



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los
Trabajadores del Estado.**

Hospital Regional "1º de Octubre"

**Expresión de factores tróficos, neurotróficos y sus receptores
TRK's en placentas de pacientes preeclámpticas**

No. de Registro Institucional 109.2012

TESIS QUE PRESENTA:

Médico General
Aridahyd Montero Rojas

PARA OBTENER EL TITULO DE:
Médico Especialista

EN:
Ginecología y Obstetricia

Facultad de Medicina



México, Distrito Federal 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Autorizaciones

DR. RICARDO JUAREZ OCAÑA
Coordinador de Enseñanza e Investigación

DR. VICENTE ROSAS BARRIENTOS
Jefe del Comité de Investigación

DR. FRANCISCO J. ALVARADO GAY
Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia

DR. JUAN ANTONIO GONZÁLEZ BARRIOS
Asesor de Tesis

Tabla de Contenidos

Autorizaciones	2
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Marco Teórico.....	9
Preeclampsia.....	9
Prevalencia.....	10
Estadísticas de obstetricia.....	11
Fisiología placentaria en la preeclampsia.....	12
Factores tróficos.....	13
Factores Neurotróficos y sus Receptores.....	14
Premisas.....	16
Premisa 1.....	16
Premisa 2.....	16
Premisa 3.....	16
Premisa 4.....	16
Hipótesis.....	17
Primera Hipótesis.....	17
Segunda Hipótesis.....	17
Tercera Hipótesis.....	17
Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
Justificación.....	19
Material y Métodos.....	21
Tipo de estudio.....	21
Selección de la muestra.....	21
Tamaño de la muestra.....	21
Pacientes.....	21
Criterios de inclusión.....	22
Criterios de no Inclusión.....	23
Criterios de Eliminación.....	24
Muestras Biológicas.....	24
Extracción de proteínas.....	25
Determinación de proteínas.....	25
Análisis de Western Blot.....	25
Extracción del ARN total.....	27
Cuantificación del ARN total.....	28
Electroforesis del ARN en gel de agarosa.....	30
Fotodocumentación del ARN.....	30
Retrotranscripción.....	30
Evaluación de la transcripción.....	32

Inmunohistoquímica.....	34
Unidades de medida.....	35
Análisis estadístico.....	36
Resultados	37
Discusión.....	45
Características demográficas	45
Características clínicas.....	46
Características bioquímicas.....	47
Manejo obstétrico:.....	48
Características de la placenta.....	49
Transcripción	49
Conclusiones.....	51
Perspectivas.....	53
Bibliografía.....	54

Dedicatoria

A mi Madre:

Sra. María Patricia Rojas León

Por sus buenos consejos, por ser esa mujer tan grande que guió mis pasos desde el primer día de mi vida. Por no soltar mi mano en los momentos difíciles.

A mi Padre:

Sr. Enrique Montero Montealegre

Porque su fortaleza me hace grande, por compartir mis sueños, mis ilusiones y mis anhelos pero siempre respetando lo que yo quiero. Tienes un lugar reservado en mi corazón

A mi hermano:

Sr. Ulises Montero Rojas

Por ser mi compañero de juegos en la infancia, y mi amigo toda la vida, aun en la distancia siempre estas con migo, te quiero mucho.

A mis abuelas:

Sra. Margarita Clara León Rojas

Sra. Benita Montealegre Garcés

Por su infinita sabiduría sobre la vida y por haberme enseñado a amar a Dios.

Agradecimientos

A Dios:

Por cuidar mis pasos y permitirme cumplir uno más de mis sueños.

Al Dr. Juan Antonio González Barrios

Por su tiempo, paciencia y dedicación para que aprendiera algo nuevo todos los días haciendo de este proyecto una realidad, pero sobre todo por enseñarme a razonar.

Al Dr. Francisco Alvarado Gay

Por haberme asignado este proyecto del que tanto aprendí. Siempre dejando huella en el camino.

A mis compañeros

Por su disposición para ayudarme, pero sobre todo por hacer de estos 4 años un recuerdo inolvidable.

Al ISSSTE

Por haber financiado en su totalidad el proyecto 109.2012, y por haberme permitido sus instalaciones para mi formación como médico especialista en Ginecología y Obstetricia

A aquellos que creyeron en mí.

Resumen

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica, caracterizada por la aparición súbita de hipertensión y proteinuria después de las 20 SDG, comprometiendo la vida del feto y la madre. Sigue siendo una enfermedad de las teorías ya que aun no se conoce el origen de su patogénesis, una de las más aceptadas es la migración deficiente del trofoblasto, la cual depende de las vías de señalización molecular que se llevan a cabo entre el trofoblasto y el endometrio, permitiendo que este último sea receptivo y permisivo para la implantación del cigoto, dentro de esta comunicación molecular participan factores de crecimiento como: VEGF, PlGF, EGF, FGF, NT, CNFT y BDNF, los cuales actúan mediante la activación de receptores TRK (tipo A, B o C), permitiendo que el feto y la placenta tengan un adecuado desarrollo y crecimiento. En el presente estudio se incluyeron 12 placentas divididas en dos grupos: 6 de pacientes con preeclampsia y 6 placentas controles de pacientes con embarazo normoevolutivo. A las que se les realizó extracción del RNA mensajero, el cual fue analizado mediante arreglos de PCR-TR para evaluar los cambios en la transcripción de factores de crecimiento, factores neurotróficos y de sus receptores. El análisis confirmó una regulación positiva de los factores de crecimiento con función antiangiogénica y una regulación negativa de los angiogénico. Estos datos sugieren fuertemente que las mujeres que desarrollan preeclampsia tienen disminución en la concentración de estos factores proteicos llevando al feto a restricción del crecimiento intrauterino; por lo que podemos hipotetizar que los factores neurotróficos expresados por la placenta pudieran proteger al feto de presentar convulsiones posteriores al nacimiento y quizá durante los primeros meses de vida.

Palabras clave: Preeclampsia, Factores tróficos, Factores neurotróficos, receptores TRK.

Abstract

Preeclampsia is a multisystem disease characterized by unexpected appearance of hypertension and proteinuria after 20 SDG, that threatens the life of the fetus and mother. It remains a disease of theories because they have not known the origin of its pathogenesis, most accepted one is poor trophoblast migration, which depends on the molecular signaling pathways that are carried out between the trophoblast and endometrium, allowing the last to be receptive and permissive for zygote implantation within this molecular communication involving growth factors such as VEGF, PlGF, EGF, FGF, NT, CNFT and BDNF, which act by activation of TRK receptors (type A, B or C) allowing the fetus and placenta have adequate growth and development. In the present study included 12 placentae distributed in two groups: 6 patients with preeclampsia and 6 placentae of patients with normal pregnancy used like controls. To which was performed extraction of messenger RNA, which was analyzed by RT-PCR arrays to assess the changes in the transcription of growth factors genes, neurotrophic factors genes and their receptors genes. The analysis confirmed an upregulation of growth factors with angiogenic function and negative regulation of angiogenesis. These data strongly suggest that women who develop preeclampsia have a decreased concentration of these protein factors taking the fetal intrauterine growth restriction, for what we can hypothesize that neurotrophic factors expressed by the placenta may protect the fetus from convulsions after birth and perhaps during the first months of life.

Keywords: Preeclampsia, Trophic Factors, Neurotrophic Factors, TRK receptors.

Marco Teórico

Preeclampsia

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica del embarazo, caracterizada por una aparición súbita de hipertensión (presión sistólica y diastólica ≥ 140 y ≥ 90 mm Hg, respectivamente, en dos ocasiones, con al menos 6 horas de diferencia entre ambas tomas) y proteinuria (excreción de proteínas de ≥ 300 mg en orina de 24 h), que se desarrolla después de las 20 semanas de gestación (SDG) en mujeres previamente normotensas^[1, 2].

Dependiendo de los sistemas que se encuentren comprometidos pudiera desarrollarse una gran cantidad de síntomas como: edema, alteraciones homeostáticas, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y en ocasiones síndrome de HELLP (Hemólisis, Enzimas hepáticas elevadas y Plaquetopenia). La preeclampsia puede presentarse de forma temprana si se desarrolla antes de las 34 SDG o tardía si se desarrolla después de las 34 SDG, clínicamente tiene presentación leve o severa (presión arterial sistólica ≥ 160 mmHg o presión diastólica ≥ 110 mmHg, proteinuria >5 g/24 h, oliguria, síntomas neurológicos, insuficiencia hepática, trombocitopenia $<100,000$ mm³ y síndrome de HELLP), pudiendo evolucionar a eclampsia de no corregirse el estado hipertensivo y la disfunción hepática, adicionalmente se puede manifestar solamente como enfermedad materna, en algunas ocasiones se induce retardo del crecimiento fetal (1 %) o sufrimiento fetal (15 %).

La preeclampsia presenta una alta incidencia en pacientes primigravidas o con primipaternidad ^[3], en mujeres que concibieron mediante técnicas de reproducción asistida, en pacientes con patología autoinmune, lo que revela el papel del sistema inmune materno en su patogénesis ^[4,6].

Por otro lado, en mujeres con enfermedad metabólica, vascular o renal preexistente se incrementa el riesgo de desarrollar preeclampsia ^[7], debido a la elevada sensibilidad inducida por los cambios fisiológicos propios del embarazo. La resolución de la preeclampsia se da cuando se remueve la placenta, por lo que es inevitable no pensar que la causa molecular de la preeclampsia radica en el metabolismo placentario, ya sea en la producción de moléculas que median el desarrollo de la preeclampsia o bien que la placenta es el blanco en el cual se expresan las moléculas receptoras cuya activación median el desarrollo de la preeclampsia.

Prevalencia

En el año 2010 la enfermedad hipertensiva del embarazo (Preeclampsia), fue la primera causa de ingreso a la unidad de cuidados intensivos adultos y medicina interna del la división de Gineco-Obstetricia en la U. M. A. E. No. 3, del Centro Médico Nacional “La Raza”, con una media de 27 ($s = 13$) pacientes por mes, la presentación de la preeclampsia incrementa durante el otoño, esta se comparte con otras patologías hipertensivas (Cuadro 1).

Cuadro 1: Causas de morbilidad en el servicio de Gineco-Obstetricia;
Reporte de la U. M. A. E. No. 3, del Centro Médico Nacional “La Raza” en el 2010.

Patología	Frecuencia
Enfermedad hipertensiva del embarazo	334
Choque hipovolémico	84
Sépsis	21
Tromboembolia Pulmonar + Embarazo	7
Endocrinopatías	8
Hígado Graso + Embarazo	3
Miscelaneos	69

Estadísticas de obstetricia

En la unidad de tococirugía del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Regional “1° de Octubre”, se atienden 118 (s = 14) pacientes de forma mensual, durante el año 2008 se atendieron 1512 pacientes, en el 2009 se atendieron 1374 pacientes, mientras que en el 2010 se atendieron 1341 pacientes en la sala de tococirugía, en total en los últimos 3 años se dio atención obstétrica a 4227 pacientes, de estas se reportó que el 60% (2536) de las pacientes presentaron embarazos normoevolutivos, el 8% (338) de las pacientes fue diagnosticada con Preeclampsia y el 32% (1353) de las pacientes presentaron patología concomitante (Figura 1).

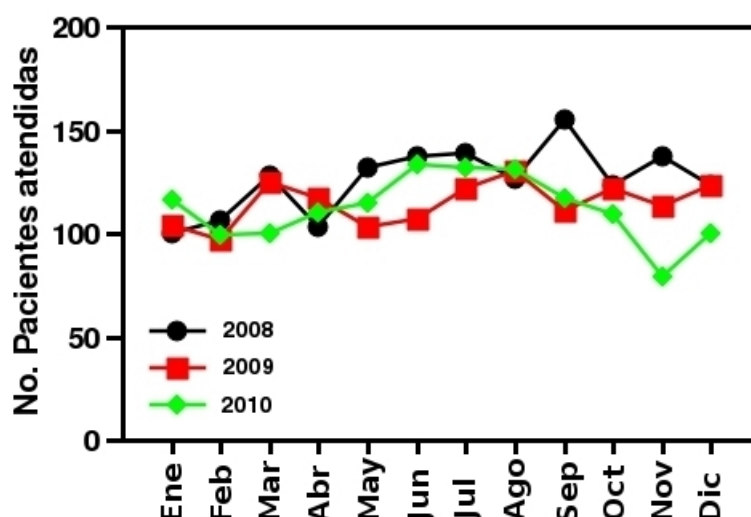


Figura 1: Frecuencia de pacientes embarazadas atendidas en el Hospital Regional "1° de Octubre", la figura muestra el número de pacientes atendidas mensualmente durante los años 2008 a 2010

En el servicio de ginecología y obstetricia del Hospital Regional "1° de Octubre", se atienden en promedio 400 (s = 150) pacientes grávidas, de las cuales el 15% son preeclámpticas y más del 70% son pacientes con embarazos normoevolutivos y normotensos.

Fisiología placentaria en la preeclampsia

La patofisiología de la preeclampsia aún no ha sido dilucidado, pero se piensa que tiene un origen multifactorial, ciertamente es la placenta la que juega un papel primordial en su patogénesis ^[8-10], se ha postulado que la preeclampsia se desarrolla como consecuencia de una mala adaptación del sistema inmune entre la madre y el feto, durante las primeras semanas del embarazo, cuando el trofoblasto intravascular no reemplaza a las células endoteliales de las arterias espirales a nivel de la capa media, sin

que se logre la destrucción de la capa media elástica muscular y nerviosa, generándose de esta forma un sistema arteriolar de alta resistencia con preservación del control vasomotor, permitiendo la progresión de la patología, durante la fase de respuesta asintomática, estableciéndose una irrigación deficiente hacia la placenta dando origen a periodos alternantes de hipoxia y reoxigenación que inducen estrés oxidativo, lo que incrementan la necrosis y apoptosis de las células placentarias ^[11, 12], las consecuencias clínicas se hacen presentes durante el segundo estadio, posterior a las 12 SDG (segunda oleada del trofoblasto) en la que participa el VEGF con fracaso de la migración intravascular del trofoblasto, condicionando acumulo de material fibrinoide e invasión de macrófagos en la decidua, por lo tanto, el sistema inmune y vascular no pueden manejar el gran desbridamiento natural de la placenta, en la que se induce la expresión de factores pro inflamatorios, anti-angiogénicos y angiogénicos, que conllevan a la disfunción del endotelio vascular y a una exagerada repuesta inflamatoria ^[1, 13, 14].

Factores tróficos

Los genes miembros de la superfamilia del TGF- β incluyen la activina y algunos factores tróficos que participan en eventos críticos en modelos animales, así como en humanos ^[15-17], sin embargo no existe información disponible de la expresión de los miembros de la superfamilia de genes del TGF. Estudios realizados con microarreglos sugieren que la activina, (Inhibina β A) participa en la remodelación del endometrio ^[16], esta se expresa en diferentes isoformas denominadas β A y β A (homodímeros), β A y β B (heterodímeros), y β B y β B (homodímeros), los cuales han sido nombrados como activina A (INH β A), activina AB (INH β AB), y activina B (INH β B), respectivamente.

Ambas subunidades βA y βB pueden combinarse con la subunidad α generando las isoformas $\alpha\beta A$ y $\alpha\beta B$ de la inhibina ^[18]. En humanos, la activina induce la formación de la decidua y la invasión celular al endometrio ^[19,20], uno de los objetivos de este trabajo es determinar si en las placentas de pacientes preeclámplicas existe alteración en la expresión de los genes miembros de la superfamilia del TGF- β

Factores Neurotróficos y sus Receptores

Muchos de los factores neurotróficos, dentro de los que se incluyen a el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento trobroblastico básico (bFGF) y el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1), activan receptores que poseen actividad tirosincinasa intrínseca ^[21, 22].

La activación de los receptores TRK requieren de la unión de 4 moléculas al receptor, lo que induce su dimerización y trans-autofosforilación de los residuos de tirosina en el dominio intracitoplasmático del receptor, para formar un complejo trimérico de señalización. Las principales vías de señalización activadas por los factores tróficos incluyen al 3 fosfato de inositol, la vía de Akt, PKC y de la vía de las proteínas activadoras de mitogénesis ^[23]. Estas vías de cinasas activa uno o más factores de transcripción dentro de los que se incluyen AP1, NF- κB y FOXOs, algunos de estos genes inducidos por los factores neurotróficos incluidos los que codifican para proteínas antiapoptóticas, enzimas antioxidantes y algunas proteínas involucradas en el metabolismo y en el equilibrio iónico, como por ejemplo el bFGF regula la expresión de los receptores NMDA y AMPA lo cual modifica la sensibilidad y reactividad ante el

glutamato ^[24, 25], los factores neurotróficos ejercen efecto local, por ejemplo el BDNF incrementa el influjo de Ca^{2+} ^[26], el bFGF y el NGF actúan directamente en las terminales sináptica estabilizando la función mitocondrial ^[27].

Los niveles de varios factores neurotróficos incrementan en respuesta a la epilepsia dentro de estos se encuentran el NGF, BDNF, bFGF, CNTF, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y TNF α ^[28]. Se ha demostrado que el BDNF ^[29, 30], TGF- β ^[31], factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) ^[32] y el TNF ^[33] juegan un papel importante en la protección de las neuronas contra las convulsiones y el daño cerebral, debido a que el grado máximo de la preeclampsia es la eclampsia y una de sus principales manifestaciones clínicas son las convulsiones en la madre, sin embargo el cerebro inmaduro del feto se encuentra protegido, y rara vez se presentan alteraciones neurológicas en los niños de madres eclámpticas, por lo que es lógico pensar que esta protección proviene de fuentes externas al SNC, habiendo la posibilidad de que estos factores neurotróficos neuroprotectores sean aportados por la placenta.

PREMISAS

Premisa 1

Si en la preeclampsia existe un aumento de la resistencia vascular periférica, deberá de haber factores vasoactivos circulantes provenientes de la placenta.

Premisa 2

Si durante la preeclampsia se producen micro infartos placentarios secundarios a la hipertensión arterial, entonces la placenta deberá de responder ante el insulto hipóxico isquémico aumentando la expresión y liberación de factores tróficos, neurotróficos y desregulando la expresión de sus receptores de membrana.

Premisa 3

Si después de un proceso hipóxico-isquémico placentario se requiere de la remodelación del tejido placentario, entonces deberá de inducirse expresión y liberación local de factores tróficos placentarios.

Premisa 4

Si al evolucionar la preeclampsia a eclampsia se presentan crisis convulsivas en la paciente gestante, debido a la encefalopatía hipertensivas y hepática características de la patología, entonces la placenta será la fuente de los factores neurotróficos necesarios para la neuroprotección observada en el cerebro fetal.

Hipótesis

Primera Hipótesis

La placenta de pacientes preeclámpticas incrementa la expresión de factores tróficos y neurotróficos en respuesta a los microinfartos ocasionados durante la preeclampsia.

Segunda Hipótesis

La placenta es la fuente de los factores tróficos requeridos para mantener funcional la interfase placenta-miometrio en pacientes preeclámpticas.

Tercera Hipótesis

La neuroprotección observada en hijos de pacientes preeclámpticas radica en la expresión de factores neurotróficos placentarios.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión placentaria de los factores tróficos, neurotróficos y sus receptores para establecerlos como marcadores pronósticos del desarrollo de preeclampsia.

Objetivo general

Determinar la correlación de la expresión placentaria de los factores tróficos, neurotróficos y sus receptores con el desarrollo de preeclampsia.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles basales de expresión de factores tróficos, neurotróficos y sus receptores en placentas obtenidas de pacientes con embarazos normoevolutivos.
2. Determinar los niveles de expresión de factores tróficos, neurotróficos y sus receptores en placentas obtenidas de pacientes con embarazos preeclámpticos.
3. Correlacionar los cambios en la expresión placentaria de factores tróficos, neurotróficos y sus receptores con el desarrollo de preeclampsia

Justificación

Las enfermedades hipertensivas del embarazo requieren de especial atención, ya que representan un grave problema de salud pública. Actualmente se sabe que la preeclampsia y la eclampsia representan la tercera causa de mortalidad materna a nivel mundial, y la segunda en México, la incidencia de preeclampsia en México es de 47.3 por cada 1000 nacimientos, las complicaciones perinatales más comunes de la preeclampsia son: restricción del crecimiento intrauterino (48 %) y sufrimiento fetal agudo (8.6 %), mientras que el 3.75% de las pacientes evolucionan a eclampsia, con una mortalidad materna del 29 %.

Los eventos fisiopatológicos que origina la preeclampsia continúan sin haber sido dilucidados por completo. Existen reportes en los que se menciona que los factores de crecimiento angiogénicos y antiangiogénicos como: VEGF, EGN, sFtl-1, PIGF, por mencionar algunos, se encuentran alterados en el desarrollo de la placenta en pacientes preeclámpicas, induciendo migración trofoblástica deficiente. Sin embargo, no se cuenta con ningún estudio que demuestre la expresión de los genes de la superfamilia TGF, factores neurotróficos y de los receptores TRK's y mucho menos su correlación con el desarrollo de la preeclampsia, por otra parte se ha reportado que varios factores neurotróficos (NGF, bFGF, CNTF, TGF, TNF- α), juegan un papel importante en la protección neuronal contra convulsiones y daño cerebral, sin embargo a pesar de que la madre preeclámpica puede evolucionar a eclampsia y presentar convulsiones, el cerebro del feto raramente presenta complicaciones neurológicas, lo que nos hace pensar que esta neuroprotección proviene de fuentes externas al SNC, habiendo la posibilidad de que estos factores neurotróficos sean aportados por la placenta.

En la actualidad, el mejor tratamiento para la preeclampsia está en discusión, debido a que cada paciente representa un reto por si misma, ya que el tratamiento dependerá de la edad gestacional y del desarrollo fetal. Teniendo en cuenta la fisiopatología de la preeclampsia, el mejor tratamiento sigue siendo la culminación del embarazo, lo cual evita la progresión de la preeclampsia a eclampsia y previene la aparición de crisis convulsivas. Sin embargo en múltiples pacientes la culminación de la gestación trae consigo alto riesgo para el feto inmaduro.

Por lo que se hace necesario investigar la expresión de factores tróficos y neurotróficos así como de sus receptores, como posibles marcadores moleculares pronósticos y predictores de la evolución de una paciente gestante y determinar su propensión a desarrollar preeclampsia, con la finalidad de instaurar un plan de tratamiento temprano tratando de evitar o retardar la aparición de la preeclampsia y de esta forma disminuir los riesgos de muerte materna, fetal y las erogaciones que los institutos de salud efectúan en el tratamiento de esta patología.

Material y Métodos

Tipo de estudio

Se realizó un estudio de expresión génica de casos y controles, de una sola cohorte.

Selección de la muestra

Se realizó un muestreo dirigido, simple con reemplazo.

Tamaño de la muestra

Debido a que se trata de un estudio en el que se determinaran los cambios en la transcripción de RNA mensajero de los factores tróficos, neurotróficos y sus receptores en tejido placentario el cálculo del tamaño muestral no aplica, tomando en cuenta que este tipo de ensayos requiere de una n de 3-5 muestras se decidió estudiar 6 muestras para cada subgrupo con fines de estadística no paramétrica.

Pacientes

Se estudiaron en total 12 placentas de pacientes gestantes de termino, que hayan desarrollado embarazos normoevolutivos o preeclámpicos, todas mayores de 18 años y menores de 40 años de edad, y que cumplan con los criterios internacionales clínicos y

bioquímicos de preeclampsia, y que hayan aceptado firmar el consentimiento genético e informado, se conformaron 2 grupos de estudio, el primero lo integraron 6 muestras de placentas provenientes de embarazos normoevolutivos, obtenidas por cesárea, mientras que el segundo grupo fue integrado por 6 muestras de placentas provenientes de pacientes con embarazos preeclámpticos y obtenidas por cesárea.

Criterios de inclusión

1. Placentas provenientes de mujeres entre los 18 y 40 años.
2. Placentas de pacientes con historial de cifras tensionales normales previas al embarazo.
3. Placentas de pacientes primigestas o multigestas con embarazo de 20 o más SDG.
4. Placentas de pacientes con diagnóstico de preeclampsia bajo los siguientes criterios clínicos:
 - $TA \geq 160/110$ mmHg en 2 tomas con diferencia de 6 hrs entre ambas tomas
 - $TAM \geq 116$ mmHg
 - Edema de miembros inferiores
 - Reflejos osteotendinosos aumentados
 - Chaussier positivo
 - Datos de vasoespasmo presentes (Cefalalgía, Acúfenos, Fosfenos, Náusea y vómito)
 - Uresis \leq a 18 mL/h, o $<$ de 500 ml/24 h
5. Placentas provenientes de pacientes con diagnóstico de preeclampsia severa bajo los siguientes criterios de laboratorio:
 - Proteinuria 2 gr en orina de 24 h, o tira reactiva positiva (+++) en 2 muestras tomadas al azar

- Creatinina sérica \geq a 1.2 mg/dL.
- Hb \geq 14 mg/dL.
- Hto \geq 42%
- Plaquetas \leq 150,000 plaq/mm³
- TP \leq 65%
- TTP \leq 50 seg.
- Glicemia \geq 110 mg/dL.
- AST \geq 25 UI
- ALT \geq 35 UI
- DHL \geq 250 UI
- BT \geq 1.4 mg/dL.
- Proteínas séricas totales \geq 5 gr/dL.
- Fibrinógeno \leq 100 mg/dL.

Criterios de no Inclusión

- Placentas de pacientes preeclámplicas con enfermedad concomitante
- Placentas de pacientes preeclámplicas con antecedentes previos de hipertensión arterial sistémica
- Placentas de pacientes preeclámplicas con placenta previa
- Placentas de pacientes preeclámplicas con antecedentes de drogadicción durante la gestación.

Criterios de Eliminación

- Pacientes que voluntariamente decidan que sus placentas no continúen el estudio

Muestras Biológicas

Se utilizó tejido placentario (Figura 2) recolectado de 3 formas diferentes, en TriZol para la extracción de RNA mensajero, en Paraformaldehído al 4% para el tejido que será embebido en parafina y sometido a técnicas de inmunohistoquímica y una tercera muestra más en buffer de lisis para la extracción de proteínas que serán utilizadas en el Western Blot, una vez obtenidas las muestras serán almacenadas a 4 °C, utilizando placas de crioconservación en gel y como contenedores recipientes de unicel herméticos para su traslado al Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital Regional "1° de Octubre", las muestras que no sean utilizadas inmediatamente se crioconservaron a -90 °C hasta el momento de la extracción del RNA.

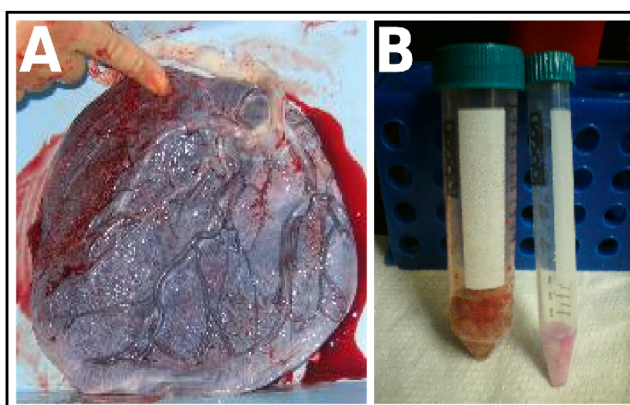


Figura 2: Placenta completa y crioconservación. A) Imagen representativa de las placentas obtenidas de pacientes preeclámpticas y controles con embarazo normo evolutivo, B) Imagen representativa de muestras de placenta crioconceivadas en trizol a -80 °C.

Extracción de proteínas

Una sección congelada en hielo seco o nitrógeno líquido fue homogenizada en un politrón (ULTRA TURRAX T25, IKA Works, NC, USA) y centrifugada a 44,000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue almacenado a -30 °C hasta su utilización en la determinación de los factores tróficos y neurotróficos, el pellet celular fue resuspendido en 100 µl de PBS 1X, y almacenado a -80 °C, hasta la determinación de los receptores TRK's (A, B y C).

Determinación de proteínas

El contenido de proteínas fue cuantificado mediante el microensayo de ácido bicinónico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA) utilizando seroalbúmina bovina como estándar y cuantificados mediante espectrofotometría digital de substracción en un equipo ND-1000, las lecturas fueron realizadas a 320 nm de longitud de onda, utilizando la absorvancia para el cálculo de la concentración proteica.

Análisis de Western Blot

El análisis de expresión de los factores tróficos y neurotróficos se realizó mediante la técnica de western blot, se analizaron 50 µg de proteínas totales para cada una de las muestras. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4%, glicerol 20 %, etanol 10 %) con 1% β-mercaptoetanol. Los geles se corrieron a 150 Volts y 400 mAmpers, en cajas de crioconservación, utilizando hielo para mantener la temperatura del buffer al rededor de los 21 °C, para determinar el peso molecular de las proteínas de interés se

utilizó un marcador de peso molecular en el rango de 10 a 250 KDa. Al final de la corrida electroforética, las bandas de proteínas fueron evidenciadas mediante tinción con azul de Coomassie. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF de 0.2 μm (BioRad Laboratories) a 140 mAmpereios por 1 hora. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron IgG monoclonal Anti-factores tróficos y neurotróficos hecho en ratón a una dilución 1:500, los anticuerpos secundarios se eligieron de acorde al anticuerpo primario de tipo IgG policlonal o monoclonal ambos conjugados con peroxidasa. Los sitios de unión inespecíficos de la membrana de PVDF fueron bloqueados con leche descremada (Svelty) al 5% en TBS durante una hora. Se agregaron los anticuerpos para la inmunoidentificación de las proteínas de interés, y se realiza en la misma membrana de manera secuencial en el siguiente orden. Primero, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario disuelto en PBS durante una noche, a 4°C y posteriormente las membranas fueron lavadas en 5 veces con TBS. Enseguida, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario específico durante 1 hora a temperatura ambiente. Inmediatamente después las membranas fueron lavadas 5 veces con TBS y la reacción de quimioluminiscencia se indujo empleando ECL-plus (Perkin Elmer) e incubando durante 1 minuto. Las membranas fueron expuestas durante 1 minuto sobre un filme de rayos X de la marca Kodak, para revelar la presencia de las bandas de las proteínas de interés.

Después del revelado, la imagen fue digitalizada mediante un fotodocumentador GelLogistic 3000 con una resolución de 600 dpi, para su análisis densitométrico, las membranas de PVDF fueron sometidas a un proceso de *stripping* utilizando la solución removedora (TRIS-HCl 63.5 mM, pH 6.8, β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 3 %)

durante 30 minutos a 55°C. Después de lavar las membranas con TBS en 5 ocasiones por 10 minutos, se repitió el proceso de inmunodetección de manera sucesiva con otros dos anticuerpos, para los factores tróficos, neurotróficos y/o los receptores TRK, en los que se demostró un cambio en la transcripción.

Extracción del ARN total

500 mg de tejido placentario de pacientes normotensas y preeclámpticas, fueron sometidos a disgregación mecánica bajo congelación con hielo seco, hasta obtener un polvo fino, posterior mente la muestra fue tratada con 5 ml de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y homogenizada mediante pipeteo continuo, se separaron alícuotas de 1 ml de cada muestra, estas fueron sometidas a separación de fase acuosa mediante la adición de 200 µL de cloroformo previamente enfriado a -20 °C, la mezcla en su totalidad fue centrifugada a 12000 RPM a 4 °C durante 15 minutos, una vez centrifugadas la muestras se observó la conformación de las fases orgánica, proteica y orgánica, separando esta última en un nuevo tubo eppendorff de 1.5, posteriormente se le adicionaron 500 µL de 2-propanol (Isopropanol) después las muestras fueron agitadas por inmersión para evidenciar la precipitación de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y centrifugadas a 12000 RPM a 4 °C durante 10 minutos, una vez centrifugadas se procedió a decantar el sobrenadante, teniendo cuidado de mantener el *pellet* en el fondo del tubo, cada una de las muestras correspondientes al mismo tejido fueron suspendidas en 200 µL de etanol y posteriormente se recuperaron en un solo tubo para obtenerse un volumen final de 1 ml el cual fue sometido a agitación mecánica en un vortex (Genius II de General Electric) y se procedió a la centrifugación final a 7500 RPM's a 4 °C durante 5 minutos, una vez centrifugadas se procedió a decantar el sobrenadante,

teniendo cuidado de mantener el *pellet* en el fondo del tubo, los tubos que contenían al ARN total fueron mantenidas en inversión sobre material absorbente y desecante, el interior de los tubos fueron secados mediante papel absorbente, una vez secos los *pellets* fueron resuspendidos en 50 μL de agua grado biología molecular de 18 m Ω , libre de RNasas y DNasas (Figura 3).

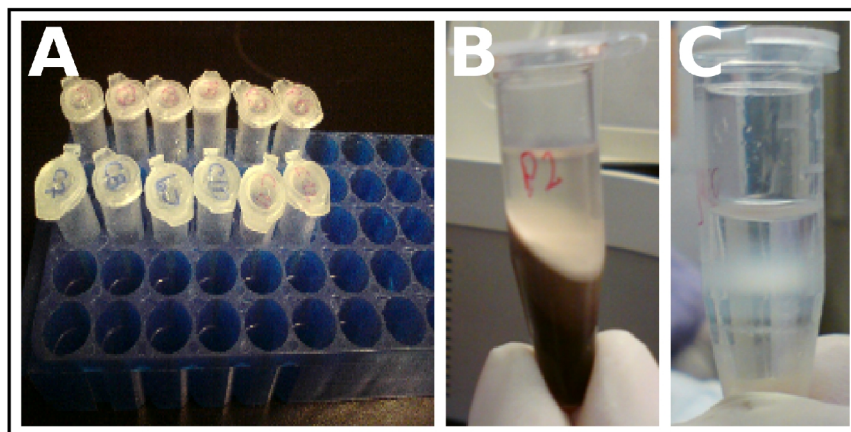


Figura 3: Muestras de placenta de 500 mg en TriZol. A) imagen representativa de las 12 muestras de placenta obtenidas de pacientes preeclámpticas y control, B) Imagen representativa de una muestra observando sus fases, orgánica, proteica, orgánica; C) Imagen representativa de la fase orgánica con isopropanol donde se evidencia la precipitación de los ácidos nucleicos

Cuantificación del ARN total

Para la cuantificación del ARN total se prepararon diluciones seriadas utilizando 1 μL de las muestras (1:10, 1:100 y 1:1000), 2 μL de cada una de las diluciones fueron sometidas a espectrofotometría digital en un equipo ND-8000, utilizando las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 320 nm, con las lecturas de densidad óptica a 260 nm y utilizando un factor de conversión de 40 $\mu\text{g}/\text{DO}$ y tomando en cuenta el factor de dilución se estimó la concentración total de ARN presente en cada muestra, para determinar la cantidad de ARN por μL de muestra se estimó el valor medio de las tres lecturas obtenidas a partir de las muestras diluidas (Figura 4).

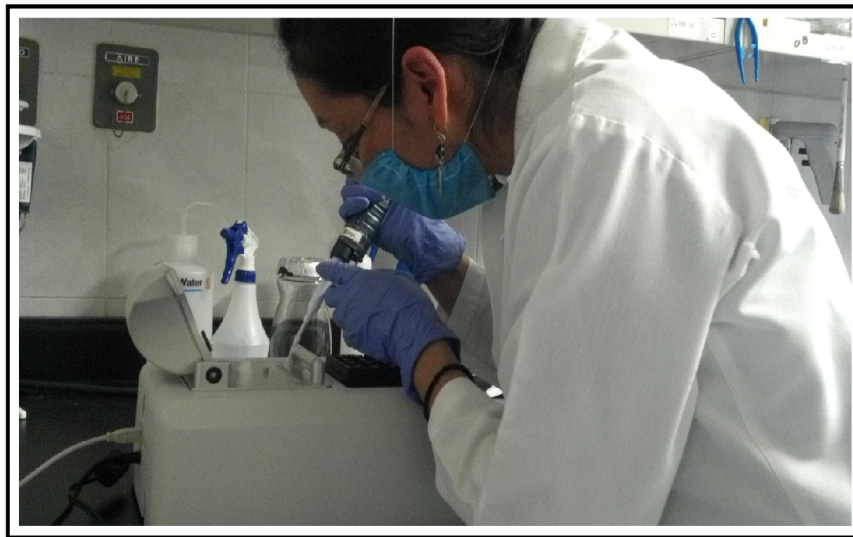


Figura 4: Espectrofotometría.-Imagen representativa de las lecturas de densidad óptica de la concentración total de ARN de las 12 muestras muestras.

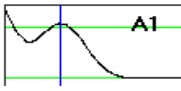
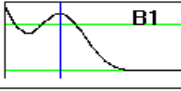
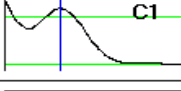
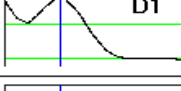
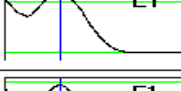
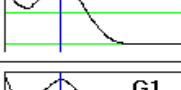
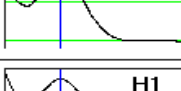
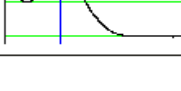
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 5,411	A-260 5,411	ng/ul 216.4
Sample ID	P1		A-280 2,827	260/280 1,91	260/230 1,28	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 6,191	A-260 6,191	ng/ul 247.6
Sample ID	P2		A-280 3,227	260/280 1,92	260/230 1,37	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 5,913	A-260 5,913	ng/ul 236.5
Sample ID	P3		A-280 3,005	260/280 1,97	260/230 1,40	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 8,742	A-260 8,742	ng/ul 349.7
Sample ID	P4		A-280 4,479	260/280 1,95	260/230 1,55	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 11,91	A-260 11,91	ng/ul 476.4
Sample ID	P5		A-280 6,191	260/280 1,92	260/230 1,55	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 9,508	A-260 9,508	ng/ul 380.3
Sample ID	P6		A-280 4,839	260/280 1,96	260/230 1,57	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 7,857	A-260 7,857	ng/ul 314.3
Sample ID	C7		A-280 4,081	260/280 1,93	260/230 1,62	
Active <input type="checkbox"/>	# 1		Sample # 1	nm 1 abs. 4,193	A-260 4,193	ng/ul 167.7
Sample ID	C8		A-280 2,173	260/280 1,93	260/230 1,58	

Figura 5: Espectrofotometría digital.- La figura muestra la densidad óptica obtenida por cada muestra en un barrido de longitudes de onda desde 210 a 350 nm. Todas la muestras fueron cuantificadas usando un espectrofotómetro digital ND-8000.

Electroforesis del ARN en gel de agarosa

Para evaluar la integridad y calidad del ARN total, 8 μL de la dilución 1:10 previamente compactados mediante la adición de 2 μL de buffer de carga (Cyan/Orange G) fueron sometidos a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%, en un campo electromagnético inducido con una diferencia de potencial eléctrico de 70 Volts y 400 mAmperios durante 45 minutos, en una cámara de electroforesis Horizon 58 utilizando un peine de 2.5 mm que genera un poso de 9.625 mm^3 o $\approx 10 \mu\text{L}$.

Fotodocumentación del ARN

Para la visualización de los ácidos nucleicos de las bandas resultantes del proceso de corrimiento electroforético, fueron teñidas mediante una base intercalar (Bromuro de etido) a una concentración final de 400 nM, el gel fue incidido con luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm, lo que permitió evidenciar el patrón de corrimiento electroforético tanto del ADN contaminante, las dos fracciones del ARN ribosomal (28 y 18 S), así como la nube del ARN mensajero, las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica digital con filtros para visualizar LUV (Gel Logistic 3000) de Kodak.

Retrotranscripción

Para la obtención de ADN complementario se retrotranscribieron 5 μg de ARN total, al cual se le adicionó 1 μL de DNasa I grado amplificación a una concentración de

1 U/ μ L y 1 μ L de buffer de reacción 10X para DNasa y se completo el volumen a 10 μ L con agua grado biología molecular, posteriormente cada una de las muestras fue incubada a temperatura ambiente durante 15 min, transcurrido este tiempo se le adiciono 1 μ L de EDTA 25 mM a cada una de las muestras, y posteriormente fueron incubadas a 65 °C durante 15 min, y al termino de este tiempo se inactivó la DNasa mediante choque térmico, colocando las muestras en hielo (4 °C), el volumen total de la reacción es colectado en el fondo del tubo mediante centrifugación (12,000 RPM/10 Segundos), una vez centrifugadas, se procede a la desnaturalización e hibridización del oligonucléotido de politiminas, agregando 1 μ L de oligo dT (0.5 μ g/ μ L), se centrifugaron las muestras brevemente y posteriormente se incubaron a 70 °C por 10 min, al término de este tiempo, se realiza choque térmico incubando las muestras en hielo (4 °C) durante 1 minuto; a cada una de las muestras se les adicionaron 2 μ L de PCR buffer 10X, 1 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de dNTP mix 10 mM, 2 μ L de DTT 0.1 M y 1 μ L de agua DEPC (siempre respetando el orden de la lista), posteriormente fueron mezcladas suavemente, y fueron incubadas a 42 °C durante 5 min, posteriormetne se les adicionó a cada tubo 1 μ L de la enzima SuperScript II RT (Retrotranscriptasa), se mezclaron e incubaron a 55 °C durante 50 min, la reacción fue terminada a 70 °C durante 15 min, colocando posteriormente las 12 muestras en hielo. Para llevar a cabo la remodelación del ARN mediante la adición de 1 μ L de RNasa H a cada uno de los tubos, y se incubaron a 37 °C por 20 min todo el procedimiento se realizó en un termociclador 7900 Gold (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA), las muestras ADN complementario fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Evaluación de la transcripción

La transcripción de los diferentes factores tróficos miembros de la familia del TGF- β (TGFB1, TGFB2, TGFB3), AMH, GDF2 (BMP9), GDF3 (Vgr-2), GDF5 (CDMP-1), GDF6, GDF7, IGF1, IGFBP3, IL6, INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA), LEFTY1, LTBP1, LTBP2, LTBP4, NODAL, PDGFB, INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA), INHBB (inhibin BB), LEFTY1, NODAL, ACVR1 (ALK2), ACVR2A, ACVRL1 (ALK1), AMHR2, BMPR1A (ALK3), BMPR1B (ALK6), BMPR2, ITGB5 (integrin B5) ITGB7 (integrin B7), LTBP1, NR0B1, STAT1, TGFB1I1, TGFBR1, (ALK5) TGFBR2, TGFBR3, TGFBRAP1, SMAD1 (MADH1), SMAD2 (MADH2), SMAD3 (MADH3), SMAD4 (MADH4), SMAD5 (MADH5), CDC25A, CDKN1A (p21WAF1/p21CIP1), CDKN2B (p15LNK2B), COL1A1, COL1A2, COL3A1, FOS, GSC (gooseoid), IGF1, IGFBP3, IL6, ITGB5 (integrin B5), ITGB7 (integrin B7), JUN, JUNB, MYC, PDGFB, SERPINE 1 (PAI-1), TGFB1I1, TSC22D1 (TGFB1I4), TGFBI, TGIF1. BGLAP (osteocalcin), DLX2, ID1, ID2, JUNB, SOX4, STAT1, BAMBI, BMPER, CDKN2B (p15LNK2B), CER1 (cerberus), CHRD (chordin), CST3, ENG (Evi-1), EVI1, FKBP1B, FST (follistatin), HIPK2, NBL1 (DAN), NOG, PLAU (uPA), RUNX1 (AML1), SMURF1, BGLAP (osteocalcin), ENG (Evi-1), ITGB5 (integrin B5), ITGB7 (integrin B7), TGFB1I1, TGFBI, BGLAP (osteocalcin), COL1A1, COL1A2, COL3A1, LTBP1, LTBP2, LTBP4, TGFBI, AMH, BMP1, BMP2, FST (follistatin), GDF2 (BMP9), GDF3 (Vgr-2), IGF1, IGFBP3, IL6, INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA), INHBB (inhibin BB), PDGFB, PLAU (uPA), SERPINE1, DLX2, EVI1, FOS, GSC (gooseoid), HIPK2, ID1, JUN, JUNB, MYC, NR0B1, RUNX1 (AML1), SMAD1 (MADH1), SMAD2 (MADH2), SMAD3 (MADH3), SMAD4 (MADH4), SMAD5 (MADH5), SOX4, STAT1, TGFB1I1, TSC22D1 (TGFB1I4), TGIF1, CDKN1A (p21WAF1/p21CIP1), HIPK2, IGFBP3, INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA),

STAT1, TGFB1, BMP4, INHBA (inhibin BA), SMAD3, SMURF1, IGF1, SMAD3, DLX2, INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA), NOG., AMH, AMHR2, FST (follistatin), INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA), INHBB (inhibin BB), NR0B1, BGLAP (osteocalcin), BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMPR2, CHRD (chordin), COL1A1, COL1A2, IGF1, INHA (inhibin a), INHBA (inhibin BA), NOG, mientras que los miembros de la familia de los factores neurotróficos, con acción angiogénica (ARTS-1, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FGF6, FIGF, IL18, JAG1, PGF, TNNT1, VEGFA, VEGFC), reguladores de la apoptosis (CLC, GDNF, IL10, IL1A, IL1B, IL2, NRG2, NTF3, SPP1, TDGF1, TGFB1, VEGFA), de diferenciación celular (ARTS-1, BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8B, CSF1, CSPG5, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FGF22, FGF23, FGF6, FGF9, FIGF, IL10, IL11, IL12B, IL2, IL4, INHA, INHBA, INHBB, JAG1, JAG2, LTBP4, MDK, NRG1, OSGIN1 (OKL38), PGF, SLCO1A2, SPP1, TDGF1, TNNT1, VEGFC), controladores del desarrollo embrionario (BMP10, NRG1, NRG2, NRG3, TDGF1) desarrollo del sistema nervioso (BDNF, CSPG5, CXCL1, FGF11, FGF13, FGF14, FGF17, FGF19, FGF2, FGF5, GDF11, GDNF, GPI, IL3, INHA, INHBA, JAG1, MDK, NDP, NRG1, NRTN, NTF3, PTN, VEGFA) desarrollo del SNC (PDGFC, PSPN), desarrollo muscular (FGF2, GDF8, HBEGF, IGF1, TNNT1), desarrollo esquelético (GDF10, GDF11, IGF1, IGF2, INHA, INHBA), desarrollo cartilaginoso (BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8B), crecimiento (INHA, INHBA, INHBB, AMH, CECR1, CSF2, CSF3, DKK1, FGF7, LEFTY1, LEFTY2, LIF, LTBP4, NGFB, NODAL, TGFB1, THPO) todo este conjunto de genes fueron evaluados mediante arreglos de qPCR con detección a través de RT2 SYBR Green/Fluoresceína PCR master mix en una placa comercial de 96 posos (Growth Factor PCR Array, SABiosciences, [\[PAHS-041\]](#) ó

TGF- β BMP Signaling PCR Array, SABiosciences, [PAHS-035]) la cual contenía los oligonucleótidos requeridos para cada uno de los genes identificados, las condiciones de termociclado utilizadas fueron: incubación de la muestra a 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos de (95°C durante 15 seg., 60°C por 1 min), el valor de CT de cada una de las muestras indica la expresión del gen amplificado, al comparar el valor de CT de las muestras de placentas de pacientes preeclámpticas contra el valor de CT de las muestras de placentas de pacientes normotensas, todas las reacciones de detección qPCR se realizaron en placas de 96 posos y se amplificó en un equipo ABI PRISM 7900 sequence analyzer system, los resultados fueron analizados en el programa SDS V2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Inmunohistoquímica

El tejido placentario fresco será fijado en paraformaldehído al 4 %, una vez fijado se procederá a crioprotegerlo mediante incubaciones seriadas con sacarosa al 5, 10 y 20 %, posteriormente se realizarán cortes de 35 μ m, utilizando un criostato (Leica) las muestras serán colocadas en placas de 6 posos para su bloqueo con albumina sérica bobina al 2.5 %, estas serán incubadas con los anticuerpos primarios de los factores tróficos, neurotróficos y de sus receptores que se encuentren alterados en los análisis de qPCR, la incubación será durante 1 hora, posteriormente se lavarán 3 veces, finalmente se incubarán con un anticuerpo secundario biotilado, y revelado con estreptovidina peroxidasa, y lavados 3 veces para evidenciar la marca con el cromógeno DAB, los tejidos serán analizados en un microscopio de epifluorescencia invertido (Leica) en el cual serán digitalizadas y analizados con el software Image Pro-plus v 6.0.

Unidades de medida

En el presente estudio se determinaran los cambios en la transcripción de los factores tróficos, neurotróficos y sus receptores TRK's, siendo el cambio en la transcripción de cada uno de los genes miembros de la superfamilia de proteínas del TGF, los cambios en la transcripción se medirán mediante la ecuación:

$$\Delta T = \frac{CT_{genpreeclampsia}}{C_{housekeepinggenpreeclampsia}} - \frac{CT_{gencontrol}}{C_{housekeepinggencontrol}}$$

En donde:

CT.- Es el número de ciclo en la PCR de tiempo real en donde se dispara la fase exponencial en la síntesis de DNA de doble cadena.

ΔT.- Es el cambio en la transcripción del gen en la paciente preecláptica, connotación funcional:

- ❖ Valor positivo: indica que el gene que se está evaluando se encuentra sobreexpresado
- ❖ Valor negativo: indica que el gen que se está evaluando se encuentra reprimido

Los valores se expresaran como ΔT en número de veces que el gen evaluado se encuentre sobreexpresado o reprimido en las muestras de las placentas de pacientes preeclápticas en comparación con la expresión del gen en las muestras de placentas provenientes de pacientes controles normotensas.

Análisis estadístico

Los datos de expresión de los factores tróficos, neurotróficos y sus receptores obtenidos por microarreglos de qPCR, se analizarán con el Software R (GNU open source) mediante la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett's, se considerará un valor de $P < 0.05$ como diferencia estadísticamente diferente.

Resultados

Se estudiaron 12 pacientes divididas en dos grupos: el primer grupo formado por 6 pacientes con preeclampsia (clasificadas según los criterios internacionales de severidad para la misma) y el segundo grupo fue integrado por 6 pacientes con embarazo normoevolutivo, todas las pacientes firmaron el consentimiento informado previo a la toma de las muestras de placenta, dicho consentimiento fue aceptado por el comité de ética del Hospital Regional “1° Octubre” bajo el protocolo registrado con el No. 109.2012 y titulado **“Expresión de factores tróficos, neurotróficos y sus receptores TRK's en placentas de pacientes preeclámpticas”**, la edad promedio del grupo de preeclampsia fue de 28.1 años, de menor edad comparado con el grupo control donde la edad promedio fue de 31 años, según la somatometría: el peso promedio previo al embarazo en el grupo de preeclampsia fue de 60.3 Kg , y para el grupo control fue de 64.5 kg , con un peso al final del embarazo de 69.3 Kg para el grupo de preeclampsia y de 78.7 Kg para el grupo control, la talla promedio del grupo de preeclampsia fue de 1.57 mts. y para el grupo control de 1.62 mts con un IMC promedio para el grupo de preeclampsia de 28.5 Kg/m² , y de 30.1 Kg/m² para el grupo control, con un incremento ponderal promedio de 9.3 Kg para el grupo de preeclampsia y 14.2 Kg para el grupo control; con respecto a la medición de la presión arterial, el promedio de la TAS para el grupo de preeclampsia fue de 155 mmHg con una máxima de 170 mmHg y una mínima de 140 mmHg, comparado con el grupo control donde la TAS promedio fue de 108.3 mmHg, con una máxima de 110 mmHg y una mínima de 100 mmHg, para la TAD el promedio fue de 102.6 mmHg para el grupo de preeclampsia con una máxima de 110 mmHg y una mínima de 90 mmHg, comparado

con el grupo control donde la presión TAD fue de 68.3 mmHg, con una máxima de 70 mmHg y una mínima de 60 mmHg. La presión arterial media del grupo de pacientes con preeclampsia fue de 120.1 mmHg, y para el grupo de pacientes control fue de 81.6 mmHg, (Cuadro 2).

Según los datos clínicos reportados por las pacientes el síntoma más común en el grupo de preeclampsia fue la epigastrálgia 3/6 y 3 pacientes mas se refirieron asintomáticas.

Con respecto a los antecedentes obstétricos se observó que el promedio de gestas para el grupo de preeclampsia fue de 1 y para el grupo control de 2, en este ultimo una paciente con 3 gestas y una con 4 gestas, en ninguna de las 12 pacientes se reporto diabetes mellitus tipo 2 o Diabetes gestacional, ni preeclampsia en el embarazo previo (en pacientes con más de 1 gesta), a ambos grupos de pacientes se les dio atención obstétrica vía abdominal mediante cesárea de tipo Kerr, esta fue realizada bajo anestesia regional, sin que se presentaran complicaciones durante el acto quirúrgico y anestésico, 3 de las 6 pacientes del grupo de preeclampsia reportaron primipaternidad y 2 del grupo control también, la edad gestacional promedio que presentaron los neonatos de las pacientes preeclámpticas fue de 34.5 SDG , comparado con el grupo control donde el promedio fue de 38.6 SDG, el peso promedio de los recién nacidos (RN) en el grupo de preeclampsia fue de 1873.3 grs. comparado con grupo control cuyo peso promedio fue de 3220 grs., la valoración de APGAR para el grupo de preeclampsia al minuto en promedio fue de 6 y a los 5 minutos de 7, para el grupo control al minuto fue de 7 a 8 y a los 5 minutos de 8 a 9, el sexo de los recién nacidos 4 femeninos/2 masculinos para el grupo de preeclampsia y 3 femeninos/3 masculinos para el grupo control.

Para el grupo de preeclampsia las placentas tenían las siguientes características macroscópicas: pequeñas, calcificadas, sin edema, pero si con zonas de infarto, con un peso promedio de 458.3 grs, las cuales fueron de fácil extracción completas, mientras que en el grupo control, las placentas fueron de medianas a grandes, con calcificaciones moderadas, sin edema, ni zonas de infarto, con peso promedio de 625 gr.; de extracción fácil, completas; ninguna de las 12 placentas mostró tinte meconial ni zonas de desprendimiento. Los datos generales y sus desviaciones estándar verlas en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Características sociodemográficas. - Datos obtenidos de la población atendida en el Hospital Regional "1°ero de Octubre" de Enero 2011 a Enero 2012.

Variable	Preeclampsia (n=6)	Control (n=6)
Edad (años)	28.1 (s = 3.1)	31 (s = 4.4)
Gestas	1	2
Peso previo al embarazo (Kg)	60.3 (s = 7.2)	64.5 (s = 4.9)
Peso al final del embarazo (Kg)	69.5 (s = 6.9)	78.6 (s = 6.6)
Talla (mts.)	1.56 (s = 0.05)	1.61(s = 0.05)
IMC (Kg/m ²)	28.5 (s = 2.2)	30.0 (s = 2.0)
iIncremento ponderal (Kg)	9.2 (s = 2.8)	14.1 (s = 4.0)
Presión sistólica promedio (mmHg)	155 (s = 10.5)	108.3 (s = 4.0)
Presión diastólica promedio (mmHg)	102.6 (s =7.6)	68.3 (s = 4.0)
TAM promedio (mmHg)	120.0 (s = 8.1)	81.6 (s = 2.7)
Primipaternidad	3/6	2/6
Semanas de gestación al nacimiento	34.4 (s = 3.7)	38.6 (s = 0.8)
Peso del recién nacido (gr)	1873.3 (s = 901.5)	3220 (s = 242.4)
APGAR al minuto	6 (s = 3.2)	7 (s = 3.4)
APGAR a los 5 min.	7 (s = 0.05)	8 (s = 0.05)
Peso de la placenta (gr.)	458.3 (s = 185.5)	625 (s = 133.2)

Las características bioquímicas de las pacientes estudiadas se describen en Cuadro 3 , con valores promedio para cada uno de ellos, Hb 14,8 mg/dl comparado con la Hb de pacientes con embarazo normal que fue de 13.3 mg/dl , el Hto fue de 43.1% y 41.4% para el grupo de preeclampsia y embarazo normoevolutivo respectivamente, la

cuenta leucocitaria fue de 11.5×10^3 leuc/mm³ en el grupo de preeclampsia y 8.4×10^3 leuc/mm³ para el grupo control, el promedio de plaquetas en el grupo de preeclampsia fue de 67,200 plaq/mm³ y en embarazo normoevolutivo de 189,333 plaq/mm³; AST promedio en el grupo de preeclampsia fue de 155 UI/L, ALT promedio fue de 166 UI/L y para el grupo control fueron de 19 UI/L y 23 UI/L respectivamente, la DHL en el grupo de preeclampsia fue de 439 UI/L y para el grupo control de 168 UI/L, el Mg⁺² sérico promedio en el grupo de preeclampsia fue de 2.2 mM, en el grupo control de 2.3 mM, Calcio sérico fue de 7.4 mEq/L en pacientes con preeclampsia y 8.7 mEq/L en pacientes con embarazo normal, la glucosa sérica fue de 115.6 mg/dL en el grupo de preeclampsia y 79.83 mg/dL, en el grupo control, Creatinina 0.93 mg/dL en el grupo de preeclampsia y 0.61mg/dL en el grupo control, Bilirrubina total 0.7 mg/dL en el grupo de preeclampsia y 0.4 mg/dL en el grupo control, Bilirrubina indirecta 0.6 mg/dL en el grupo de preeclampsia y 0.3 mg/dL en el grupo control, Bilirrubina directa 0.2 mg/dL en el grupo de preeclampsia y 0.1 mg/dL en el grupo control, proteínas totales de 5.53 g/dL en el grupo de preeclampsia y 6.35 g/dL en el grupo control, albúmina 2.2 g/dL en el grupo de preeclampsia y 2.7 g/dL en el grupo control , TP 12 seg en el grupo de preeclampsia y 11 seg en el grupo control, TTP 30 seg en el grupo de preeclampsia y 39 seg en el grupo control, fibrinógeno 388.5 mg/dL en el grupo de preeclampsia y 424.16 mg/dL en el grupo control, proteinuria 455 mg/mL para pacientes con preeclampsia y 0 mg/mL en el grupo control.

Cuadro 3: Características bioquímicas.- Perfil Bioquímico tomado a las pacientes a su ingreso.

Parámetro	Preeclampsia (n=6)	Controles (n=6)
Hb (mg/dL).	14.38 (s = 0.96)	13.3 (s = 0.7)
Hto (%)	43.1 (s = 3.3)	41.3 (s = 3.8)
Leucocitos (leuc/mm ³)	11.5 x10 ³ (s = 2.3)	8.4 x10 ³ (s = 2.6)
Plaquetas (plaq/mm ³)	56x10 ³ (s = 56x10 ³)	189.3x10 ³ (s = 59.9x10 ³)
AST (UI/L)	155 (s = 138.2)	19 (s = 4.2)
ALT (UI/L)	165.8 (s = 100.8)	23 (s = 6.9)
DHL (UI/L)	438.6 (s = 225.3)	167.6 (s = 42.7)
Mg sérico (mM)	2.1 (s = 0.59)	2.3 (s = 0.24)
Ca sérico (mEq/L)	7.3 (s = 0.77)	8.7 (s = 0.89)
Glucosa (mg/dL)	113.1 (s = 26.4)	79.8 (s = 10.1)
Creatinina (mg/dL)	0.9 (s = 0.2)	0.61 (s = 0.1)
BT (mg/dL)	0.6 (s = 0.6)	0.4 (s = 0.2)
BI (mg/dL)	0.6 (s = 0.4)	0.3 (s = 0.2)
BD (mg/dL)	0.19 (s = 0.2)	0.09 (s = 0.04)
Proteínas totales (g/dL)	5.53 (s = 0.8)	6.35 (s = 0.3)
Albumina (g/dL)	2.2 (s = 0.2)	2.7 (s = 0.3)
TP (seg.)	11.8 (s = 1.0)	11.3 (s = 0.89)
TTP (seg.)	30 (s = 3.6)	28.9 (s = 4.1)
Fibrinogeno (mg/dL)	388.5 (s = 55.3)	424.16 (s = 74.4)
Proteinuria (mg/mL)	455 (s = 435.6)	0 (s = 0)

Se obtuvo una muestra de placenta de 50 gr de cada paciente, a 1 cm de la inserción del cordón umbilical, todas las muestras fueron congeladas a 4° C, posteriormente se fraccionaron tomando de cada una de ellas 500 mg, los cuales se congelaron para realizar disgregación mecánica en hielo seco, y posteriormente mediante la técnica de extracción de ARN total con TriZol descrita por Chomezynski y Sacchi seguida paso a paso, se realizo aislamiento total de RNA total (ya descrita en la metodología)

La cantidad de ARN total obtenido del tejido placentario para ambos grupos de pacientes preeclámpticas y controles fue muy similar siendo de 158.9 $\mu\text{g}/500\text{ mg}$ de placenta ($s = 50.9\ \mu\text{g}$) y 168.2 $\mu\text{g}/500\text{ mg}$ de placenta ($s = 72.5\ \mu\text{g}$), la calidad espectrofotométrica fue de 1.91-1.98 cuando se evaluó la relación de densidades ópticas a 260/280 nm (Cuadro 1), la integridad del ARN total fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 6), dicha técnica revelo la presencia de una mínima cantidad de ADN genómico como contaminante, de igual forma se mostraron las bandas de ARN correspondientes a los 28 y 18 svedbergs, la nube de ARN mensajero se observo al nivel de 100-1000 pb (Figura 7)

Cuadro 4: Espectrofotometría. Cuantificación del ARN total, el cuadro muestra los cocientes 260/280 que evalúan la integridad y el valor a 260 nm, permite calcular la concentración del ARN mediante la constante 40 $\mu\text{g}/\text{OD}$.

Placa	Tipo	Poso	Muestra	Log. Onda		Cociente 260/280	Concentración	
				260	280		Dil 1:10	Final
Montero ARN	Preeclampsia	A1	P1	5.411	2.827	1.91	216.4 ng/ μL	2.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
		B1	P	6.191	3.227	1.92	247.6 ng/ μL	2476ng/ μL
		C1	P3	5.913	3.005	1.97	336.5 ng/ μL	2365ng/ μL
		D1	P4	8.742	4.479	1.95	349.7ng/ μL	3497ng/ μL
		E1	P5	1.911	6.191	1.92	476.4ng/ μL	4764ng/ μL
		F1	P6	9.508	4.839	1.96	380.3ng/ μL	3803ng/ μL
	Controles	G1	C1	7.857	4.081	1.93	314.3ng/ μL	3143ng/ μL
		H1	C2	4.193	2.173	1.93	167.7ng/ μL	1677ng/ μL
		A2	C3	7.433	3.772	1.97	297.3ng/ μL	2973ng/ μL
		B2	C4	5.668	2.856	1.98	226.7ng/ μL	2267ng/ μL
		C2	C5	10.639	5.431	1.96	425.6ng/ μL	4256ng/ μL
		D2	C6	13.926	7.153	1.95	557ng/ μL	5570ng/ μL

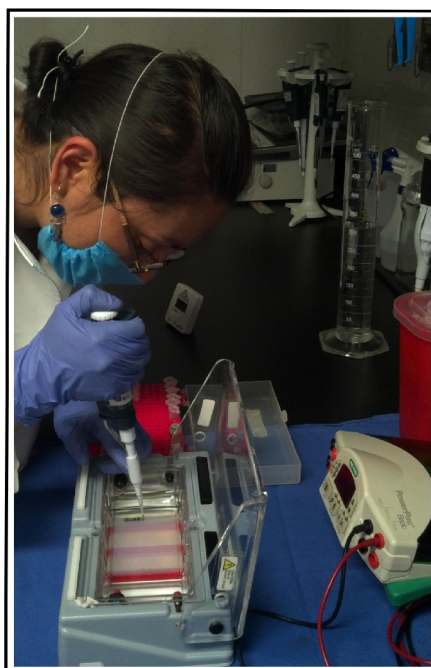


Figura 6: Electroforesis. Imagen representativa del procedimiento para cargar el gel de agarosa al 1% con las muestras de ARN, con la finalidad de evaluar su integridad.

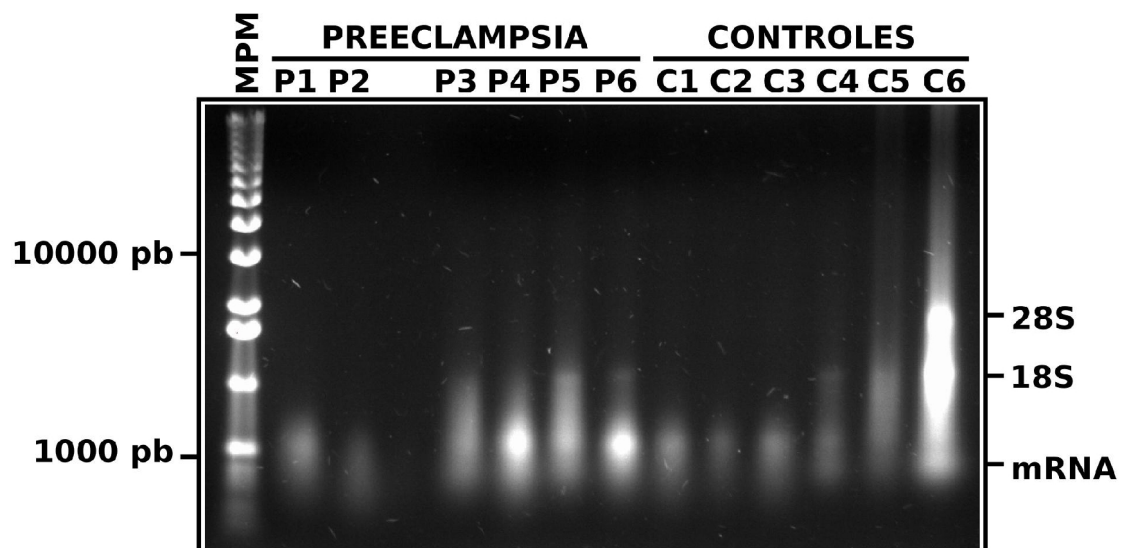


Figura 7: Patrón de corrimiento electroforético de RNA en gel de agarosa al 1%. El ARN fue sometido a un campo electromagnético de 75 Volts y 400 miliamperios, durante 45 minutos.

La evaluación de los cambios en la transcripción revelaron una gran cantidad de mensajeros presentes en ambos grupos de pacientes, la mayoría de los ARN evaluados presentan CT's que inician en el ciclo 12 de 45 y terminan en el ciclo 32 de 45 (Figura 8).

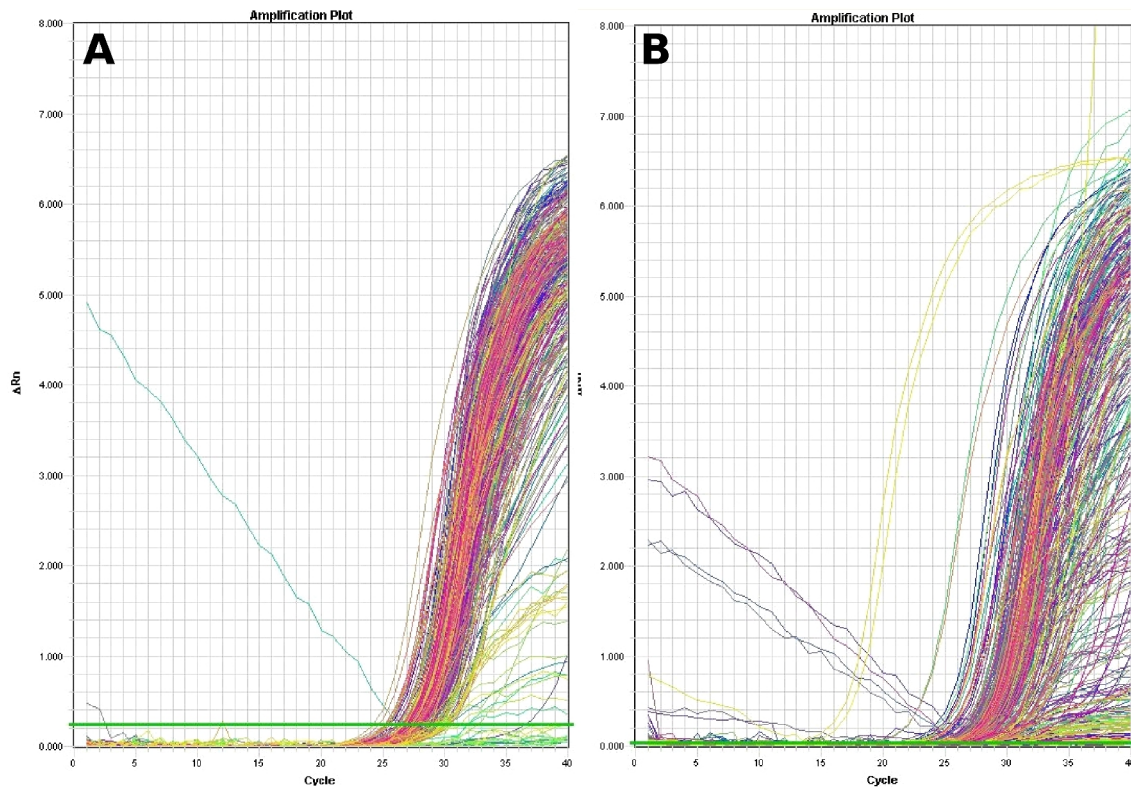


Figura 8: Curvas de amplificación: A) Curvas de amplificación típicas de la actividad transcripcional de placentas de pacientes con embarazos normoevolutivos, B) Curvas de amplificación típicas de la actividad transcripcional de placentas de pacientes con preeclampsia.

Discusión

Características demográficas

Según la organización mundial de la salud (OMS) cada día mueren 800 mujeres por causas prevenibles relacionadas con el embarazo y el parto, los estados hipertensivos del embarazo ocupan la tercera causa de mortalidad materna a nivel mundial, en América Latina representan el 34% de las causas de muerte materna, (cada 7 min muere una mujer por preeclampsia), en México se presenta del 2-10% de los embarazos, siendo la primera causa de muerte materna durante la segunda mitad del embarazo.

En nuestro grupo de estudio, la edad de las pacientes preeclámpticas fue en promedio de 28.1 años, y siendo su primer embarazo en el que debuta la patología, a pesar de que en las mujeres mayores de 35 años en donde se refiere que existe un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas de origen vasculares, con lo que se facilita, el surgimiento de la preeclampsia, recordando que múltiples estudios epidemiológicos, sustentan la validez de este planteamiento, siendo en las primigestas la susceptibilidad de 6 a 8 veces mayor que en las multíparas, 3 de 6 pacientes en grupo de preeclampsia tenían primipaternidad en comparación con el grupo control donde solo 2 pacientes tenían primipaternidad, en la conferencia ***Hipertensión y estrés oxidativo, del Abstract Book Hypertension Prague 2002, 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension and 12th European Meeting on Hypertension*** ^[34], se declaró que la escasa duración de la cohabitación sexual es un determinante importante del surgimiento de la enfermedad, ya se ha demostrado que tanto en las primigestas como en las multíparas, la mayor duración de la cohabitación sexual antes

de la concepción tiene una relación inversa con la incidencia de preeclampsia; por el contrario, la modificación de la paternidad o un breve período de exposición a los espermatozoides del compañero sexual, se han relacionado con un incremento sustancial del riesgo de padecer la enfermedad.

Según el IMC las pacientes del grupo de preeclampsia presentan obesidad grado I, recordando que los estados de malnutrición por defecto o por aumento se asocian con incremento en el riesgo de presentar preeclampsia, sin embargo el incremento ponderal fue aún mayor que el presentado en el grupo de las pacientes con embarazo normoevolutivo.

Ambos grupos de pacientes no se reportaron antecedentes personales de hipertensión ni diabetes mellitus al momento de la interrupción del embarazo, en el grupo de pacientes control no se reportaron antecedentes de diabetes gestacional o preeclampsia durante el embarazo previo, lo cual permite descartar que se pudiera establecer una respuesta inmunológica previa, la unidad feto-placentaria contiene antígenos paternos que son extraños para la madre, y se supone que son los responsables de desencadenar el proceso inmunológico que conlleva al daño vascular, el cual ha sido considerado el factor desencadenante de la enfermedad, por el contrario se ha establecido que podría inducir el fenómeno de tolerancia inmunológica, que evitará que la enfermedad aparezca en gestaciones posteriores.

Características clínicas

En el grupo de pacientes con preeclampsia 3 de 6 pacientes presentaron sintomatología vasculo-espasmódica, siendo la epigastrálgia el síntoma más frecuente

(3/6), sin embargo en el artículo **Preeclampsia severa, Eclampsia, Síndrome de HELLP comportamineto clínico** ^[35] se hace referencia que ésta se presenta hasta en el 85% de las pacientes, mientras que la cefalea y la hiperreflexia afectan al 73% y 69% de las pacientes respectivamente, en nuestra población solo una paciente desarrollo edema y otra más presento hiperreflexia, comparado con el grupo control donde todas las pacientes estaban asintomáticas al momento de ingresar a la unidad tocoquirúrgica.

Características bioquímicas

Los estudios bioquímicos realizados al ingreso de las pacientes a la unidad tocoquirúrgica evidencian, que las pacientes del grupo de preeclampsia tienen niveles de Hb mayores que el grupo control es decir que desarrollan hemoconcentración y trombocitopenia de hasta 40,000 plaquetas/mm³, comparado con el grupo control donde el valor promedio fue de 189.333 plaquetas/mm³, de igual forma hay diferencia importante entre las pruebas de función hepática de un grupo y otro siendo en el grupo de preeclampsia, en el que las enzimas AST, ALT y DHL se encontraron a más del doble de su valor normal, recordando que en el artículo **Disfunción endotelial en la preeclampsia** ^[36] se referencia que las pacientes presentan disfunción endotelial sistémica, la cual origina la disminución en el conteo plaquetario y disfunción hepática. Otra diferencia importante ya referida en la literatura es el incremento de los niveles de glucosa, nuestra población confirma que la hiperglicemia es una alteración común en las pacientes preeclámpicas, por otro lado se ha reportado que las pacientes preeclámpicas desarrollan hipoalbuminemia transitoria ^[37], sin embargo en el presente estudio no se pudo establecer diferencia significativa entre el grupo de pacientes con preeclampsia y el grupo control en la concentración sérica de albúmina, a pesar de que las pacientes con

preeclampsia desarrollaron proteinuria de 455 mg/mL ($s = 435.6$), el resto de los estudios bioquímicos no mostraron diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

Manejo obstétrico:

La culminación del embarazo es la única medida terapéutica curativa para las pacientes que desarrollan preeclampsia, como se reporta en el ***Consenso: Manejo de la preeclampsia grave-eclampsia*** ^[38], la interrupción del embarazo en las primeras 72 hrs después de establecer al diagnóstico clínico y bioquímico de preeclampsia severa siempre y cuando la gestación sea de término, en aquellas pacientes con embarazos pretérmino y fetos inmaduros se instaura el esquemas de maduración pulmonar a base de esteroides los cuales reducen las complicaciones neonatales, con base en ello es que las 12 pacientes de este estudio fueron tratadas mediante cesárea tipo Kerr

Características del recién nacido

En nuestro estudio se observo que las semanas de gestación de los recién nacidos es mayor para el grupo control que para el grupo de las pacientes preeclámpticas, lo cual era de esperarse, debido a que la enfermedad por si misma condiciona interrupción del embarazo antes del término para evitar las complicaciones perinatales; por ello la diferencia en la media estadística del peso de los recién nacidos de madres preeclámpticas es de 1350 gr por lo que en general se considera que estos recién nacidos tienen una restricción del crecimiento intrauterino, todos estos datos se encuentran en concordancia con lo reportado por diferentes grupo a rededor del mundo ^[39,40,41].

A pesar de que no todas las pacientes recibieron protocolo de maduración pulmonar, la valoración de APGAR tanto al minuto como a los 5 minutos del nacimiento no mostró diferencia significativa entre ambos grupos siendo en promedio de 7 al minuto y de 8 a los 5 min para ambos grupos, lo cual nos recuerda que la perfusión placentaria se mantiene a expensas del incremento de las resistencias vasculares periféricas maternas, sin embargo las secuelas neurológicas a largo plazo se presentan en 3-4% de los hijos de mujeres preeclámplicas ^[42].

Características de la placenta

La inspección macroscópica de la placenta demostró diferencia significativa ya que en el grupo control ésta fue de mayor peso y tamaño, de igual forma las placentas del grupo control presentaron menos calcificaciones y no se evidenciaron zonas de infarto a diferencia de las placentas de pacientes con preeclampsia en las que si pudieron observarse ambas condiciones, en ninguno de los grupos se presentaron dificultades en el alumbramiento.

Transcripción

A pesar de que solamente se cuenta con un solo ensayo preliminar del estado transcripcional de las pacientes preeclámplicas es evidente que existe una diferencia transcripcional entre ambos grupos, como lo demuestra las diferencias en las cantidades de ARN mensajero obtenidos a partir de los 500 µg de tejido placentario, esto se ve reflejado en las curvas de amplificación de los diferentes factores tróficos, neurotróficos y de receptores TRK, debido al reducido número de placentas integradas al estudio, en

este momento, los datos no son concluyentes, por lo que se espera tener los resultados totales de los arreglos de PCR en tiempo real para integrar en su totalidad dicho conocimiento.

Conclusiones

La preeclampsia sigue siendo un problema de salud pública en México y en el mundo, siendo responsable de una alta morbilidad materna, dentro del sector salud, en México tiene implicaciones económicas importantes, de igual forma sigue siendo un reto para la investigación biomédica, ya que su etiología es desconocida, implicando su detección temprana, prevención y manejo oportuno. Con base en ello podemos decir que la expresión de factores tróficos pareciese ser mayor en pacientes con preeclampsia, principalmente aquellos que tienen efecto antiangiogénicos, pero también que quizá pudieran estar implicados otros factores como las neurotrofinas, HB-BDNF, CNFT que influyen en la protección de feto contra convulsiones al nacimiento y quizá en los primeros años posteriores al nacimiento, con los datos obtenidos de la revisión bibliográfica y de la fase experimental de este trabajo nuestro grupo de investigación propone el siguiente esquema que ilustra la fisiopatología de la preeclampsia [43-52].

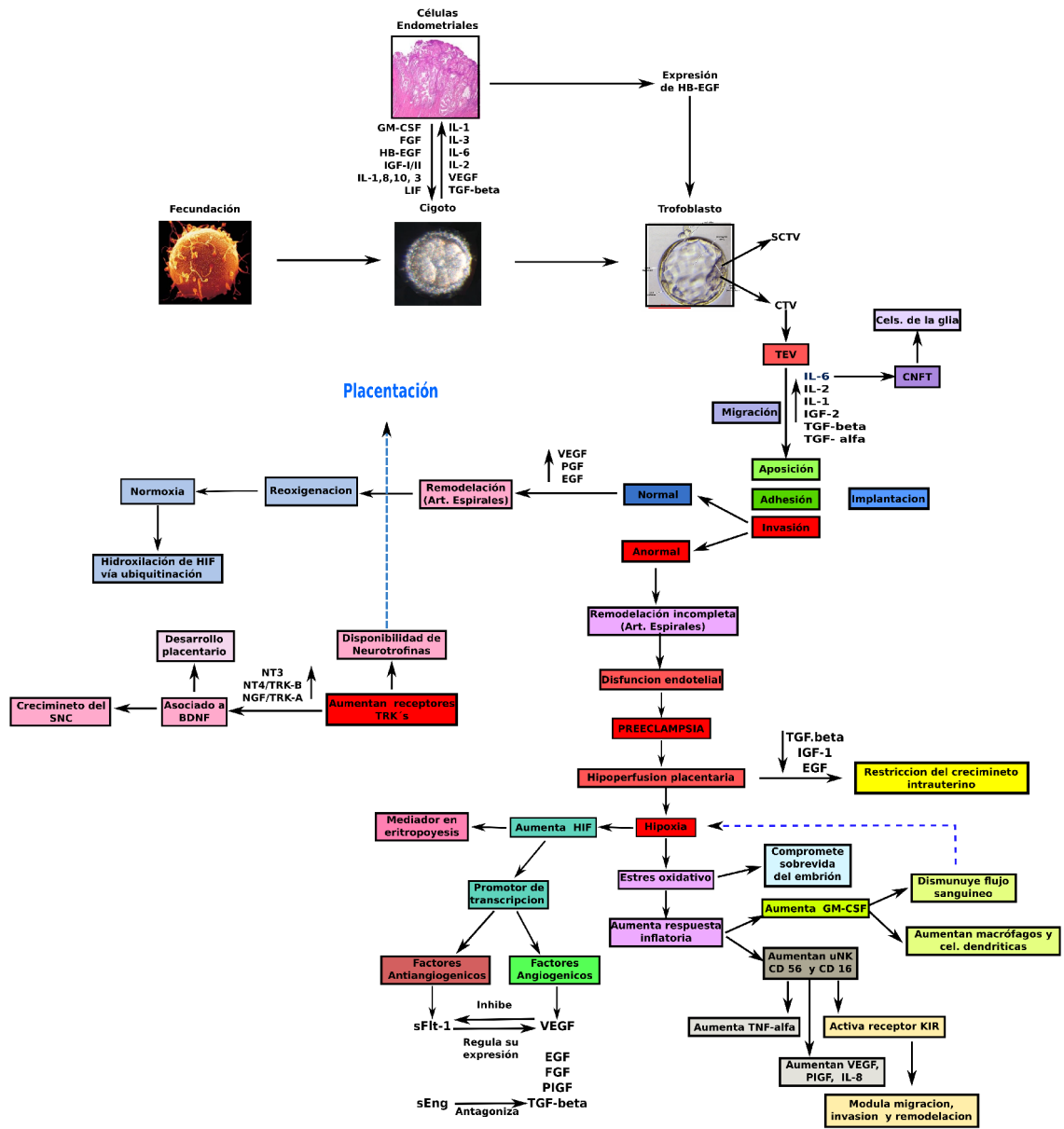


Figura 9: Vías Celulares y Moleculares que participan en la patogénesis de la preeclampsia. El esquema ilustra la intrincada relación que tiene el desarrollo del embrión con el endometrio. Cuando estas vías de comunicación molecular fallan se desencadenan los eventos fisiopatológicos que culminan con el desarrollo de preeclampsia.

Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos en extracción del ARN de las muestras de placentas de pacientes preeclámpticas y controles, es loable pensar que el aumento en la transcripción de estos factores tiene un papel importante en el desarrollo de la preeclampsia asociado a los factores de riesgo que tiene la paciente. Una vez establecidos estos factores, podríamos:

1. De los factores sobreexpresados identificar cuántos de ellos se pueden cuantificar en sangre materna.
2. Hacer de estos factores de crecimiento cuantificados en sangre materna, un marcador bioquímico temprano de preeclampsia.
3. Ampliar el estudio para conocer el polimorfismo de estos factores de crecimiento.
4. Instaurar tratamientos tempranos en pacientes con alto loable riesgo para desarrollar preeclampsia.

Bibliografía

1. Redman CW, Sargent IL, Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 2005, 308 (5728); 1592-1594.
2. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005, 365(9461); 785-799.
3. Trogstad LI, Eskild A, Magnus P, Samuelsen SO, Nesheim BI. Changing paternity and time since last pregnancy; the impact on pre-eclampsia risk. A study of 547 238 women with and without previous pre-eclampsia. *Int J Epidemiol* 2001, 30(6); 1317-1322.
4. Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007, 28(2); 192-209.
5. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CWG. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2006, 13(5); 680-686.
6. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CWG. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2007, 1:111-117.
7. Catov JM, Ness RB, Kip KE, Olsen J. Risk of early or severe preeclampsia related to pre-existing conditions. *Int J Epidemiol* 2007, 36(2); 412-419.
8. Hahn S, Gupta AK, Troeger C, Rusterholz C, Holzgreve W. Disturbances in placental immunology: ready for therapeutic interventions. *Springer Semin Immunopathol* 2006, 27(4); 477-493.

9. Huppertz B. The feto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin Immunopathol* 2007, 29(2); 83-94,
10. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006, 12(6); 747-755.
11. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 2002, 90(12);1274-1281.
12. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, et al. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(7), 4299-4308.
13. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003, 111(5); 649-658.
14. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 161(5); 1200-1204.
15. Stoikos CJ, Harrison CA, Salamonsen LA, Dimitriadis E. A distinct cohort of the TGFbeta superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Hum Reprod* 2008, 23(6);1447-1456.
16. Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, Nakano H, Takahashi T, et al. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. *Mol Reprod Dev* 2003, 65:9-18.

17. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, et al. A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 138(3);1129-1137.
18. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004, 25:72-101.
19. Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994, 120(5);1071-1083.
20. Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology* 1997, 138(9);3976-3986.
21. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003, 72:609-642.
22. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev* 2004, 3(4);445-464.
23. Mattson MP. Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neurosci Biobehav Rev* 1997, 21(2); 193-206. 17
24. Mattson MP, Kumar KN, Wang H, Cheng B, Michaelis EK. Basic FGF regulates the expression of a functional 71 kDa NMDA receptor protein that mediates calcium influx and neurotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1993, 13(11); 4575-4588.

25. Cheng B, Furukawa K, O'Keefe JA, Goodman Y, Kihiko M, Fabian T, et al. Basic fibroblast growth factor selectively increases AMPA-receptor subunit GluR1 protein level and differentially modulates Ca²⁺ responses to AMPA and NMDA in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1995, 65(6); 2525-2536.
26. Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, et al. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 2005, 434(7035); 894-898.
27. Guo ZH, Mattson MP. Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function. *Cereb Cortex* 2000, 10:50-57.
28. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001, 63(2):125-149.
29. Canudas AM, Pezzi S, Canals JM, Palls M, Alberch J. Endogenous brain-derived neurotrophic factor protects dopaminergic nigral neurons against transneuronal degeneration induced by striatal excitotoxic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2005, 134:147-154.
30. Duan W, Guo Z, Mattson MP. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *J Neurochem* 2001, 76(2); 619-626.
31. Boche D, Cunningham C, Gauldie J, Perry VH. Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003, 23(10); 1174-1182.

32. Yoo YM, Lee CJ, Lee U, Kim YJ. Neuroprotection of adenoviral-vector-mediated GDNF expression against kainic-acid-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Exp Neurol* 2006, 200(2); 407-417.
33. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996, 2(7); 788-794
34. Ghiadoni L, Sudano I, Versari D. Hipertensión y estrés oxidativo, del Abstract Book Hypertension Prague 2002, 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension and 12th European Meeting on Hypertension. Abstract Book S 105.p.0409.
35. Sanchez SE, Gomez DJ, Morales GV. Preeclampsia severa, Eclampsia, Síndrome de HELLP, comportamiento clínico. Servicio de ginecología y obstetricia. Hospital General Dr. Aurelio Valdivieso, Oaxaca, Oaxaca.
36. Pacheco JR. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *Anales de la facultad de medicina*, 2003, vol. 64.
37. Gojnic M, Petkovic S, Papic M, Mostic T, Jeremic K, Vilendecic Z. et al. Plasma albumin level as an indicator of severity of preeclampsia. Institute of Gynecology and Obstetrics, Clinical Center of Serbia, University of Belgrade 2012.
38. Loópez N, Bernasconi A, Lapidus A, Vampa G. Consenso: Manejo de la preeclampsia grave-eclampsia. Elaborado por la Sociedad Argentina de Hipertensión y Embarazo. 2006 F.A.S.G.O
39. Illanes S, Parra M, Serra R, Pino K, Figueroa-Diesel H, Romero C, et al. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who

- subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction. Medicine Unit, Universidad de los Andes, Santiago, 2012.
40. Herraiz S, Pellicer B, Serra V, Cauli O, Cortijo J, Felipe V. Sildenafil citrate improves perinatal outcome in fetuses from pre-eclamptic rats. Fundación IVI-Instituto Universitario IVI, University of Valencia, Spain, Hospital General Universitario de Valencia, Neurobiology Laboratory. 2012.
41. Murthi P, Stevenson JL, Money TT, Borg AJ, Brennecke SP, Gude NM. Placental CLIC3 is increased in fetal growth restriction and pre-eclampsia affected human pregnancies. Department of Perinatal Medicine, Pregnancy Research Centre, The Royal Women's Hospital. 2012
42. Gómez GM, Danglot BC. El neonato de madre con preeclampsia-eclampsia. Revista Mexicana de Pediatría. Vol. 73 2006 (2).p. 82-88.
43. Sanchez RE, Nava SS, Moran C. Estado actual de la preeclapsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares. Rev Invest Clin 2010; 62 (3): 252-260-
44. Camille E, Powe AB, Richard J, Levine MD, Karumanchi SA, Preeclampsia a disease of maternal endothelium. The role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. PMC 2011 December 21.
45. Vaisbuch E, Whitty EJ, Hassan SS, Romero R, Kusanovik J, Cotton DB, et al. Circulating Angiogenic and Anti-angiogenic Factors in Pregnant Women with Eclampsia. PMC 2012 February 1.
46. Powers WR, Jeyabalan A, Clifton GR, Van DP, Hauth CJ, Klebanoff AM, et al. Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1(sFlt-1), Endoglin and Placental Growth

- Factor (PIGF) en Preeclampsia among High Risk Pregnancies. PloS ONE, vol. 5: e13263.
47. Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Karahashi H. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe preeclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011(9): 107.
48. Young B, Levine R, Salahuddin S, Qian C, Lim K, Karumanchi SA, et al. The use of angiogenic biomarkers to differentiate non HELLP related thrombocytopenia from HELLP syndrome. *J Maternal Fetal Neonatal Med* 2011
49. Zamudio S, Wu Y, Letta F, Rolfo A, Cross A, Wheeler T, et al. Human Placental Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression Correlates with Clinical Outcomes in Chronic Hypoxia in vivo. *AJP* June 2007, vol. 70(6).
50. Akahori Y, Takamoto N, Masumoto A, Inoue S, Nakatsukasa H, Masuyama H, et al. Circulating Levels of Ciliary Neurotrophic Factor in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Acta Med Okayama*, vol. 64 (2).
51. Joseph HS, Zenclussen A, Chen Ch-P, Basar M, Yang H, Arcuri F, et al. The implication of Aberrant GM-CSF Expression in Decidual Cells in the Pathogenesis of Preeclampsia. *AJP* November 2010, vol. 177 (5).
52. Chen Y, Hao Q, Kim H, Su H, Laterte M, Karumanchi SA, et al. Soluble Endoglin Modulates Aberrant cerebral Vascular Remodeling. *Ann Neurol* PMC 2010.