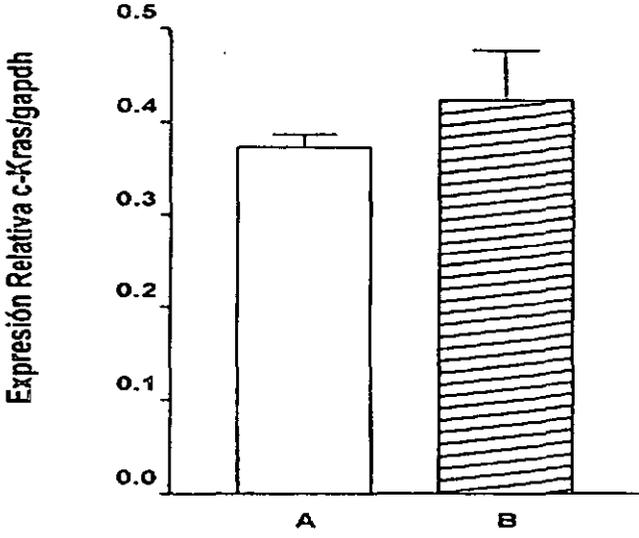


Fig. 3 Expresión del protooncogen *c-ras*. Se muestra la expresión de *c-ras* en placentas de mujeres con preeclampsia (carriles 2 al 6) y normales (carriles 7 al 11) . Los datos son obtenidos de la relación *c-ras*/GAPDH. Se observó que al comparar ambos grupos no se registraron diferencias en la expresión de *c-ras* en el tejido placentario.

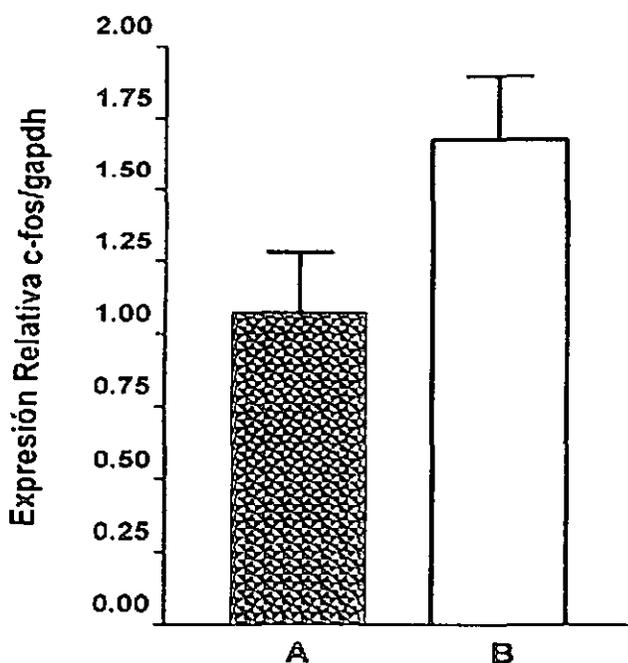
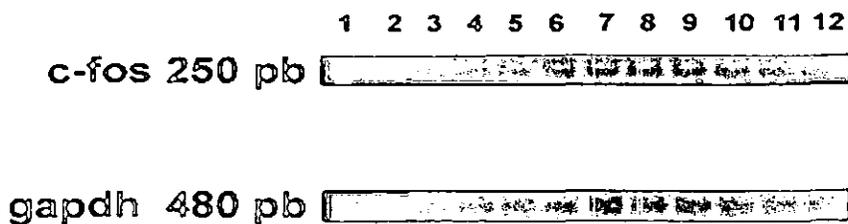


Fig. 4. Expresión del protooncogen c-fos . Se muestra la expresión de c-fos en placentas de mujeres con preeclampsia (carriles 2 al 6) y normales (carriles 7 al 11) . Los datos son obtenidos de la relación c-fos/GAPDH. Se observó que en las mujeres que presentaron preeclampsia existe una disminución leve en la expresión de c-fos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Villanueva LA. Bases Fisiopatológicas de la Preeclampsia: Una Hipótesis. Ginecología y Obstetricia de México. Junio 1997;76:246-252.
2. Duley Lelia. Maternal Mortality associated with Hypertensive Disorders of Pregnancy in Africa, Asia, Latin America and the Caribbean. Br J of Obstet and Gynecol. Julio 1992;99:547-553.
3. Instituto Nacional de Estadística geografía e informática (INEGI) Estadísticas de Mortalidad relacionada con la Salud Reproductiva, México 1997. Salud Pública de México, 41(2):marzo-abril de 1999.
4. Arias Fernando. Preeclampsia, Eclampsia, Guía Práctica para el Embarazo de Alto Riesgo. 1995,186-213.
5. National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1990;163:1689-1712. (The "Consensus Report" issued by a working group of specialists in obstetrics and gynecology and internal medicine suggesting guidelines for diagnosing and managing hypertension in pregnancy).
6. Davey, Dennis A. The Classification and Definition of the Hypertensive Disorders of Pregnancy. Am J Obstet and Gynecol 1998;158:892-898.
7. Dekker GA, MD. Etiology and Pathogenesis of Preeclampsia. Current Concepts. Am. J. Obstet Gynecol 1998;179:1359-1375.
8. Van BE. Pathogenesis of Preeclampsia: a comprehensive model. Obstet. and Gynecol. Survey, 1998;53(4):233-239.
9. Dekker AG. Immune Maladaptation in the Etiology of Preeclampsia: a Review of corroborative epidemiologic studies. Obstet. and Gynecol. Survey, 1998;53,n°6:377-382.
10. Zhou Yan. Preeclampsia is Associated with Failure of Human Cytotrophoblasts to Mimic a Vascular Adhesion Phenotype. J Clin Invest 1997;99:2152-2164.
11. Dekker CA. Patogenia de la Preeclampsia: Una Hipótesis. Clinicas Obst Gynecol 1992;35:317-337.
12. Cunningham, Mac Donald. Trastornos Hipertensivos del Embarazo. Capítulo 31. Williams y Obstetricia 20 edición. octubre 1998:647-692.

ESTI
TEAN
EN
DEBE
EN
DEBE
EN
DEBE
EN
DEBE

13. Ohlsson R, Glaser A, Holmgren L, Franklin G. *Biología Molecular del Desarrollo Placentario*. En: Redman CWG, Sargent IL, Starkey PM. *La Placenta Humana. Guía para perinatólogos*. Masson, España, 1995.
14. Bennet P, Moore G. *Biología Molecular para Perinatólogos*. capítulo 5. Editorial Masson. España. 1995.
15. Graves JA. Genomic Imprinting, Development and Disease. Is Preeclampsia caused by a maternal imprinted gene? *Reprod Fert Dev* 1998;10(1):23-29.
16. Taylor RN. Review: Immunobiology of Preeclampsia, *Am.J. of Reproductive Immunol* 1997;37:79-86.
17. Conrad KP. Placental Cytokinas and The Pathogenesis of Preeclampsia. *Am J of Reproductive Immunology*. 1997;37:240-249.
18. Karp Gerald. *Biología Molecular y Celular. Señales Celulares*. Mc Graw-Hill Interamericana editores, 1998; capítulo 15: 649-655.
19. Villanueva LA. Inhibición Farmacológica de Señales Intracelulares Involucradas en la Proliferación Celular. *Arch Inst Cardiología Mex*. 1999;69:265-271.
20. Bishop, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-310.
21. Ransone, L. J., and Verma, I. M. Nuclear proto-oncogenes Fos and Jun. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990;6: 539-557.
22. Curran, T., Van Beveren, C., Ling, N., Verma, I. M. . Viral and celular fos proteins are complexed with a 39,000 cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* 1985; 5: 167-172.
23. Hope, I. A., and Struhl, K. GCN4, a eucaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J.* 1987; 6: 2781-2784.
24. Kouzarides, T., and Ziff, E. The role of leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 1988; 336: 646-651.
25. Landschultz, W.H.,. The leucine zipper protein: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* 1988; 240: 1759-1764.
26. Gonzales, G. A., Yamamoto, K.K., Fisher, W. H., Karr, D., Menzel, P., et. al. . A cDNA for cAMP-regulated nuclear factor CREB predicts multiple phosphorylation sites. *Nature* 1989; 337:749-752.

27. Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C., Verma, I. M. . Transcriptional autorregulation of the proto-oncogen fos. *Nature* 1988; 334: 314-319.
28. Blaustein, J. D., Lehman, M. N., Turcotte, J. C., and Greene, G.. Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pigs hypothalamus. *Endocrinology* 1992;131: 281-290.
29. Landers, J. P., and Spelsberg, T. C.. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes and the cascade model of steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gen. Exp.* 1992; 2 (1): 19-63.
30. Weisz, A., and Rosales, R.. Identification of an estrogen response element upstream of the human *c-fos* gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 1990;18: 5097-5106.
31. Hyder, S.M., Stancel, G.M. y Loose-Mitchell, D.S.. Presence of an estradiol response region in the mouse *c-fos* oncogene. *Steroid* 1991;56, 498.
32. Petit A, Geoffroy P, Belisle S. Expression of g proteins in human placentas from pregnancies complicated by gestational hypertension. *Life Sci* 1997; 60: 953-60.
33. Faxen M, Nasiell J, Lunell NO, Blanck A. Differences in mRNA expression of endothelin-1, *c-fos* and *c-jun* in placentas from normal pregnancies and pregnancies complicated with preeclampsia and/or intrauterine growth retardation. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 44: 93-6.