

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Instituto Nacional de Perinatología
Isidro Espinosa de los Reyes

**Determinación de la Frecuencia de los
Polimorfismos IL-1 β (+3953), IL-1ra (IL-1RN*2) y
TNF α (-308) en Pacientes con Aborto Recurrente**

Tesis

**Que Para Obtener el Título de
Especialista en Ginecología y Obstetricia
PRESENTA**

DRA. MARTA GARCÍA SANDOVAL

**DR. VALENTIN IBARRA CHAVARRÍA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DIRECTOR MEDICO**

**DR. FELIPE VADILLO ORTEGA
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN**

**DR. CESAR HERNANDEZ GUERRERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

MEXICO DF, 2007



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

Dr. Enrique Alfonso Gómez Sánchez
Director de Enseñanza

Dr. Valentín Ibarra Chavarría
Director Médico
Profesor titular del curso

Dr. Felipe Vadillo Ortega
Director de Investigación

Dr. César Hernández Guerrero
Jefe Departamento Biología Celular

DEDICATORIA

Para ti mamá.

INDICE DE CONTENIDOS	3
INDICE DE CUADROS, TABLAS Y FIGURAS	4
DEDICATORIA	5
RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	21
DISEÑO DEL ESTUDIO	22
METODOLOGÍA.	23
ANÁLISIS	28
ASPECTOS ÉTICOS	28
ORGANIZACIÓN	29
RESULTADOS	30
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	37
ANEXOS	38
BIBLIOGRAFIA	41

RESUMEN

La pérdida gestacional recurrente (PGR) ocurre en cerca del 5% de las parejas. Gran variedad de factores pueden explicar su origen, estos incluyen elementos genéticos, endocrinos, anatómicos, inmunológicos, microbiológicos, iatrogénicos y trombofílicos que deben ser descartados uno a uno, sin embargo la causa es identificada en sólo 50% de los casos. El propósito de este estudio es determinar la frecuencia de los polimorfismos IL-1 β (+3953), TNF α (-308) y del intrón 2 del IL-1RA en pacientes con historia de aborto recurrente de factor no identificado atendidas en la Clínica de Riesgo Pregestacional del INPer IER, mediante un estudio observacional comparativo en el que se incluyeron 38 pacientes que reunieron las características del grupo de casos y 31 pacientes control . Se determinó la frecuencia de los polimorfismos IL-1 β (+3953), TNF α (-308) y del intrón 2 del IL-1RA mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). La proporción de los alelos 1 y 2 del TNF- α y del gene de la IL-1 β no mostró diferencias significativas entre los dos grupos. El alelo *2 de IL-1RA se encontró en menor proporción en el grupo de mujeres con aborto recurrente con una diferencia estadísticamente significativa. Al calcular OR, esto hace ver que la presencia del alelo esté subrepresentada en éste grupo de mujeres con OR de 0.40 IC 95% (0.171-0.959) y una p de 0.02.

Recurrent pregnancy loss affects approximately 5% of couples. Great variety of factors might explain its origin, these are genetic, endocrine, anatomic, immunologic, microbiologic and thrombophilic, and should be studied one by one, however the cause of miscarriage is only identified in 50% of cases. Purpose of the study is to determine the frequency of polymorphisms in patients with history of recurrent miscarriage without factor identified, seen in the pregestational risk clinic at INPer IER, through an observational comparative study in which we included 38 patients as cases, and 31 controls. We determined frequency of polymorphisms IL-1 β (+3953), TNF α (-308) and intrón 2 of IL-1RA by polymerase chain reaction (PCR). Proportion of alleles 1 and 2 of TNF α , and IL-1 β gene showed no significant differences between both groups. IL-1RA allele 2 was found in less proportion in the recurrent miscarriage group, this difference was statistical significant. While calculating OR, allele 2 is sub represented in this group of women with OR de 0.40 IC 95% (0.171-0.959) and p 0.02.

1 MARCO TEÓRICO

PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

La pérdida gestacional recurrente (PGR) ocurre en cerca del 5% de las parejas en el intento de establecer una familia y representa una condición frustrante para la pareja, además de un reto para el clínico debido a la gran variedad de factores que pueden explicar su origen y que incluyen elementos genéticos, endocrinos, anatómicos, inmunológicos, microbiológicos, iatrogénicos y trombofílicos que deben ser descartados uno a uno.^{i, ii, iii} La definición tradicional de pérdida gestacional recurrente considera 3 o más abortos consecutivos, aunque dicho concepto se ha puesto en duda y muchos especialistas considera que la definición debe ser a partir de 2 pérdidas del embarazo a cualquier edad gestacional. El término aborto recurrente está reemplazando al término tradicional debido a que es más específico y considera la presencia de 3 o más abortos consecutivos. Se añade el calificativo “temprano” a esta definición cuando se desea especificar que la pérdida se genera antes de la semana 10 de gestación.ⁱⁱⁱ Se acepta que el riesgo de recurrencia aumenta con la edad materna y con el número de pérdidas sucesivas.^{iii, iv}

Algunos autores consideran que existen tres diferentes tipos de pérdidas de acuerdo a las semanas de gestación: preclínica, cuando la pérdida ocurre antes de 6 semanas de gestación, embrionaria de 6 a 10 semanas de gestación y fetal en mayores de 10 pero menores de 20 semanas de gestación.^v Se estima que 30 al 50% de los embarazos se pierden antes de la semana 6 de gestación, y de ellos, el 70% se debe a errores citogenéticos numéricos. La pérdida del embarazo entre la semanas 6 y 10, ocurre en 15% de los embarazos clínicos, de los cuales, la mitad se debe también a errores citogenéticos numéricos. Después de la semana 10, la pérdida de la gestación es menos frecuente, y afecta entre el 2 y 3 % de todos los embarazos, de los cuales, solo el 5 a 6% se deben a errores citogenéticos numéricos.^{vi}

ORIGEN DE LA PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

La literatura médica actual sugiere que las causas de las pérdidas son identificadas en únicamente 50% de las pacientes.^{ii,iii,vii} Entre las causas identificadas se encuentran las siguientes:

Alteraciones Estructurales

Dentro de esta categoría se incluyen las anomalías uterinas, tanto congénitas como adquiridas, de las primeras, el útero septado es la más común, representa

55% de todas las anomalías congénitas y la tasa de aborto espontáneo es alta en estas pacientes. Se ha reportado una incidencia de aborto temprano (<13 semanas) de 25.5% y de 6.2% en el tardío, el mecanismo no es completamente claro, sin embargo es conocida la naturaleza avascular del septo y dicha situación puede comprometer el crecimiento decidual y placentario. El Síndrome de Asherman, es una condición adquirida debido a la presencia de adherencias intrauterinas postraumáticas que obliteran parte o la totalidad de la cavidad uterina, que en ausencia de tratamiento se relaciona con aborto espontáneo en aproximadamente 40% de los casos. La miomatosis uterina también puede afectar la implantación e incrementar el riesgo de aborto, principalmente en el caso de miomas submucosos.^{viii}

Factor Genético

Existen pocos estudios que comparan la frecuencia de anomalías cromosómicas en las pérdidas de parejas con y sin historia de aborto recurrente, debido a la dificultad inherente del análisis de los productos de aborto. El mayor de ellos incluye 420 abortos, de los cuales, 285 parejas tenían historia de aborto recurrente. En los resultados hubo diferencia estadísticamente significativa en la distribución de categorías citogenéticas en el grupo de aborto recurrente, sin embargo, esta diferencia se perdió una vez que los datos fueron estratificados por edad materna. En mujeres jóvenes (menores de 36 años) con aborto recurrente, se encontró mayor número de abortos euploides. La alta frecuencia de abortos euploides apoya factores no citogenéticos relacionados con la historia de aborto recurrente.ⁱⁱⁱ Se estima que 3.5% de las parejas con historia de aborto recurrente tiene al menos un miembro portador de un rearrreglo cromosómico estructural. La anomalía más común es la traslocación balanceada incluyendo la de tipo recíproco y la Robertsoniana que resultan en traslocaciones desbalanceadas letales en el feto.^{ii, vi, ix}

Estados Protrombóticos

Los estados protrombóticos como el síndrome de anticuerpos antifosfolípido, son una causa reconocida de PGR reportada en 7-24% de mujeres, la gran variabilidad respecto a esta cifra puede deberse a la inclusión de pacientes con elevación transitoria de anticuerpos antifosfolípidos y a la estandarización deficiente en procesos de laboratorio, los criterios diagnósticos actuales, se enumeran más adelante.^{x, xi}

De manera reciente se han asociado otros desordenes trombofílicos a la PGR, tanto hereditarios como adquiridos, con un aumento en el riesgo 3 a 8 veces mayor, entre los cuales se encuentra la mutación del Factor V de Leiden, la

resistencia adquirida a la Proteína C activada, la mutación en el gen de la protrombina (G20210A), la deficiencia de antitrombina III, la deficiencia de proteína C y S, la hiperhomocisteinemia y las trombofilias combinadas.^{xii}

Los desórdenes trombofílicos se asocian particularmente a pérdidas en el segundo y tercer trimestre, probablemente debido a trombosis en los vasos placentarios, aunque otros mecanismos pueden encontrarse involucrados. La trombosis vascular placentaria y el infarto pueden ocurrir en cualquier lado de la interfaz materno-fetal. Las trombofilias paternas pueden aumentar el riesgo de trombosis fetal, especialmente si el feto hereda el defecto de manera homocigota.^{xii}

La mutación del Factor V de Leiden es un desorden genético caracterizado por la respuesta inadecuada a la proteína C activada, debido a una mutación puntual que genera el cambio de un aminoácido, destruyendo el sitio de unión de la proteína C activada. El estado de heterocigoto para dicha mutación se encuentra en 5 al 8% de la población y se asocia a riesgo de trombosis 4 a 8 veces mayor. El estado de homocigoto ocurre en 1 de 1,600 individuos y confiere un riesgo 80 veces superior para trombosis. La evidencia actual sugiere que la mutación del factor V de Leiden aumenta el riesgo de PGR en 2 a 5 veces.^{iii, xii}

La sustitución de un solo nucleótido (G20210A) en la región 3' del gen de la protrombina se asocia a niveles séricos elevados de protrombina y a un aumento 4 veces superior en el riesgo de trombosis venosa. Esta mutación se encuentra en 4 a 9% de mujeres con pérdida gestacional recurrente, la mayoría durante el primer trimestre.^{xii}

La hiperhomocisteinemia es ocasionada por defectos o deficiencia de las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína, o por deficiencia de las vitaminas que participan como cofactores en dichos procesos bioquímicos. La hiperhomocisteinemia es un factor independiente para tromboembolismo primario y recurrente. Se encuentra en 17 a 27% de las pacientes con PGR.^{xii}

Factor Endocrino

Los desórdenes endocrinos son también causa de PGR. La progesterona secretada por el cuerpo lúteo tiene un papel determinante en el mantenimiento del embarazo temprano, la remoción del cuerpo lúteo antes de la semana 8 provoca aborto. Las anomalías de la fase lútea ocurren en 35% de mujeres con pérdida recurrente del embarazo. El mecanismo por el cual esta deficiencia se presenta es poco claro, pero se asocia a disminución en la producción de progesterona por el

cuerpo lúteo, niveles disminuidos de FSH en la fase folicular, patrones anormales de secreción de LH, y respuesta endometrial disminuida a la progesterona secretada. De manera específica, puede existir expresión anormal de receptores tipo integrina $\alpha V\beta 3$ que son marcadores de receptividad uterina y normalmente deben de encontrarse presentes en las glándulas endometriales en el día 20 a 21 del ciclo menstrual, su carencia o defecto modifica de manera adversa las características del endometrio necesarias para la implantación.^{ii, iii}

Los métodos utilizados para confirmar la deficiencia de fase lútea son controversiales y no universalmente aceptados, es de utilidad la medición sérica de la hormona como se detalla adelante, así como la realización de biopsia endometrial. Estudios epidemiológicos apoyan la relación etiológica de la deficiencia de fase lútea con PGR, es estos, se demuestra que la administración de progesterona en supositorios vaginales, o la progesterona micronizada por vía oral, mejora la posibilidad de llevar el embarazo a término.^{iii, xiii}

Las pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) como desorden endocrino, tienen también una tasa elevada (>50%) de pérdida del embarazo en etapas tempranas. Existen diferentes factores que participan en la fisiopatogenia de la PGR en pacientes con SOP como son la obesidad, hiperinsulinemia, hiperandrogenemia, resistencia a la insulina, pobre receptividad endometrial y niveles elevados de LH^{xiii}

La hiperprolactinemia se asocia a PGR debido a la alteración que produce en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, generando foliculogénesis inadecuada, alteraciones en la maduración del oocito y/o alteraciones en la fase lútea.^{ii, iii, iv} La prolactina hipofisiaria es una hormona con más de 300 funciones biológicas, su efecto varía dependiendo de las concentraciones séricas, se conocen tres tipos de secreción de dicha hormona que son: tónica, pulsátil y circadiana. Existen diferentes causas de hiperprolactinemia entre las cuales se encuentran el uso de medicamentos, hipotiroidismo, alteraciones en la caja torácica, insuficiencia renal crónica, SOP, y tumores hipofisarios hipersecretantes. Normalmente se encuentra bajo control inhibitorio por la dopamina producida en el núcleo arcuato del hipotálamo. Estudios *in vitro* revelan que las células granulosas cultivadas, son inhibidas casi de manera total ante concentraciones de prolactina 100ng/mL pero no por concentraciones de 10 a 20 ng/mL. Estas y otras observaciones sugieren su participación en PGR, aunque algunos autores consideran que aún no existe evidencia firme de esta asociación.^{xiii}

Factor Inmunológico

En otro ámbito, se asume que diversos mecanismos inmunológicos se encuentran implicados en la implantación exitosa. El embrión por implantarse, posee antígenos paternos que pueden ser rechazados como corresponde a un aloimplante. La inducción de tolerancia inmunológica materna en respuesta al embrión es por tanto la clave en el establecimiento de una unidad feto placentaria exitosa. De ahí que la PGR pueda ser consecuencia de una falla en la implantación, secundaria a respuestas inmunológicas humorales y/o celulares que dañan y rechazan al producto.^{ii, v}

Se ha postulado que el rechazo inmunológico del feto debido al reconocimiento de antígenos paternos por el sistema inmunológico materno, puede ser causa de pérdida gestacional recurrente, debido a la activación anormal de la respuesta inmunológica, que a través de sus brazos efectores produce una red de mediadores con efectos específicos regulados por la respuesta inmunológica celular u otros inespecíficos, consistentes en la liberación de diferentes citocinas que promueven la respuesta inflamatoria.

En la actualidad se reconoce que existe diferencia en la composición de las subpoblaciones de células que se localizan en el ambiente intrauterino y que consisten en tres tipos celulares: células T, macrófagos y células Natural Killer uterinas (uNK), estas últimas difieren de las presentes en sangre periférica ya que la mayoría expresan marcadores CD 56 y CD38, pero no los clásicos marcadores de NK. En etapas iniciales del embarazo las células T disminuyen ligeramente mientras las uNK aumentan. En contraste con mujeres sin antecedente de pérdidas, en quienes la actividad periférica de CD56 y NK disminuye durante el primer trimestre del embarazo, la actividad de CD 56 y NK permanece alta en mujeres con PGR. Se observa también un incremento en el número de macrófagos en el endometrio de mujeres no embarazadas, con PGR, y en mujeres con PGR que presentan una nueva pérdida de manera subsiguiente, comparado con pacientes sin pérdida.^{xiv}

La respuesta inmunológica celular consiste no solamente en subpoblaciones de linfocitos T con marcadores específicos, sino en subpoblaciones que son capaces de secretar combinaciones definidas de citocinas y por es razón tiene efectos funcionales diferentes. De manera normal, en toda respuesta inmunológica existe un balance final de efectos que depende de la preponderancia de alguno de los brazos celulares funcionales presentes. Aunque han sido mejor identificadas en la respuesta inmunológica del ratón, existen equivalentes funcionales en el humano y se reconocen tres subpoblaciones funcionales de células CD3+, CD4+. Las células Th1 producen interferón gama (IFN γ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral beta (TNF β), estos son los mayores efectores de la respuesta inmune mediada por células. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10

que son capaces de modular la actividad de las primeras y además participan en la modulación del sistema inmunológico hacia la respuesta humoral mediada por anticuerpos. El tercer tipo celular se denomina Th0 y son precursores que pueden convertirse ya sea en células Th1 o Th2. Una familia más de citocinas son las proinflamatorias como la IL-1, TNF α , IL-6 y el factor inhibidor de leucemia (LIF) producidas por macrófagos, aunque se sabe que todas las citocinas pueden ser producidas por otras células diferentes a las inmunes, incluyendo células epiteliales y de estroma, decidua y citotrofoblasto.^{xiv}

Contamos con evidencia que señala que el embarazo sucede en un ambiente funcional en el que las células Th 2 predominan, situación que se mantiene a todo lo largo de la gestación. Por otro lado, se ha demostrado que en roedores cuando se desbalancea la respuesta hacia Th1, el embarazo se pierde, asociación que también se ha demostrado en la pérdida gestacional recurrente de origen no identificado.^{ii, xiv, xv} Chaouat y colaboradores sugieren que el paradigma Th1/Th2 debe considerarse como una simplificación exagerada de este evento, ya que la relación materno-fetal no puede considerarse solo como la tolerancia materna a un tejido extraño, sino, una serie de interacciones entre citocinas que gobiernan de manera selectiva la respuesta inmune y controlan los procesos de adhesión y vascularización implicados en la implantación exitosa.^{xvi}

En la actualidad emerge entonces el concepto de “receptividad uterina” en la cual, las citocinas pueden tener un papel central. El “útero poscoito” es sujeto de una reacción similar a la inflamatoria con la llegada de linfocitos y macrófagos, parece que para ello se requiere una señal del fluido seminal. Se detectan niveles elevados de IL-1 α , IL-1 β , TNF α e IL-6 e manera local, así como producción de factor estimulante de colonias (CSF-1), el cual es característico del embarazo. Esta fase es rápidamente seguida por el retorno a niveles basales de dichas citocinas en el día 3 y 4, excepto por el CSF-1. Las alteraciones en los eventos inflamatorios o en su cinética llevan a una falla en la implantación.^{xvi, xvii}

Los pasos iniciales en los que se ha determinado la influencia de moléculas inmunológicas, son la aposición y la adhesión, ya que se requiere de la síntesis de moléculas específicas de adhesión y su unión apropiada con ligandos específicos. Las hormonas tienen un efecto importante en la secreción apropiada de interleucinas por el embrión en este punto, además las moléculas de adhesión son reguladas de manera selectiva, por ejemplo, algunas cadenas de integrinas son reguladas a la alta y otras a la baja de manera local sin que esto se correlacione con cifras determinadas en sangre periférica. Los dos pasos siguientes son la invasión y penetración, estos implican enzimas como las metaloproteasas y los inhibidores de metaloproteasas de tejido, así como el inhibidor del plasminógeno, la familia de caderinas, el factor de necrosis tumoral y el interferón gama.^{xvii}

INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 β) Existen reportes de elevación de niveles de diversas citocinas, en mujeres con pérdida gestacional recurrente. La secreción de IL-1 β produce una cascada proinflamatoria que incluye la elaboración de factor de necrosis tumoral alfa, interferón gama, IL-2 e IL-12. La familia de moléculas de IL-1 incluye dos agonistas que son IL-1 α e IL-1 β , dos receptores, el biológicamente activo IL-1RI (molécula de 80 kDa) y el inerte IL-1RII (molécula de 60 kDa), así como un antagonista de receptor específico IL-1ra. El balance entre IL-1 e IL-1ra en tejidos locales influye en el posible desarrollo de enfermedades de tipo inflamatorio y el resultado de daño estructural. En la presencia de una cantidad elevada de IL-1 pueden desarrollarse enfermedades de tipo inflamatorio y autoinmune en diferentes órganos como articulaciones, pulmón, sistema gastrointestinal, sistema nervioso central y vasos sanguíneos.^{xviii}

La IL-1 fue en su inicio llamada pirógeno endógeno, factor estimulante de linfocitos, factor de células mononucleares y catabolina. Los genes que codifican la síntesis de IL-1ra, IL-1 α e IL-1 β se localizan juntos en el cromosoma humano 2 región q14. El DNA que codifica para las dos formas de IL-1 fue clonado en 1984 con la expresión de moléculas relacionadas de 17 kDa para IL-1 α e IL-1 β . Estas proteínas son sintetizadas como precursores de 32 kDa en el citoplasma de las células. Después de una estimulación celular apropiada, la pro IL-1 β se procesa en la membrana plasmática celular por una enzima específica llamada enzima convertidora de IL-1 β (ICE o caspasa 1), la cual contribuye en la liberación de la molécula madura de 17 kDa. La pro IL-1 α y las formas maduras de ambas citocinas son biológicamente activas mientras que la pro IL-1 β carece de actividad biológica.^{xviii}

IL-1ra es una variación estructural de IL-1 que puede unirse a los dos receptores de IL-1 con casi la misma capacidad que la propia IL-1 impidiendo la activación celular. El balance entre IL-1ra y IL-1 en los tejidos locales influye en la fisiología y fisiopatología de los efectos de IL-1. Se requiere un promedio de concentraciones cien veces superiores de IL-1ra sobre IL-1 para inhibir fisiológicamente el efecto biológico de IL-1 en células blanco. Se cree que el balance entre estas citocinas regula algunos aspectos del ciclo reproductivo. IL-1 β , IL-1ra y el mRNA de IL-1RI se encuentran presentes en el ovario con niveles pico de IL-1ra en el momento de la ovulación. Estas proteínas también se encuentran en el endometrio del útero donde IL-1ra parece ejercer una influencia de tipo inhibitoria en la implantación del embrión. También se han demostrado concentraciones altas de IL-1ra en el fluido amniótico, que posiblemente ejerzan un efecto protector contra IL-1 en la generación de parto pretérmino.^{xiv, xviii}

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α) Es una interleucina implicada en diversos procesos inflamatorios, de manera normal se encuentra presente en placenta, líquido amniótico y decidua. Es producida por neutrófilos,

linfocitos activados, macrófagos y células NK. El gen del $\text{TNF}\alpha$ se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.3. Su expresión está regulada de manera positiva por la IL-1. En el embarazo normal, el TNF alfa modula el crecimiento del trofoblasto y la invasión a las arterias espirales, además se encuentra involucrado en el crecimiento y diferenciación celular. Los estudios *in vitro* sugieren que $\text{TNF}\alpha$ puede limitar la migración trofoblástica hacia tejidos maternos e inhibir la síntesis de DNA del trofoblasto. Mas aún, la liberación excesiva de $\text{TNF}\alpha$ puede restringir la invasión endovascular citotrofoblástica hacia las arterias uterinas espirales.^{xix}

PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS

El tono de la respuesta inmunológica puede mostrar variaciones individuales, que entre otros mecanismos depende de la existencia de variaciones en los genes que coordinan su actividad. En los últimos años ha sido posible identificar la existencia de varios alelos que están presentes en una proporción pequeña de la población, pero que tienen implicaciones funcionales importantes. Dentro de ellos se incluyen genes que codifican citocinas y cuyas variantes alélicas condicionan cambios en la regulación de la expresión de estos genes y que tienen manifestación funcional a nivel de la cantidad de citocina secretada.^{xx}

Un gene es la unidad básica de herencia de los seres vivos y corresponde a la secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de ADN, que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o bien contiene secuencias reguladoras de la expresión de la información. Los genes se disponen a lo largo de los cromosomas, cada uno ocupando un lugar que se llama locus. Los genes pueden aparecer en versiones diferentes, con variaciones pequeñas en su secuencia, denominadas alelos. Los alelos pueden ser dominantes o recesivos. Cuando una sola copia de alelo hace que se manifieste el rasgo fenotípico, el alelo es dominante. Cuando se requieren dos copias del alelo (una en cada cromosoma del par), el alelo es recesivo.

Un marcador genético puede ser cualquier lugar en el genoma que, cuando varía, produce cambios apreciables en el individuo que lo porta, haciéndolo distinguible del resto de la población. Si la variación es muy poco frecuente se denomina mutación; si es común, se le denomina polimorfismo.^{xxi}

Un polimorfismo es la presencia de dos o más alelos en una población, que no puede explicarse por una mutación recurrente. Los genes mutados pueden encontrarse de forma homocigota cuando ambos alelos, procedentes cada uno del padre y de la madre, están afectados; o de forma heterocigota cuando solo uno de los dos genes está modificado. Se ha sugerido que los individuos que mantienen

esta forma de polimorfismo de citocinas tienen menor flexibilidad en su capacidad inmunorreguladora.^{xxii}

La identificación de polimorfismos en genes que codifican la producción de citocinas proinflamatorias que afectan su tasa de transcripción o la secreción, ha abierto nuevos caminos para entender la variación que existe en la respuesta a la infección durante el embarazo. Observaciones de diferentes estudios apoyan la hipótesis de que los tejidos reproductivos portadores de genes hiperrespondedores a citocinas proinflamatorias responden de manera excesiva a la infección intrauterina secretando altas cantidades de citocinas que en cierto punto pueden llevar a la terminación del embarazo.^{xxiii}

En el estudio de la pareja con pérdida gestacional de origen desconocido se ha investigado el papel que pueden tener diferentes polimorfismos de citocinas. Prigoshin y colaboradores realizaron un estudio determinando el polimorfismo de citocinas Th1 (IFN γ y TNF α), y Th2 (IL-6 e IL-10) en 41 pacientes con PGR y 54 controles sin pérdida gestacional y al menos dos hijos, encontraron asociación significativa en relación a IFN γ +874 en PGR, comparado con controles (65% vs 35.8%) ($p = 0.01$).^{xx}

Kamali y colaboradores, a su vez, estudiaron la presencia del polimorfismo bialélico de TNF α -308, TNF β +252, IFN γ +874 en genes Th1 proinflamatorios, así como IL-4 -590, IL-10 -592, -819 y -1082 en genes Th2 en mujeres Iraníes con PGR comparadas con controles sanos. Sus resultados indican asociación significativa entre la presencia del polimorfismo de IL-10 -592 y la ocurrencia de PGR (63% vs 46%, $p < 0.01$)^{xxiv} En relación a interleucinas anti-inflamatorias como la IL-6, Saijo y colaboradores estudiaron un polimorfismo en la región promotora de dicha interleucina en mujeres japonesas con PGR, encontrando que el riesgo de dicha patología es menor en pacientes portadoras del alelo G con un OR 0.46; IC 95%, 0.24-0.91)^{xxv}

Existen estudios sobre el polimorfismo del gen que codifica para la formación de IL-1 β a nivel del exón 5 (posición +3953), el cual se considera que puede encontrarse asociado a diferentes condiciones inflamatorias como la alopecia areata, la colitis ulcerativa, periodontitis y en general en la severidad de diferentes enfermedades.^{xxvi} Dicho polimorfismo también se encuentra asociado a la pérdida gestacional recurrente de origen no identificado antes de la semana 20 de gestación. Hefler y colaboradores, realizaron un estudio en población de origen caucásico exclusivamente en el que no se demostró diferencia estadísticamente significativa respecto a la concentración de IL-1 β ni el mencionado polimorfismo en pacientes con aborto recurrente y controles, sin embargo, los resultados generales en relación a la elevación de esta citocina en mujeres con PGR son aún

inconsistentes, por ello, la posible correlación entre los niveles de IL-1 β en el embarazo temprano y el resultado de la gestación permanece aún por ser determinada.^{xxvii}

Uno de los polimorfismos relacionados con procesos inflamatorios es el del antagonista de IL-1. Este polimorfismo consta de repeticiones de 86 pares de bases (pb) en tándem que dan lugar a diferentes alelos, los cuales se designan A1 hasta A5, con diferentes frecuencias de presentación en poblaciones de individuos sanos. Los tamaños de los alelos son 410, 240, 500, 325 y 595 pb y se encuentran con 4, 2, 5, 3 y 6 repeticiones, respectivamente (Cuadro 1).^{xxviii}

Cuadro 1. Frecuencia de alelos de IL-1ra en población abierta.^{xxviii}

Alelo	Frecuencia	Tamaño	No. Repeticiones
A1	0.736	410	4
A2	0.214	240	2
A3	0.036	500	5
A4	0.007	325	3
A5	0.007	595	6

El polimorfismo de IL-1ra en el sitio del intrón 2 (IL-1RA*2) tiene una acción reguladora sobre la producción de IL-1 β incrementando su producción *in vitro*.^{xxix} Existe evidencia que sugiere que el aumento en la producción de IL-1 β y o disminución en la producción de IL-1ra en individuos portadores del alelo IL1RN*2 predispone a una variedad de enfermedades humanas. Este último polimorfismo se ha asociado a diversas enfermedades y condiciones entre las que se encuentran la pérdida gestacional recurrente. (Cuadro 2).^{xviii}

Cuadro 2. Enfermedades asociadas al polimorfismo IL-1RA*2^{xviii}

Liquen escleroso
 Alopecia areata
 Psoriasis de inicio temprano
 Colitis ulcerativa en ciertos grupos poblacionales
 Esclerosis múltiple en ciertos grupos poblacionales
 Formas severas de síndrome de Sjögren

Afección dérmica en LES
Artritis crónica juvenil
Nefritis de Henoch-Schonlein
Neuropatía por IgA
Cáncer Gástrico
Neuropatía diabética
Sepsis severa
Periodontitis de inicio temprano, asma no atópica
Alveolitis fibrosante
Silicosis de los mineros de carbón
Parto pretérmino
Pérdida gestacional recurrente idiopática

En la actualidad se han completado diferentes estudios de la terapia con IL-1ra recombinante en el caso de sepsis y de artritis reumatoide, permanece pendiente la prueba de su efectividad en otros padecimientos.

En relación al $TNF\alpha$, se han identificado hasta 11 polimorfismos, los cuales se localizan en las posiciones de la región -1031, -863, -857, -851, +691, -419, -376, -308, 238, -163 y 49. Es de particular interés la variante bialélica en la posición -308, ya que se asocia a un alto nivel de expresión de $TNF\alpha$. Esta variante constituye un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora del gen $TNF\alpha$ +308 con el cambio de guanina por adenina, lo que resulta en genotipos de $TNF\alpha$ AA o AG que se asocian con un aumento en la activación del gen $TNF\alpha$. El significado funcional de esta variación ha promovido el desarrollo de diversos estudios que examinan la asociación entre este SNP y el parto pretérmino, preeclampsia, pérdida gestacional recurrente y otros eventos clínicos.^{xxx}

EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA ESTÁNDAR DE LA PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

El abordaje de la pareja con pérdida gestacional recurrente representa un reto para el clínico, en virtud de las posibilidades diagnósticas ya mencionadas, y del problema emocional que afecta a las pacientes que atraviesan por dicha situación. Se requiere de manera inicial una historia clínica exhaustiva que identifique claramente el número de pérdidas y la edad gestacional de las mismas, así como los estudios realizados previamente; un examen físico detallado y es estudio de

cada uno de los factores posiblemente implicados, para lo cual, se cuenta con herramientas diagnósticas útiles.

Las alteraciones estructurales, comúnmente son diagnosticadas utilizando ultrasonido (USG), histerosalpingografía (HSG) o sonohisterografía. Otros procedimientos que pueden realizarse para dicho fin son la histeroscopia, laparoscopia y la resonancia magnética nuclear. El USG transvaginal es particularmente útil en el caso de miomatosis uterina, y de pólipos endometriales. La HSG se utiliza en la evaluación de la integridad tubaria y puede detectar miomas submucosos, así como la mayoría de malformaciones uterinas, y adhesiones en la cavidad endometrial, sin embargo en la diferenciación de útero septado respecto al útero bicorne, se requiere de complementar la evaluación mediante laparoscopia para la visualización del fondo uterino.^{i, iii, viii}

La sonohisterografía, incluye la instilación de solución salina transcervical durante la realización del ultrasonido, permite delinear el contorno interno de la cavidad uterina, así como una visualización concomitante de la superficie, por lo cual, puede ofrecer mayor información en relación a las anomalías uterinas que la HSG o el USG solos. Al igual que la HSG, debe realizarse en la fase folicular del ciclo, al finalizar la menstruación. La histeroscopia permite el diagnóstico y tratamiento simultáneo de varias anomalías uterinas, la realización simultánea de laparoscopia se requiere en algunas ocasiones como se menciono previamente en la diferenciación de útero septado y el útero bicorne.^{viii}

El Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia, así como el Colegio Real de Obstetras y Ginecólogos, recomiendan el análisis citogenético de ambos padres para la búsqueda de rearrreglos cromosómicos estructurales que pueden aumentar al riesgo de un embarazo con un desequilibrio cromosómico, además se recomienda el estudio citogenético del espécimen de aborto en ambas guías, para investigar errores numéricos (como trisomías, monosomías o poliploidías) y rearrreglos cromosómicos estructurales. El estudio citogenético del espécimen es útil además para determinar si se requiere evaluar otros factores más allá del genético.^{ii, iii, vi}

El estudio de los estados protrombóticos involucran la determinación del Factor V de Leiden y en caso de sospecha, la determinación de la actividad de Proteína C, S y antitrombina. En el caso particular del Síndrome de Anticuerpo Antifosfolípido, en consenso para diagnóstico del mismo, establece las siguientes bases: (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diagnóstico de síndrome de anticuerpo antifosfolípido.^{XI}

Criterios clínicos

- Uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos.
- Una o más muertes inexplicables de fetos morfológicamente normales de al menos 10 semanas de gestación.
- Uno o más nacimientos prematuros de neonatos morfológicamente normales a la semana 34 de gestación o antes, debido a preeclampsia severa o a insuficiencia placentaria severa.
- Tres o más abortos consecutivos inexplicables, antes de la semana 10 de gestación. Habiendo descartado factores anatómicos, hormonales y estructurales genéticos de los padres.

Criterios de laboratorio: El mismo anticuerpo debe encontrarse positivo dos ocasiones con al menos 12 semanas de diferencia

- Anticuerpos anticardiolipina IgG y/o IgM presentes en títulos moderados o altos (>40 GPL o MPL)
- Anti β 2-Glicoproteína-1 IgG y/o IgM, presente en títulos >99 percentil
- Anticoagulante lúpico detectado de acuerdo a los lineamientos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis.

Los pacientes deben tener al menos un criterio clínico y uno de laboratorio

La evaluación diagnóstica de factores endocrinos debe incluir la realización de determinaciones séricas de prolactina, progesterona, perfil tiroideo, glucosa de ayuno, insulina y considerar la realización de biopsia endometrial en la fase lútea media. A este respecto, el endometrio se considera fuera de fase cuando se documenta histológicamente retraso de 2 días o más en relación a los datos histológicos esperados para determinada fecha del ciclo.^{ii, iii, xiii}

En el abordaje diagnóstico del factor inmunológico se encuentra la determinación de anticoagulante lúpico, la observación de los criterios diagnósticos mencionados para SAAF y las evaluaciones de embriotoxicidad e inmunofenotipificación.ⁱⁱⁱ

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En aproximadamente 50% de mujeres con historia de pérdida gestacional recurrente, aún a pesar de estudios exhaustivos en búsqueda de causas anatómicas, infecciosas, genéticas, o protrombóticas, no se logra identificar la etiología.

Ciertos polimorfismos de citocinas pueden afectar el curso normal del embarazo y cursar con una mayor respuesta inflamatoria debida a un incremento en la capacidad de producción de IL-1 y de TNF. Los polimorfismos más frecuentemente asociados a este efecto son: IL-1 β a nivel del exón 5 (posición +3953), el de TNF α (-308), y el alelo 2 de IL-1RA (IL-1RN*2) los cuales podrían encontrarse asociados a la pérdida gestacional recurrente de origen no identificado antes de la semana 20 de gestación. En los primeros dos casos, los cambios en la secuencia se manifiestan con incremento en la capacidad de secreción de las citocinas correspondientes y el otro caso, se ha observado una capacidad disminuida de secreción del IL-1RA. Por lo anterior, proponemos que dichos polimorfismos pueden ser más frecuentes en mujeres con aborto recurrente y sin causa identificada.

3 JUSTIFICACIÓN

El aborto recurrente es un problema relativamente frecuente en nuestro medio (1-2% de todos los embarazos) esta condición es comúnmente estresante para las parejas y frustrante para el médico. En el Instituto Nacional de Perinatología se han estudiado en la Clínica de Riesgo Pregestacional aquellas pacientes con dos o más pérdidas gestacionales de repetición. En cerca de 50% de los casos el factor etiológico no logra ser determinado. La identificación de una posible asociación de los polimorfismos IL-1 β (+3953), TNF α (-308) y del intrón 2 del IL-1RA, en estas pacientes daría una idea de un factor etiológico más que investigar y esto podría marcar la pauta para que en un futuro se estudien recursos terapéuticos a este respecto, como modular la producción aumentada de IL-1 β y de TNF para mejorar el pronóstico de este tipo de pacientes.

4 OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la frecuencia de los polimorfismos IL-1 β (+3953), TNF α (-308) y del intrón 2 del IL-1RA en pacientes con historia de aborto recurrente de factor no identificado atendidas en la Clínica de Riesgo Pregestacional del INPerIER.

ESPECÍFICOS

Comparar la frecuencia del polimorfismo IL-1 β (+3953) en pacientes con aborto recurrente y aquellas sin antecedente de aborto.

Comparar la frecuencia del polimorfismo IL1RA*2 en pacientes con aborto recurrente y aquellas sin antecedente de aborto.

Comparar la frecuencia del polimorfismo TNF α (-308) en pacientes con aborto recurrente y aquellas sin antecedente de aborto.

5 DISEÑO DEL ESTUDIO

TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Observacional, comparativo

TIPO DE DISEÑO:

Estudio de casos y controles

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO:

En relación a la temporalidad

Prospectivo

En relación al método de observación

Transversal

En relación al tipo de análisis

Descriptivo

6 METODOLOGÍA.

LUGAR Y DURACIÓN

Clínica de Riesgo Pregestacional del INPerIER y Hospitalización y Consulta externa de Obstetricia del INPer.

Duración: 2 años

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio está constituida por pacientes que acudieron a la Clínica de Riesgo Pregestacional y hospitalización o consulta externa de Obstetricia del INPer IER para su atención.

Las unidades de observación son las pacientes con aborto recurrente que cumplieron con los criterios de selección.

MÉTODO DE MUESTREO:

El muestreo fue no probabilístico, de casos consecutivos.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se utilizó una fórmula para diferencia de proporciones, tomando como referencia las frecuencias del polimorfismo IL-1RN*2 en aborto habitual (34%) y en población general (11%), reportadas por Unfried y cols.¹ Error! Marcador no definido. Esta diferencia de proporción es la más alta de las reportadas para los tres genes que se exploran en este estudio, de manera que, el tamaño que se obtiene cubre el tamaño de muestras de las otras dos

P1= 0.11 β= 0.2 Zβ= -0.84

P2= 0.34 α= 0.05 Zα= 1.96

$$n = \frac{Z\alpha \sqrt{2(P1)(1-P1)} - Z\beta \sqrt{P2(1-P2)+P1(1-P1)}}{P2-P1}^2$$

$$n = \frac{1.96\sqrt{2(0.11)(1-0.11)} - (-0.84)\sqrt{(0.34)(1-0.34)+0.11(1-0.11)}}{0.34-0.11}^2$$

0.34-0.11

$$n = \frac{(1.96\sqrt{0.19} + 0.84\sqrt{0.22} + 0.097)^2}{0.23}$$

$$n = \frac{(0.85 + 0.47)^2}{0.23}$$

n= 32.9

El tamaño de muestra es de 33 sujetos por cada grupo.

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

La muestra se formó con las pacientes que cumplieron los criterios de selección y que acudieron a los servicios de clínica de riesgo pregestacional. Los controles se tomaron de quienes acudieron a consulta externa de obstetricia o se encontraron en hospitalización del INPerIER durante el período de estudio.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Edad 18 a 38 años.
2. Sexo femenino, mexicanas por nacimiento.
3. Condición clínica:
 - a. Con aborto recurrente de causa no identificada habiendo completado el protocolo de la Clínica de Riesgo Pregestacional *. (CASOS)
 - b. Sin antecedentes de aborto y con al menos un embarazo llevado a término. (CONTROLES)
4. Consentimiento informado por escrito.

*Nota: Las siguientes pruebas resultaron normales: Cariotipo, Perfil trombofílico, Pruebas de función tiroidea, prolactina sérica, histerosalpingografía, cultivos especiales para Mycoplasma y Ureaplasma, VIH, TORCH, VDRL.

Por cada caso incluido se pareo por edad un control.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

1. Antecedente de mola o embarazo ectópico

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Muestra inadecuada o insuficiente para aislar el ADN.
2. Fallas técnicas en la realización de la prueba de PCR (degradación de DNA, ausencia de bandas).

VARIABLES EN ESTUDIO.

INDEPENDIENTES

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	UNIDAD DE MEDICIÓN
Polimorfismo IL-1 β *2	Mutación que afecta el exón 5, posición *3953 del gene de IL-1 β , que se manifiesta con secreción aumentada de la citocina. ¡Error! Marcador no definido.	Cualitativa nominal	<ul style="list-style-type: none">• Ausente• Presente como homocigoto (A1A1) (A2A2)• Presente como heterocigoto (A1A2)

VARIABLE	DEFINICION	TIPO	UNIDAD DE MEDICION
Polimorfismo IL-1RA*2	Es la inserción de una secuencia de 240 pb (repetición de 86 pb en tándem) en el intrón 2 del gene del IL-1RA. ¡Error! Marcador no definido.	Cualitativa nominal	<ul style="list-style-type: none">• Ausente• Presente como homocigoto• Presente como heterocigoto

VARIABLE	DEFINICION	TIPO	UNIDAD DE MEDICION
Polimorfismo TNF α *2 (-308)	Mutación en la posición -308, que corresponde a la zona promotora del gene de TNF- α . Se asocia con una tasa de transcripción aumentada..	Cualitativa nominal	Ausente Presente como homocigoto Presente como heterocigoto

DEPENDIENTE (DESENLACE)

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	UNIDAD DE MEDICIÓN
Aborto recurrente	Pérdida de ≥ 2 embarazos consecutivos antes de las 20 semanas de gestación. ¡Error! Marcador no definido., ¡Error! Marcador no definido., ¡Error! Marcador no definido.	Cualitativa nominal	Presente o ausente

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Las pacientes que cumplieron los criterios, se seleccionaron de los servicios de hospitalización de Obstetricia y de la Consulta Externa de la Clínica de Riesgo Preeclámpsico. En ese momento se les informó sobre el estudio y se les solicitó su participación en el mismo, en caso de aceptar se les dio a firmar la hoja de consentimiento informado: Se efectuó historia clínica completa que incluyó datos demográficos, antecedentes ginecológicos y obstétricos, personales patológicos, datos que se anotaron en la hoja de recolección y se tomó una muestra sanguínea de 3 ml en un tubo vacutainer con EDTA para el estudio genotípico. La muestra se llevó al Laboratorio de Biología Celular de la Torre de Investigación del INPerIER para la extracción de DNA y su posterior procesamiento, mediante la técnica de PCR descrita a continuación.

Extracción de DNA

1. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se agregan 900 μ L de solución de lisis.
2. Se transfiere 300 μ L de sangre total a la solución de lisis. Se agita vigorosamente invirtiendo los tubos varias veces.
3. Se incuba la solución por 5 minutos a temperatura ambiente, después se centrifuga a 12,000 rpm en una microcentrífuga por 20 segundos para separar los leucocitos.
4. Se remueve el sobrenadante (decantando o aspirando) sin disolver el botón de leucocitos. Puede quedar un remanente en las paredes del tubo. Este remanente es necesario para resuspender las células antes de la extracción.
5. Se resuspenden los leucocitos con agitación vigorosa en el sobrenadante residual.
6. Se agrega 500 μ L de solución de extracción para suspender el botón de células. Se agita vigorosamente.
7. Se incuba la solución por 5 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, colocar una columna GFX en un tubo colector para cada purificación. Precalentar la solución buffer a 70 °C
8. Se transfiere la solución de extracción a la columna GFX. Se centrifuga a 8,000 rpm por 1 minuto.
9. Se vacía el tubo colector y se vuelve a colocar la columna dentro del tubo colector.
10. Se agrega 500 μ L de solución de extracción a la columna GFX. Se centrifuga a 8,000 rpm por 1 minuto.
11. Se vacía el tubo colector y se vuelve a colocar la columna dentro del tubo colector.

12. Se agrega 500 μ L de solución de lavado a la columna GFX. Se centrifuga a 12,000 rpm por 3 minutos.
13. Se vacía el tubo colector y se transfiere la columna GFX a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL.
14. Se agrega 200 μ L de solución buffer precalentada directamente a la matriz de vidrio en la columna GFX.
15. Se incuba la muestra a temperatura ambiente por 1 minuto.
16. Se centrifuga a 8,000 rpm por un minuto para obtener el DNA purificado.

Amplificación

El DNA se almacena a 4 °C hasta su uso. La técnica que se utiliza para la identificación de los alelos de los genes señalados requiere que un fragmento genómico de DNA se amplifica por reacción en cadena de polimerasa (PCR) seguido de un análisis del patrón de tamaño de fragmentos después de la digestión con enzimas de restricción (RFLP) o bien por determinación directa del tamaño del fragmento amplificado.

TNF- α . Para la identificación de los alelos de TNF α se requiere la amplificación de un segmento de 108 pares de bases de DNA que incluye la posición -308 del gen. De estar presente el alelo 1 (ausencia de la transición de base), se crea un sitio de restricción para la enzima Nco I en el producto amplificado. De estar presente el alelo 2 (presencia de transición Adenina por Guanina) el sitio de restricción para la enzima Nco no es creado al llevar a cabo la amplificación de DNA. De esta manera, los productos de amplificación son digeridos con la enzima Nco I durante 24 hs en condiciones óptimas de actividad. En DNA digerido es separado en geles de acrilamida al 8% y teñido con bromuro de etidio, identificando la presencia del alelo 1 de TNF alfa al observar dos fragmentos de DNA, uno de 80 pb y otro de 27 pb, debido a la digestión llevada a cabo por la enzima Nco I. De estar presente el alelo 2, se observa un fragmento único de 107 pb, debido a la pérdida del sitio de restricción para la enzima durante la amplificación.

IL-1 β . Para identificar el alelo IL-1 β +3953, se utilizan *primers* de oligonucleótidos 5`- GTTGTCATCAGACTTTGACC - 3` (forward) y 5`- TTCAGTTCATATGGACCAGA-3` (reverse), que generan un fragmento de amplificación de 249 pb. Los productos de amplificación se digieren con TaqI a 65 °C por una hora para dar fragmentos intactos o digeridos de 135 y 114 pb. Los fragmentos se analizan en agarosa al 12% y se tiñe con bromuro de etidio. Como en el caso anterior la diferencia entre el alelo común y el alelo *2 de la citocina origina un sitio de corte para la enzima.

IL-1RA. La identificación de los alelos del IL-1RA se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, para la cual se emplearon iniciadores específicos (para el extremo 5´CTCAGCAACACTCCTAT y para el 3´ TCCTGGTCTGCAGGTAA). La Técnica de PCR consistió de 35 ciclos con las condiciones siguientes: desnaturalización a 92 °C, alineamiento a 60 °C y extensión a 72 °C. Cada mezcla de reacción se realizó en tubos de 0.2mL que contenían 1.0 µL de ADN, 2.5 µL de amortiguador, 2.5 µL de Mg Cl₂, 1.0 µL dNTP (0.8mM), 2.0 µL de cada iniciador (50 pmoles), 0,1 µL de Taq polimerasa (5 U) y agua grado biología molecular necesaria para un volumen final de 25 µL. El DNA amplificado fue separado en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 2.5%, teñidos con bromuro de etidio. La identificación de los alelos de interés se llevó a cabo mediante adquisición y análisis directo de los fragmentos separados por electroforesis. Dependiendo del alelo presente, corresponde el tamaño molecular de cada fragmento. De esta manera, el alelo 1 corresponde a un fragmento de amplificación de 412 pb, el alelo 2 a 240 pb, al alelo 3 al de 326 pb, el alelo 4 al de 498 pb y el alelo 5 al de 584 pb. El único de estos que tiene manifestación funcional, es el correspondiente al fragmento 240 pb.

7 ANÁLISIS

Se utilizó estadística descriptiva para las variables demográficas. Las variables cualitativas nominales se expresaron como proporciones. Las variables categóricas y las variables ordinales, son representadas como frecuencias. Todos los datos se analizaron en forma gráfica (barras, diagrama, etc.)

Para la comparación de prevalencias de los polimorfismos: IL-1β, IL-1RA y de TNFα entre mujeres con y sin aborto recurrente, las proporciones de los diferentes genes se presentan en tablas de contingencia de 2 x 2, se analizaron por χ^2 y se calculó razón de momios, con intervalo de confianza al 95%.

8 ASPECTOS ÉTICOS

I. Investigación sin riesgo. _____

II. Investigación con riesgo mínimo. X

III. Investigación con riesgo mayor al mínimo. _____

El riesgo es mínimo, debido a que el procedimiento de venopunción se realizó con técnica de asepsia y antisepsia y el volumen de 3 ml a extraer no afectó hemodinámicamente a las pacientes adultas. (Art. 100, Título Quinto de la Ley General de Salud, México, Enero 19, 2004) Se solicitó consentimiento informado

por escrito a las pacientes que participaron, tanto a los casos como los controles. El proyecto se sometió al dictamen del Comité de Investigación y Ética del INPerIER.

9 ORGANIZACIÓN

RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES

- a. Dra. Marta García Sandoval, residente de cuarto año de la Especialidad de Ginecología y Obstetricia del INPerIER, participó en la selección de la muestra y obtención la información clínica necesaria de los casos y controles, hizo la toma y transporte de las muestras. Participó en el procesamiento de las muestras por PCR y redactó los informes parciales y final del estudio.
- b. Dr. Felipe Vadillo Ortega, tutor y asesor metodológico de la tesis. Participó en la selección de la muestra y en el seguimiento del proceso técnico de las pruebas. Asesoró en el orden metodológico de la presentación del proyecto, el proceso de análisis estadístico de los resultados.
- c. Dr. César Hernández Guerrero. Participó en la selección de la muestra y en el seguimiento del proceso técnico de las pruebas. Asesoró en el orden metodológico de la presentación del proyecto, el proceso de análisis estadístico de los resultados.
- d. Dr. José Antonio Ramírez Calvo, asesor clínico del trabajo de tesis, participó en la selección de la muestra y en el seguimiento del proceso del estudio.

CAPACITACIÓN DE PERSONAL

La tesista Marta García Sandoval se capacitó en la toma de muestra, extracción de DNA y amplificación por PCR para determinar polimorfismos en el Laboratorio de Biología Celular, Torre de Investigación del INPerIER, bajo la asesoría del Dr. César Hernández Guerrero.

10 RESULTADOS

Se incluyeron 38 pacientes que reunieron las características del grupo de casos y 31 pacientes control. Las características clínicas y demográficas de las pacientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de pacientes estudiadas

Característica	Grupo de casos	Grupo de controles
Edad	29.2 ± 2.1	25.1 ± 3.2
Gestas	2.2 ± 2.0	2.1 ± 1.3
Para	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.8
Cesáreas	0.05 ± 0.001	0.6 ± 0.1
Abortos	2.4 ± 0.7	0

En todas estas pacientes se aisló ADN y se amplificó cada uno de los diferentes alelos de las citocinas.

La proporción de los alelos 1 y 2 del TNF- α y del gene de la IL-1 β no mostró diferencia significativa entre los dos grupos, tal y como se muestran en las dos tablas siguientes (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Frecuencia de alelos 1 y 2 de TNF α en pacientes con y sin aborto recurrente

Polimorfismos de TNF- α					
	Número de abortos	Frecuencia de alelos		Genotipo	
		Alelo 1	Alelo 2	1:2 ó 2:2	1:1
Casos (n=38)	2.45± 0.66	0.96	0.04	0.12	0.88
Controles (n=31)	0	0.96	0.04	0.11	0.89
Xi ² = 0.12, p = 0.92 N.S.					

Tabla 3. Frecuencia de alelos 1 y 2, genotipo 1:2 ó 2:2 y 1:1 en pacientes con y sin antecedente de aborto

Polimorfismos de IL-1 β					
	Número de abortos	Frecuencia de alelos		Genotipo	
		Alelo 1	Alelo 2	1:2 ó 2:2	1:1
Casos (n=38)	2.45 \pm 0.66	0.88	0.12	0.15	0.85
Controles (n=31)	0	0.87	0.13	0.17	0.83

$\chi^2 = 0.14$, $p = 0.90$, N.S.

Los alelos de la IL-1RA fueron cuantificados por lectura directa de las electroforesis de los productos amplificados, tal y como se muestra en la Figura 1. Se encontró diferencia significativa en la proporción de alelos 2 del IL-1RA en el grupo de pacientes con aborto recurrente y las diferencias se presentan en la tabla 4.

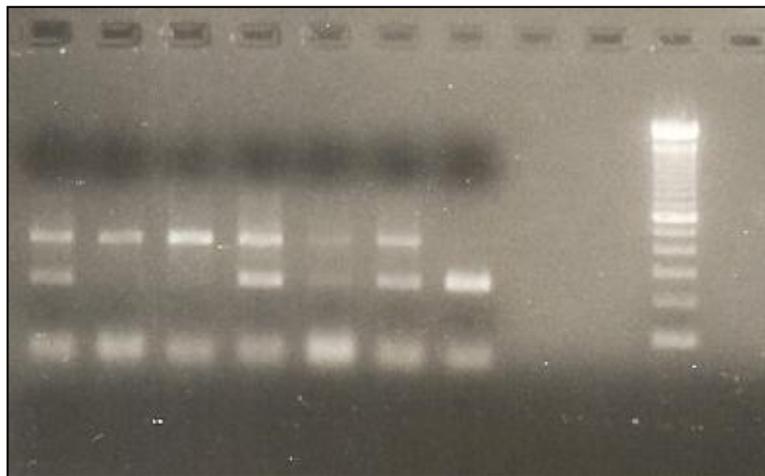


Figura 1. Electroforesis de productos de amplificación con iniciadores específicos para el gene de IL-1RA*2. La amplificación del intrón 2 genera productos de diferente tamaño, dependiendo del número de repeticiones presentes en cada gene individual. En los carriles 1, 4, 5 y 6 (izquierda a derecha), se muestra la presencia de dos bandas que representan al alelo 1 y al alelo 2 de mayor tamaño. Lo anterior representa al estado heterocigoto 1:2. En los carriles 2 y 3, se presentan dos casos homocigotos para el alelo 1. Y en el carril 7, se muestra un homocigoto para el alelo 2. La escalera del carril de la derecha incluye marcadores moleculares que van desde 100 hasta 600 bp.

Al comparar la frecuencia de polimorfismos de IL-1RA en pacientes con aborto recurrente y aquellas sin antecedente de aborto se observa que existe diferencia estadísticamente significativa de la frecuencia de polimorfismo *2 de IL-1RA en pacientes con antecedente de aborto recurrente. Esta diferencia es apreciable tanto en el número absoluto de alelos presentes, como en sus combinaciones génicas. Contrario a lo esperado, el alelo *2 se encuentra en menor proporción en el grupo de mujeres con aborto recurrente y esta diferencia es estadísticamente significativa. Al calcular OR, esto hace ver que la presencia del alelo esté subrepresentada en éste grupo de mujeres con OR de 0.40 con intervalo de confianza de 95% (0.171-0.959) y una p de 0.02. (Tabla 4)

Tabla 4. Frecuencia de polimorfismos de IL-1RA en pacientes con y sin aborto recurrente

Polimorfismos de IL-1RA					
	Número de abortos	Frecuencia de alelos		Genotipo	
		Alelo 1	Alelo 2	1:2 ó 2:2	1:1
Casos (n=38)	2.45± 0.66	0.73	0.27	0.31	0.69
Controles (n=31)	0	0.49	0.51	0.69	0.31
$\chi^2 = 5.236$; $p = 0.02$; OR: 0.40 IC 95% (0.171-0.959)					

11 DISCUSION

La mayor parte de la evidencia que tenemos apunta a que la eficiencia reproductiva de la especie humana es más bien pobre y es posible reconstruir de algunas publicaciones que por lo menos el 50% y hasta el 70% de todos los embarazos humanos no progresan al término. Aunque desconocemos todos los mecanismos que provocan un embarazo fallido, podemos sospechar que dado el número y complejidad de los procesos que se suceden desde el momento de la fertilización hasta el trabajo de parto, es prácticamente imposible que el aborto recurrente se pueda explicar con un solo mecanismo y por ello es necesario establecer que el enfoque que utilizamos en este trabajo, aunque podría ser relevante a la fisiopatología del aborto, no es la única explicación plausible para ésta patología de la reproducción humana.

El aborto de manera recurrente afecta aproximadamente al 5% de las parejas en búsqueda de embarazo. Representa una situación de crisis que involucra, en primera instancia, la necesidad de aceptar la realización de un legrado uterino instrumental como manejo obstétrico en el momento del diagnóstico de la pérdida, tomando en cuenta que dicho procedimiento no se encuentra exento de riesgos como lo son procesos infecciosos y/o hemorragia, además de iniciar un protocolo complejo de estudio diagnóstico en búsqueda de la o las posibles causas de la pérdida de manera recurrente, sin embargo, la literatura médica actual sugiere que las causas de las pérdidas son identificadas en únicamente 50% de las pacientes

Desde la perspectiva de un *conceptus* normal, que completa la implantación y en ausencia de defectos maternos como los mencionados en la introducción de éste trabajo, es posible proponer que la mayor parte de los mecanismos que operan en el rechazo del embarazo, correspondan a adaptaciones incorrectas del sistema inmunológico materno. Estas respuestas anormales deberían tener como brazos efectores la activación de la respuesta inflamatoria, la activación de eventos trombogénicos y/o activación del sistema de complemento, que dañan a la placenta y al producto. La mayor parte de estas evidencias se han obtenido de modelos en roedores, en donde se ha explorado de manera exhaustiva la modulación de la respuesta inmunológica como un factor participante. Derivado de estos estudios se ha podido establecer y trasladar ésta información al caso humano, considerando que el embarazo coexiste con un estado de tolerancia inmunológica que ha sido ligado a la dominancia de un microambiente Th2 en la interfase entre la madre y el producto. De esta manera, cualquier factor que provoque desbalance de la respuesta y promueva al brazo Th1, podría poner en peligro la sobrevivencia del producto.

En el ambiente intrauterino existen básicamente tres tipos celulares: células T, macrófagos y células natural Killer, cada una de estas poblaciones celulares

desempeña funciones reguladoras y varían en su cantidad dependiendo de la fase en la que se encuentre la gestación. Sabemos que en el embarazo temprano, el número relativo de células T disminuye, mientras aumenta el de las uNK, aunque no sólo es importante el número celular, sino la actividad de dichas células. Esta actividad puede ser estimulada por procesos infecciosos intrauterinos que desencadenan la formación de citocinas provenientes de células Th1 consideradas como proinflamatorias y que son los mayores efectores de la respuesta inmune mediada por células, ocasionando inflamación local, hemorragia y necrosis afectando el curso de la gestación.

Diferentes condiciones podrían generar el mismo resultado de desbalance de la respuesta inmunológica en la interfase madre/feto y derivado de los modelos animales estudiados, se han propuesto por lo menos dos opciones explicativas del mecanismo que lleva al aborto. Una involucra la activación directa de células inmunológicas profesionales, situación que asemeja al rechazo de transplante y que aplica de manera directa al aloinjerto que representa el feto. La segunda opción resulta de la activación de respuestas no específicas como la cascada del complemento o la respuesta inflamatoria. La serie de eventos de mala adaptación que se generan justo antes o durante el aborto caracterizados por inflamación local, se asocian a la activación del complemento, el cual es un componente de la respuesta inflamatoria y tiene la función de atraer células fagocíticas al sitio correspondiente y producir necrosis. Su rápida activación, falta de especificidad y memoria, sugieren que estos eventos son parte de la respuesta inmunológica innata.

Las investigaciones sobre el complemento demuestran que su participación en la respuesta inmunológica se realiza por lisis celular directa a través del complejo de ataque de membrana (MAC) y el reclutamiento y activación de células inflamatorias. Es importante en este momento mencionar las investigaciones realizadas en roedores en esta área por la similitud de dicho proceso al del humano. El daño que puede generar el complemento al tejido propio se previene debido a proteínas que modulan la actividad del complemento como lo son el factor acelerador de desintegración (DAF/CD55), la proteína cofactor de membrana (MCP/CD46) y el receptor del complemento 1-relacionado gene-proteína y (Crry). Este último, en roedores, inhibe la instalación de C3 y C4 activados en la superficie de células autólogas, y se expresa particularmente en el trofoblasto y la decidua materna. Su deficiencia provoca instalación del complemento en la placenta y la interfase feto-materna, así como invasión al embrión de polimorfonucleares. A pesar de la ausencia de una proteína equivalente al Crry en el humano, el DAF y MCP se expresan en niveles altos en la placenta humana sugiriendo un papel similar al Crry en el ratón. Todos estos estudios demuestran de manera clara que el reconocimiento fetal por el sistema inmunológico puede ocasionar activación del complemento, y la ausencia de proteínas reguladoras del mismo puede ser letal para el feto, aun en embarazos histocompatibles.

Aunque la mayor parte de los autores apoyan la hipótesis de que la activación de la respuesta inflamatoria en el entorno de contacto entre la madre y el producto, con daño a los elementos que garantizan la placentación es la opción más viable para explicar el mecanismo de daño en el aborto, en los últimos años ha surgido evidencia que apoya la posibilidad de que la activación de la respuesta inflamatoria resulta en daño sistémico que afecta mucho más allá del contacto de la placenta y el útero, afectando por ejemplo la función endocrina ovárica y provocando una caída en la secreción de progesterona. Erlebacher y colaboradores describen un modelo de pérdida gestacional temprana en roedores que vincula al sistema inmunológico con el sistema endocrino reproductivo, el cual es regulado por el receptor de TNF, CD40. Su actividad genera respuesta inflamatoria, sin embargo la pérdida de la gestación no se produce por la activación de células inmunológicas, sino por la disminución en la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo. Estos autores demostraron que la actividad de CD40 en roedores ocasiona pérdida temprana de la gestación precedida por un decremento en las concentraciones séricas de progesterona. La falla en la gestación secundaria a la actividad de CD40 se debe a insuficiencia lútea asociada a resistencia ovárica a la prolactina y a defectos en la señalización del receptor de prolactina en roedores. Es posible entonces, que algunos agentes ocasionen falla en la gestación por mecanismos independientes pero que pueden sobreponerse, la inhibición sistémica de funciones ováricas y la inducción local de procesos inflamatorios en el sitio de implantación.

De esta manera, cualquier condición que resulte en activación de la respuesta inflamatoria podría ser una explicación del aborto. Para involucrar la activación de este mecanismo en forma recurrente en embarazos sucesivos, es necesario pensar en algún mecanismo que resulte en la activación de la respuesta inflamatoria en cada embarazo. Una alternativa para explicar de manera coherente esta situación es la información genética de cada mujer, la cual, determina su capacidad de respuesta inmunológica y en particular, la codificación de citocinas. Las variantes alélicas de cada individuo condicionan cambios en la regulación de la expresión de ciertos genes que tienen la función de controlar la cantidad de citocina secretada, lo cual es de suma importancia debido al efecto deletéreo en la gestación que puede tener el aumento en la producción de dichas proteínas. Esa es la hipótesis que se explora en este trabajo.

En contraste con los hallazgos de Babbageⁱ en nuestro estudio no encontramos ningún desbalance en la proporción del alelo hiperrespondedor de TNF α , sin embargo, debemos considerar que parte de la actividad de las citocinas es local y por ello, la medición directa de las mismas en la unidad feto-placentaria sería la única opción viable para descartar su participación en el fenómeno de rechazo. Tampoco encontramos diferencia en la proporción de alelos 1 y 2 de la IL-1 β en las dos poblaciones comparadas.

Es importante puntualizar que en nuestra población encontramos que existe disminución estadísticamente significativa de la frecuencia del polimorfismo de IL-1RA en pacientes con antecedente de aborto recurrente. Esta diferencia es tan aparente que se manifiesta por un OR de 0.4, con IC significativos, lo que equivale a 60% menos de lo esperado. Como se había mencionado en la introducción, existe un reporte que señala que la presencia de este polimorfismo tiene manifestaciones funcionales en la expresión de la IL-1 β , lo que de acuerdo a la hipótesis, debería haber resultado en un efecto numérico en la dirección contraria y así entender que los tejidos portadores del gene con el polimorfismo *2, podrían comportarse como hipersecretores y por ello, propensos al desarrollo de una respuesta inflamatoria de mayor envergadura que en sujetos con el alelo más común. Sin embargo, nuestro hallazgo apunta en la dirección contraria y podría estar relacionado con la secreción anormal del propio IL-1RA, lo que podría correlacionar con una secreción normal o aumentada de IL-1 β . Lo relevante sería el balance final entre la citocina y su antagonista específico. Los alelos como el del IL-1RA*2, que ocurren en un intrón, no pueden estar representados en la proteína final y su única opción es tener algún efecto regulatorio tipo cis, sobre su gene de origen. Hasta el momento no se ha medido la capacidad de secreción de IL-1RA en tejido reproductivos portadores del gene con el intrón 2 modificado por secuencias repetidas y esto parece indispensable para conocer con detalle la naturaleza molecular del efecto de su presencia en la capacidad de respuesta inflamatoria.

A pesar de que la prevalencia del polimorfismo *2 del IL-1RA está disminuida en los casos con aborto recurrente, es importante considerar que su presencia se ha relacionado con varias enfermedades humanas en las que existe evidencia de respuesta inflamatoria aumentada.

RESUMEN CURRICULUM

Nombre: Marta García Sandoval

Fecha de Nacimiento: 10/12/1975.

Dirección Permanente: Puerto de Acapulco No. 2001, Residencial Las Viandas II. Casa 6. CP52170. Toluca, Estado de México.

Correo electrónico: magarsa@hotmail.com

- Licenciatura en Médico Cirujano. En la Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina. Toluca, Estado de México. 1996-2001.
- Internado Rotatorio de Pregrado. En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. México, Distrito Federal. 2001-2002.
- Servicio Social en Investigación. En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. Departamento de Gastroenterología. México, Distrito Federal. 2002-2003.
- Especialidad en Ginecología y Obstetricia, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, Distrito Federal 2004-2008.

12 CONCLUSIONES

En nuestro estudio no encontramos ningún desbalance en la proporción del alelo hiperrespondedor de TNF α , sin embargo, la medición directa de las mismas en la unidad feto-placentaria sería la única opción viable para descartar su participación en el fenómeno de rechazo. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la proporción de alelos 1 y 2 de la IL-1 β en las dos poblaciones comparadas.

En nuestra población encontramos que existe disminución estadísticamente significativa de la frecuencia del polimorfismo de IL-1RA en pacientes con antecedente de aborto recurrente, manifestada por un OR: 0.40 IC 95% (0.171-0.959). Debería haber resultado en un efecto numérico en la dirección contraria y así entender que los tejidos portadores del gene con el polimorfismo *2, podrían comportarse como hipersecretores y por ello, propensos al desarrollo de una respuesta inflamatoria mayor que en sujetos con el alelo más común. Sin embargo, nuestro hallazgo apunta en la dirección contraria y podría estar relacionado con la secreción anormal del propio IL-1RA, lo que podría correlacionar con una secreción normal o aumentada de IL-1 β .

A pesar de que la prevalencia del polimorfismo *2 del IL-1RA está disminuida en los casos con aborto recurrente, es importante considerar que su presencia se ha relacionado con varias enfermedades humanas en las que existe evidencia de respuesta inflamatoria aumentada

13 ANEXOS

TEXTO DECLARATORIO

Carta de Consentimiento Informado

Nombre del Proyecto de Investigación: Determinación de la Frecuencia de los Polimorfismos IL-1 β (+3953), IL-1ra (IL-1RN*2) y TNF α (-308) en Pacientes con Aborto Recurrente

Yo _____
(nombre del participante o su representante legal)

Me invitaron a participar en esta investigación porque he perdido varios embarazos y aún no se ha identificado una causa aparente de esto. Entiendo que el proyecto de investigación servirá para identificar si en mi sangre existe una sustancia que podría hacer que pierda mis embarazos. Los beneficios que obtendré no serán inmediatos porque aún faltan muchas investigaciones por hacer. Se me explicó que se realizará una toma de 3 mL de sangre por medio de una jeringa estéril, lo cual no causa riesgo para mi salud, después la llevarán al laboratorio de Biología Celular de la Torre de investigación de éste Instituto para su estudio.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que al momento de firmar la presente no hubiese expresado, o que surja durante el desarrollo de la investigación. La Dra. Marta García Sandoval se ofreció a responder cualquier duda al respecto en el Instituto Nacional de Perinatología con teléfono 55209900 ext. 111 de lunes a viernes de las 08:00 a las 14:00 horas. Además me ha ofrecido confidencialidad con la información obtenida.

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se me han especificado con anterioridad.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione se vea afectada por este hecho al igual que se me ha informado que los gastos que genere el ingreso al protocolo correrán a cargo del Instituto, no así el resto de mi atención médica.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos.

México, D. F., a ___ de _____ de 200__.

NOMBRE

FIRMA

Investigador	
Participante	
Representante/Esposo /Domicilio	
Testigo /Parentesco/ Domicilio	
Testigo /Parentesco/ Domicilio	

TEXTO DECLARATORIO

Carta de Consentimiento Informado (Pacientes sin antecedente de aborto) Nombre del Proyecto de Investigación: Determinación de la Frecuencia de los Polimorfismos IL-1 β (+3953), IL-1ra (IL-1RN*2) y TNF α (-308) en Pacientes con Aborto Recurrente

Yo _____
(nombre del participante o su representante legal)

Me invitaron a participar en esta investigación porque hay mujeres que han perdido varios embarazos y yo he tenido hijos sanos. Entiendo que el proyecto de investigación servirá para identificar si en mi sangre existe una sustancia que podría hacer que pierda mis embarazos pero también me han explicado que en caso de que exista, la sustancia no ha sido capaz de afectarme. Los beneficios serán principalmente para esas mujeres que han tenido varias pérdidas de embarazos. Se me explicó que se realizará una toma de 3 mL de sangre por medio de una jeringa estéril, lo cual no causa ningún riesgo para mi salud, después la llevarán al laboratorio de Biología Celular de la Torre de investigación de éste Instituto para su estudio.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que al momento de firmar la presente no hubiese expresado, o que surja durante el desarrollo de la investigación. La Dra. Marta Garcia Sandoval se ofreció a responder cualquier duda al respecto en el Instituto Nacional de Perinatología con teléfono 55209900 ext. 111 de lunes a viernes de las 08:00 a las 14:00 horas. Además me ha ofrecido confidencialidad con la información obtenida.

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se me han especificado con anterioridad.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione se vea afectada por este hecho al igual que se me ha informado que los gastos que genere el ingreso al protocolo correrán a cargo del Instituto, no así el resto de mi atención médica.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos.

México, D. F., a ____ de _____ de 200__.

NOMBRE

FIRMA

Investigador	
Participante	
Representante/Esposo /Domicilio	
Testigo /Parentesco/ Domicilio	
Testigo /Parentesco/ Domicilio	

INPER IER
HOJA DE COLECCIÓN DE DATOS

Nombre: Registro:
 Edad: Edo. Civil:
 Escolaridad: Origen:
 Residencia: Ocupación:
 Religión:
 Gestas: Paras : Abortos: Cesáreas: Ectópicos: Molas:
 AGO:
 M: C: IVSA: PS: PAP: MPF:
 PS:

	SDG	Diagnóstico	Resolución	Complicaciones	V/S
1.					
2.					
3.					
4.					

APP

Factor anatómico:
 Factor inmunológico:
 Factor infeccioso:
 Factor endócrino ovárico:
 Factor genético:

IL-1 β +3953	TNF α -308	IL-1RN*2

BIBLIOGRAFIA

1 Normas y Procedimientos de Ginecología y Obstetricia. Instituto Nacional de Perinatología México 2003: 111-126

2 American College of Obstetricians and Gynecologist. Management of recurrent early pregnancy loss. ACOG Practice Bulletin. Compendium of Selected Publications 2004:472- 483.

3 Stephenson M, Kutteh W. Evaluation and management of early pregnancy loss. Clin Obstet Gynecol 2007; 50: 132-145.

4 Jauniaux E, Farquharson R G, Christiansen O B, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. Hum Reprod 2006; 21: 2216-2222.

5 Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. Hum Reprod Update 2002 ; 8: 463-481.

6 Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2006; 24: 17-24.

7 Unfried G, Tempfer C, Schneeberger Ch, Widmar B, Nagele F, Huber J. Interleukin 1-receptor antagonist polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. Fertil Steril 2001; 75: 683-686.

8 Devi AS, Pham N, Arici A. Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2006; 24: 25-32.

9 Puscheck E E, Jeyendran R S. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. Curr Opin Obstet Gynecol 2007; 19: 222-228.

10 Levine JS , Brunch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. N Engl J Med 2002; 346:752-763.

11 Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T. Internacional consensos statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid síndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.

12 Kujovich J L. Trombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191: 412-424.

13 Arredondo F, Noble L S. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 33-39.

14 Laird S M, Tuckerman E M, Cork B A, Linjawi S, Blakemore A I F Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2003; 9:163-174.

15 Jenkins C, Roberts J, Wilson R, McLean MA, Shilito J, Walker JJ. Evidence of a TH1 type response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2000; 6:1206-1208.

16 Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expression at the materno-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 241-256

17 Chaouat G, Ledee B, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S, Martal J, Frydman R. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:177-186

18 Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1ra in disease. cytokine growth factor. *Annu Rev Immunol* 2002; 13:323-340.

19 Peracoli JC, Vieira M, Serrao MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57: 177-185.

20 Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 36-41.

21 Alberts B. *Biología molecular de la célula*. Tercera Edición. Barcelona: Ediciones Omega; 1996. 326.

22 Lewin B. *Isolating the gene*. In: *Genes V*. Oxford University Press Editorial United States; 1994. 127-158.

23 Hernandez-Guerrero C, Monzon-Bordonaba F, Jimenez-Zamudio L, Ahued-Ahued R, Arechavaleta-Velasco F, Strauss III JF, Vadillo-Ortega F. In-vitro secretion of proinflammatory cytokines by human amniochorion carrying hyper-responsive gene polymorphism of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β . *Mol Human Reprod* 2003; 9: 625-629.

23 Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Ghareh-Fard B, Sarvar J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J Reprod Immunol* 2005; 65:171-178.

24 Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kishi R. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss in Japanese women. *Fertil Steril* 2004;81:374-378.

25 Genc M., Gerber S, Nesin M, Wilkins S. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:157-163.

26 Hefler LA, Tempfer CB, Unfried G, Scheeberger CH, Lessi K, Nagele F, Huber JC. A polymorphism of the interleukin-1 β gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2001; 76:377-379.

27 Tarlow J, Blakemore A, Lennard A. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86 bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993; 91: 403-404.

28 Santilla S, Savinainen K, Hurme M. Presence of IL-1ra allele 2 is associated with enhanced IL-1 β production in vitro. *Scand J Immunol* 1998; 47: 195-8.

29 Menon R, Meriardi M, Betran AP, Dolan S, Jiang L, Fortunato S, Williams S. Analysis of association between maternal tumor necrosis factor α promoter

polymorphism (-308), tumor necrosis factor, and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1240-1248.

30 Babbage SJ et al. Cytokine promotor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2001; 51: 21-27.