



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**CARACTERIZACIÓN DE LEUCOCITOS EN SANGRE
PERIFÉRICA EN MUJERES EMBARAZADAS CON
PREECLAMPSIA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

**ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA**

P R E S E N T A

SHAIK HABBID CASTILLO PONTÓN

PROFESOR TITULAR

DR. RODRIGO ZAMORA ESCUDERO

DIRECTOR DE TESIS

M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



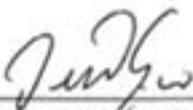
Ciudad de México

2017

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**"CARACTERIZACIÓN DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA EN
MUJERES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA"**

Dra. Viridiana Gorbea Chávez



Director de Educación en Ciencias de la Salud
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



Dr. Rodrigo Zamora Escudero

Profesor Titular del Curso en Especialización en Ginecología y Obstetricia
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



M en C. Héctor Flores Herrera

Director de Tesis
Investigador en Ciencias Médicas.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

CARACTERIZACION DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA EN MUJERES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA

Castillo Pontón S.H.¹, Mancilla Herrera I.² Flores-Herrera H.³

¹ Médico Residente de la Especialidad de Ginecología y Obstetricia, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

² Investigador en Ciencias Médicas; Departamento de Infectología e Inmunología Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

³ Investigador en Ciencias Médicas; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

Correspondencia:

Shaikh Habbid Castillo Pontón, MR

Instituto Nacional de perinatología- Isidro Espinosa de los Reyes Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000 México D.F

Correo electrónico: shabbid@gmail.com

INDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Epidemiología y etiología de la preeclampsia	
3.2 Fisiopatología en el desarrollo de la preeclampsia.	
4. JUSTIFICACION	10
5. HIPÓTESIS	11
6. OBJETIVOS	11
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos específicos	
7. MATERIAL Y MÉTODOS	12
7.1 Características de las pacientes	
7.2 Diseño del estudio	
7.3 Criterios de selección	
7.4 Variables del estudio	
7.5 Obtención de muestras	
7.6 Determinación de antígenos de superficie	
7.7 Análisis estadístico	
8. RESULTADOS	17
9. DISCUSIÓN	20
10. CONCLUSIONES	23
11. BIBLIOGRAFÍA	24
	27
12. FIGURAS	
13. PIE DE FIGURAS	32
14. TABLAS	26
15. CRONOGRAMA	33

RESUMEN

Introducción

La principal cause de mortalidad y morbilidad materna es la Pre-eclampsia (PE). Aunque se sabe que la etiología de esta enfermedad es escasa, se sabe que la fisiopatología está caracterizada por placentación anormal, disfunción endotelial y respuesta inflamatorio exagerada. La evidencia clínica indica que la abundancia de células inmunológicas en la interfase materno-fetal y en la circulación de pacientes con PE es anormal en comparación con pacientes control embarazadas sanas (ES). Además, el fenotipo y la función de algunas de estas células esta alterada, Para caracterizar los efectos sistémicos de PE en células circulantes, analizamos las células blancas en pacientes con EN y con PE con citometría de flujo. Encontramos que CD16 en células NK (natural killer) y monocitos se incrementan de manera significativa en mujeres con PE y presentan expresión irregular de receptores de quimiocinas y células presentadoras de antígeno. La mayor importancia en las células de superficie fue la elevación mayor de estas células en comparación con las pacientes con EN. Estos datos sugieren que los monocitos tienen una respuesta elevada y pueden contribuir a la presentación de la enfermedad.

Objetivo Identificar y caracterizar los diferentes tipos de leucocitos y células de superficie en pacientes embarazadas con preeclampsia.

Material y métodos

Obtención del suero Obtención del suero materno en el servicio de urgencias se identificaron pacientes con embarazo único mayores a 20 semanas que presentaron hipertensión arterial y se solicitaron la bioquímica clínica de rutina.

Fenotipificación celular Los leucocitos de sangre periférica fueron aislados de sangre fresca venosa (menos de 4 horas de haberse tomado la muestra), se centrifugaron por 5 minutos a 400 revoluciones por minuto. La capa blanca fue tomada, los leucocitos lavados. Los leucocitos fueron analizados en un citómetro de flujo FACS Aria III (BD) con el programa DIVA V 6.0.

Resultados Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la edad materna ($p = 0.013$), la talla ($p = 0.018$), y el peso ($p = 0.109$) en las pacientes con desarrollo clínico de preeclampsia con respecto a las pacientes sanas. Con respecto a los receptores de superficie encontramos que en las células NK un aumento en la expresión de los receptores de superficie de tipo CD16 ($p \leq 0.001$) y una disminución en los receptores CD152 ($p = 0.05$) en las pacientes con preeclampsia con respecto a las pacientes sanas (fig.3). En los monocitos clásicos un aumento significativo en los receptores de tipo CD16 ($p = 0.05$) y HLA-DR ($p \leq 0.001$) en las pacientes con preeclampsia con respecto a las sanas (fig. 4).

Conclusión El desarrollo de la preeclampsia activa de manera importante la respuesta inmunológica. Nuestros resultados sugieren que se pueden utilizar a los receptores de superficie de las células NK (CD16) y monocitos clásicos (CD16, y CD11a) para la identificación de pacientes que presentan el desarrollo de preeclampsia.

Palabras clave Preeclampsia, Linfocitos, inflamation, placenta

ABSTRACT

The leading cause of pregnancy-associated mortality and morbidity is pre-eclampsia (PE). Although information regarding the etiology of this disease is scant, its pathophysiology is characterized by abnormal placentation, endothelial dysfunction as well as an exaggerated inflammatory response. Clinical evidence also indicates that the abundance of many immune cells at the fetomaternal interface and in the circulation of PE patients is abnormal, when compared with normal pregnant (NP) controls. In addition, the phenotype and function of some of these cells is altered. To further characterize the systemic effects of PE on circulating cells, we analyzed monocytic subpopulations in NP and PE patients with flow cytometry. We found that CD16 in Natural Killer (NK) cells, non-classical monocytes are significantly increased in women with PE and they display irregular expression of several chemokine receptors and antigen presentation molecules. The most important difference among the cell surface molecules was the higher levels of these cells than their NP counterparts. These data suggest that the monocytes are hyper-responsive and this may contribute to presentation of the disease.

Objective Identify the different type of leukocytes and surface cells in pregnant patients with pre-eclampsia.

Material and methods

Obtained material serum Material serum was obtained in the emergency department, identifying patients with singleton pregnancy at 20 weeks or more that presented with arterial hypertension and routine exams were solicited.

Cell typification The peripheral blood leukocytes were isolated from fresh venous blood (no more than 4 hours after taking the sample). The sample was centrifuged for 5 minutes at 400 revolutions per minute. The white coat was isolated and the leukocytes were washed. The leukocytes were analyzed in a FACS Aria III (BD) cytometer with the software DIVA V 6.0..

Results: There were significant differences in maternal age ($p=0.013$), size ($p=0.018$), weight ($p=0.109$) in patients with clinical appearance of preeclampsia in comparison with healthy patients. In respect with the surface antigens we found that in NK cells an increase in the expression of surface antigens type CD16 ($p\leq 0.001$) and a decrease in antigens CD152 ($p=0.05$) in patients with preeclampsia in comparison with healthy patients (fig. 3). In classical monocytes a significant increase in antigens type CD16 ($p=0.05$) and HLA-DR ($p\leq 0.001$) in patients with preeclampsia in comparison with healthy patients.

Conclusions: The development of preeclampsia activates in an important manner the immunological response. Our results suggest that you can use the surface antigens for NK cells (CD16) and classical monocytes (CD16 and CD11a) as a marker to identify patients for potential development of preeclampsia.

Keywords Preeclampsia, Lymphocytes, inflammation, placenta

INTRODUCCIÓN

Epidemiología y etiología de la preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una patología hipertensiva que afecta el desarrollo normal del embarazo. Su prevalencia es de aproximadamente el 8% del total de los embarazos atendidos anualmente de los cuales el 10% y el 25% corresponden a pacientes con hipertensión arterial sistémica crónica preexistente y aquellas sin factores de riesgo respectivamente. [1, 3] En el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” en los últimos cinco años se reporta una incidencia del 10% [Departamento de estadística y metas institucionales 2009-2014].

Clínicamente la PE se establece después de la semana 20 y se caracteriza por dos eventos fisiológicos 1) elevación de la presión arterial en mujeres normotensas previas (sistólica ≥ 140 mmHg, y diastólica ≥ 90 mmHg), y 2) proteinuria (>300 mg en 24 horas ó relación proteínas / creatina ≥ 0.3 ó labstix 1+) ó en ausencia de proteinuria con hipertensión de reciente aparición y elevación creatinina, y/o transaminasas y/o trombocitopenia, y/o edema pulmonar, y/o alteraciones cerebrales o visuales [5].

Sin embargo, estos datos clínicos y bioquímicos de gabinete son evidentes hasta que la PE se ha desarrollado comprometiendo el bienestar materno-fetal. [5]

Fisiopatología en el desarrollo de la preeclampsia.

Durante el establecimiento del embarazo, la placenta recibe aporte sanguíneo de numerosas arterias útero-placentarias que se desarrollan por la acción y migración intersticial y endovascular del trofoblasto en las paredes de las arteriolas espirales transformando el lecho arterial útero-placentario. [1]

Estos cambios vasculares ocurren por invasión y migración del trofoblasto en dos etapas produciendo modificación en los segmentos 1) deciduales de las arteriolas espirales entre las 12-14 semanas y 2) miometriales entre la semana 16 a 22 [1]

Durante el embarazo, las células inmunes se encuentran presentes de manera abundante en la interfase materno-fetal donde se cree que existen para facilitar la implantación, ayudar en el desarrollo placentario y mantener la tolerancia fetal [1]. Modificaciones en el arribo y establecimiento de las células del sistema inmune en la unidad materno-fetal ha sido reconocido desde hace tiempo en pacientes con PE [1].

En la circulación materna, los monocitos y granulocitos muestran un perfil de expresión diferentes de antígenos de superficie, citocinas, así como de moléculas de oxígeno.

Se ha demostrado en pacientes con evidencias clínicas de preeclampsia que los monocitos muestran expresión elevada de marcadores de superficie tipo CD14 y CD11b lo que promueve la producción de citocinas proinflamatoria entre las que se encuentran la interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 con respecto a pacientes sanas a la misma edad gestacional [12-16].

Diferencias evidencias experimentales han determinado que en la interfase materno-fetal de pacientes con PE existen cambios fenotípicos importantes en los monocitos y macrófagos [17, 18] lo que conlleva a modificaciones en la capacidad de adherencia celular a la pared vascular [13], así como la disminución de sus funciones inmunosupresoras de tipo IL-10 con embarazo sano [19-20]

En base a la expresión de diferentes receptores de superficie, los monocitos en sangre humana periférica pueden dividirse en 3 distintas poblaciones celulares 1) lipopolisacáridos (LPS), 2) CD14 y 3) Fc γ -III (CD16). [15] La nomenclatura y

clasificación de estos subtipos de monocitos se han actualizado en tres poblaciones: monocitos clásicos (CD14, CD16⁻), monocitos intermedios (CD14, CD16⁺) y no clásicos (CD14, CD16⁺) [15, 19]. Evidencia reciente indica que cada subpoblación tiene una firma genética única y también pueden tener diferentes funciones en inflamación e inmunidad [15,19].

En este estudio determinamos los niveles de expresión de receptores de superficie en linfocitos, células NK (por sus siglas en inglés natural killers), CD279, CD25, CD52 y CD56, monocitos (TREM-1, HLA-DR, CD16, CD11a, CD11) en pacientes con PE y compararemos resultados en pacientes sanas a término.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente no se conoce con precisión la etiología de la enfermedad hipertensiva durante el embarazo; sin embargo, se sabe que en la fisiopatología de dicha entidad se involucra una respuesta inflamatoria endotelial vascular sistémica. Recientemente se ha demostrado que los leucocitos contribuyen de manera importante en la presentación de la preeclampsia. En el presente trabajo, se determinó la expresión de diferentes antígenos de superficie en los leucocitos y monocitos asociados a un proceso inflamatorio. Estos resultados permitirán correlacionar estos marcadores de superficie con la aparición en el desarrollo de preeclampsia en etapas tempranas. Para lo cual nos hemos propuestos responder a la siguiente pregunta de investigación. ¿Cuáles antígenos de superficie de células inmunológicas se encuentran presentes en pacientes con preeclampsia?

OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS

Identificar y caracterizar los diferentes tipos de células inmunológicas y antígenos de superficie en pacientes embarazadas con preeclampsia.

Objetivos particulares

1. Conocer los niveles de linfocitos, células killers (NK), CD279, CD25, CD52, y CD56 en pacientes embarazadas sanas y en pacientes con diagnóstico de preeclampsia.
2. Conocer los niveles de monocitos TREM-1, HLA-DR, CD16, CD11a, CD11b.
3. Comparar de estos marcadores celulares con respecto a pacientes sanas.

HIPÓTESIS

La expresión de los antígenos de superficie de los linfocitos y monocitos asociados al proceso inflamatorio se encontrarán significativamente elevadas en pacientes que desarrollan preeclampsia con respecto a pacientes sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de las pacientes

En el servicio de urgencias se identificaron pacientes con hipertensión, se solicitaron biometría hemática, química sanguínea, examen general de orina, pruebas de funcionamiento hepático y proteínas en orina una vez confirmado el diagnóstico de preeclampsia en pacientes con embarazos con feto único mayores a 20 semanas, en ausencia de cualquier proceso inflamatorio agudo, incluyendo obesidad mórbida, infecciones del tracto reproductor, genitourinario, respiratorio, gastrointestinal o sepsis, enfermedades autoinmunes con evidencia de actividad clínica o bioquímica, o presencia de sangrado transvaginal activo en el momento de la toma de muestra.

El diagnóstico de preeclampsia se estableció de acuerdo a los siguientes criterios: tensión arterial (TA), TA sistólica ≥ 140 mmHg, diastólica ≥ 90 mmHg embarazos \geq a 20 semanas, y proteinuria ≥ 0.3 g proteínas en orina en 24 horas, relación de proteínas creatinina ≥ 0.3 , labstix con presencia de proteinuria (+) o en caso de no contar con proteinuria y con hipertensión de reciente aparición. Trombocitopenia $\leq 100,000/\text{mm}^3$, creatinina sérica ≥ 1.1 mg/dl o incremento del doble en ausencia de enfermedad renal, elevación de las transaminasas 2 desviaciones estándar (DE), edema pulmonar, alteraciones visuales o síntomas neurológicos.

Diseño del estudio

Tipo de investigación: Observacional

Tipo de Investigación: Transversal, analítica y comparativo.

Características del estudio

a) Por la participación del investigador: Analítico

b) Por la temporalidad del estudio: Transversal

Unidades de observación:

1. Pacientes con embarazo único que presentaron diagnóstico de preeclampsia (casos)
2. Pacientes sanas con embarazo único sin evidencias clínicas de preeclampsia (controles)
3. Tamaño de la muestra: Tomando en cuenta la incidencia anual de la PE en el Instituto Nacional de Perinatología y por la temporalidad del estudio nos propusimos incluir un total de 60 pacientes con evidencias de PE y 60 pacientes sin evidencias de PE las cuales se parearon por edad gestacional con respecto al grupo de PE.

Tamaño de la muestra: Tomando en cuenta la incidencia anual de la PE en el Instituto Nacional de Perinatología y por la temporalidad del estudio nos propusimos incluir un total de 30 pacientes con evidencias de PE y 30 pacientes sin evidencias de PE las cuales se parearon por edad gestacional con respecto al grupo de PE.

Criterios de selección

Criterios de inclusión Pacientes con gestación de feto único, con más de 20 semanas al momento de la toma de muestra corroboradas por clínica (fecha de

última menstruación confiable, exploración física) con diagnóstico de preeclampsia con datos de severidad o sin datos de severidad

Criterios de exclusión Aquellas pacientes que presenten cualquier proceso inflamatorio, (incluyendo obesidad mórbida), diagnosticado clínica o bioquímicamente, así como pacientes con diabetes mellitus y/o hipertensión crónica.

Criterios de eliminación Pacientes cuya muestra no se procesó adecuadamente.

Variables de estudio

Variable independiente Pacientes con diagnóstico de preeclampsia

Variable dependiente Porcentaje de linfocitos, células Natural Killers (NK), monocitos. Expresión relativa de las moléculas CD279, CD25, CD52, CD56, o TREM-1, HLA-DR, CD16, CD11a y CD11b en los leucocitos anteriormente mencionados.

Obtención del suero materno

Se obtendrá una muestra de sangre materna humano, 5 mililitros por punción venosa, en tubos que contengan K2-EDTA, en pacientes que cursen gestaciones de menos de 20 semanas, en ausencia de cualquier proceso inflamatorio agudo, incluyendo obesidad mórbida, infecciones del tracto reproductor, respiratorio, gastrointestinal o sepsis, enfermedades autoinmunes con evidencia de actividad clínica o bioquímica, o presencia de sangrado transvaginal activo en el momento de la toma de muestra, además de comorbilidades como diabetes mellitus, diabetes gestacional e hipertensión crónica. La muestra no podrá durar mas de 4 horas sin procesarse.

Caracterización celular

La caracterización e identificación de células inmunológicas será realizada mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos para los leucocitos presentes (Linfocitos, células NK, monocitos y polimorfonucleares).

Citometria de flujo

Fenotipificación celular

Partiendo de 300 µL de sangre periférica colectados en tubos con EDTA, los leucocitos fueron fenotipificados por inmunensayos. Esta técnica consistió en la incubación de la sangre con las cantidades especificadas de los anticuerpos anti-CD45 (Biolegend, Cat 304029), CD3 (BD, 555334), CD4 (eBiosciences, Cat 47-0048-42), CD19 (Biolegend, Cat 302218), CD16 (Biolegend, Cat 302019), CD56 (Biolegend, Cat 318328), CD279 (Biolegend, Cat 329906), CD25 (Biolegend, Cat 356108) y CD152 (Biolegend, Cat 349908) conjugados con los fluorocromos AF488, PE-Cy5, PE-Cy7, PE, APC, APC-Cy7, Brilliant-Violet510 y Brilliant-Violet421 a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente, la sangre se incubó 10 minutos más, en las mismas condiciones, con solución de lisis de eritrocitos y fijación 1x (FACS, Lysing solution, BD). Las células sanguíneas se concentraron a través de su centrifugación a 400 xg durante 5 min a 15 °C y resuspendidas en el volumen residual. Los leucocitos fueron analizados en un citómetro de flujo FACS Aria III (BD) con el programa DIVA V 6.0. La expresión relativa de las moléculas CD16 CD279, CD25 y CD152 fue obtenida como la medida de la fluorescencia del fluorocromo utilizado acoplado al anticuerpo específico en los leucocitos con el fenotipo: Linfocitos T cooperadores (FSC_{low}SSC_{low}CD45⁺CD3⁺CD4⁺), Linfocitos T citotóxicos

(FSClowSSClowCD45+CD3+CD4-), Linfocitos B (FSClowSSClowCD45+CD19+HLA-DR+), NK (FSClowSSClowCD45+CD16+CD56+CD3-).

Análisis estadístico

Los datos clínicos maternos y el perfil de expresión de los receptores de superficie serán analizados mediante la prueba de ANOVA de una sola vía y por la prueba post-hoc de Tukey. Finalmente. Los valores serán presentados como la media \pm error estándar con una diferencia significativa menor a 0.05

RESULTADOS

Características de las pacientes

En el periodo del 10 de abril de 2015 al 29 de junio de 2016 obtuvimos un total de 23 pacientes las cuales fueron asignadas a dos grupos de acuerdo a la presencia (n= 15) o ausencia (n= 8) en el desarrollo de las características clínicas de preeclampsia de acuerdo a los criterios de inclusión. Las características de la población de estudio se muestran en la tabla 1.

La edad materna, talla, el peso, y la presión arterial sistólica y diastólica aumentaron significativamente 1.3- ($p = 0.013$), 1.06- ($p = 0.018$), 1.13- ($p = 0.109$), 1.3- ($p \leq 0.001$), y diastólica 1.34-veces ($p \leq 0.001$) en las pacientes con signos y síntomas de preeclampsia (tabla 1). El índice de masa corporal aumento 1.18-veces en las pacientes con signos y síntomas de preeclampsia; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p = 0.102$; tabla 1). La edad gestacional al momento del nacimiento en el grupo de preeclampsia disminuyo significativamente 1.2-veces con respecto al grupo control ($p = 0.001$; tabla 1).

El análisis de bioquímico de gabinete mostró aumento en la concentración de creatinina (0.59 ± 0.13), lactato deshidrogenasa (417.2 ± 45.5) y de las dos principales aminotransferasas glutamato-piruvato (TGO; 23.8 ± 13.9) y glutamoato-piruvato (TGP; 23.7 ± 11.1).

Fenotipificación celular

Se determinó la expresión relativa en los receptores de superficie con marcadores específicos de funcionalidad en linfocitos T (figura 1), y B (figura 2), células NK (figura 3), monocitos clásicos (figura 4) y neutrófilos (figura 5).

En la subpoblación de los linfocitos T CD4⁺ (fig. 1) y B (fig. 2) para los marcadores de tipo CD279 (fig. 1A), CD25 (B), y CD152 (C) respectivamente, no mostraron diferencias en la intensidad de expresión de los receptores superficiales entre las pacientes con desarrollo de preeclampsia y el grupo de pacientes sanas.

En la subpoblación de las células NK observamos un aumento significativo de 3-veces la expresión en el receptor de superficie de tipo CD16 (fig. 3A, $p = 0.05$), y una disminución significativa de 2-veces la expresión del receptor de tipos CD152 (fig. 3D, $p \leq 0.001$) en las pacientes con desarrollo de preeclampsia con respecto a las pacientes sanas. En ésta misma población celular, no observamos cambios significativos en la intensidad de expresión en los receptores CD56 (fig. 3B), y CD25 (C) entre las pacientes con desarrollo de preeclampsia y el grupo de pacientes sanas.

En la subpoblación de monocitos clásicos (fig. 4) observamos cambios significativos en la intensidad de expresión para los receptores de superficie de tipo CD16 (B), y HLA-DR (C) en las pacientes con desarrollo de preeclampsia con respecto a las pacientes sanas. En tanto que en los receptores CD14 (A), TREM-1 (D), CD11a (E) y CD11b (F) no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En la subpoblación de neutrófilos (fig. 5) no observamos cambios en la intensidad de expresión para los receptores de superficie de tipo CD16 (A), TREM-1, (B), CD11a (C) y CD11b (D) entre las pacientes con desarrollo de preeclampsia y las pacientes sanas.

DISCUSIÓN

En los embarazos que cursan con preeclampsia, existe una respuesta inflamatoria generalizada, la cual es diferente y mas intensa que un embarazo normal. La preeclampsia continua siendo una “enfermedad de teorías, debido a que muchas incognitas continúan a pesar de conocer los mecanismos fisiopatológicos y etiopatogenicos, aspectos que reflejan la dificultad de estudios de tamizaje y tratamiento profiláctico efectivo. [1]

La preeclampsia es la consecuencia de invasión trofoblastica deficiente a nivel de las arterias espirales, resultando es isquemia uteroplacentaria y es responsable por la aparición de hipoxia crónica, disfunción endotelial generalizada la cual lleva a hipertensión arterial y daño orgánico materno. [20] En los embarazos normales se caracterizan por un estado de inflamación inocua controlada, la cual se localiza en el sitio de implantación durante los primeras etapas y generaliza en el tercer trimestre del embarazo. Aunque la mayoría de los autores apoyan la presencia de una repuesta inflamatoria generalizada en los embarazos con preeclampsia, la cual es ms intensa comparada con embarazos normales, existen diferencias entre los resultados evaluando diferentes componentes de reacción inflamatoria. [1,20]

Los principales hallazgos de este estudio son Con respecto a los receptores de superficie encontramos que en las células NK un aumento en la expresión de los receptores de superficie de tipo CD16 ($p \leq 0.001$) y una disminución en los receptores CD152 ($p = 0.05$) en las pacientes con preeclampsia con respecto a las pacientes sanas.

En estudios similares por Ebtisam (2012), reportan que la evidencia indica que en las pacientes que cursan con preeclampsia los monocitos circulantes muestran un

estado de activación aberrante, con alteración de expresión en los niveles de antígenos de superficie, citosinas y especies que reaccionan con oxígeno en comparación con pacientes con embarazo sano. [2]

En nuestros resultados podemos observar el mismo patrón con los mismos antígenos de superficie estando presentes en pacientes con preeclampsia no así en pacientes con embarazo sano (figura 3), no existió diferencia significativa en Linfocitos T o Linfocitos B. El CD16 es un receptor de baja afinidad al receptor Fc, es una molécula de cúmulo de diferenciación que se encuentra en la superficie de células NK, Neutrófilos, Leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos. [21]. El CD16 se ha identificado como receptores Fc FcγRIIIa (CD16a) and FcγRIIIb (CD16b). Estos receptores se unen a la porción Fc de los anticuerpos IgG los cuales activan a la células NK para citotoxicidad mediada por células y anticuerpo dependiente. Una deficiencia de CD16 en una población de neutrófilos puede indicar prematuridad y puede ser causada por una desviación a la izquierda debido a leucocitosis neutrofílica inducida por necrosis tisular. [22]

CONCLUSIONES

La citometría de flujo en búsqueda de CD16 y CD52 puede ser utilizada como un biomarcador en el diagnóstico temprano de preeclampsia.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se desarrolló con fondos federales al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) mediante el proyecto con número de registro 212250-3210091(otorgado a HFH). Los resultados de este estudio fueron parcialmente presentados en el XXII Congreso Nacional de Inmunología (Zacatecas, 2016).

Agradecimiento a la Dra. Ana Cristina Arteaga, Dr. Marco Ortiz Ramírez y M.C. Hector Flores, sin su apoyo este trabajo no pudiera haber sido concluido.

BIBLIOGRAFIA

1. Brett C. Young, R.L.a.A.K., *Pathogenesis of Preeclampsia*. The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2010. **5**: p. 173M192.
2. Ebtisam Al-ofi, Seth B. Coffelt *Monocyte Subpopulations from Pre-Eclamptic Patients Are Abnormally Skewed and Exhibit Exaggerated Responses to Toll-Like Receptor Ligands*. PLoS ONE. July 2012. Vol 7. Issue 7. E42217
3. American College of, O., Gynecologists, and P. Task Force on Hypertension in, *Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy*. Obstet Gynecol, 2013. **122**(5): p. 1122M31.
4. Too, G.T. and J.B. Hill, *Hypertensive crisis during pregnancy and postpartum period*. Semin Perinatol, 2013. **37**(4): p. 280M7.
5. *Report of the National High Blood Pressure Education Program. Working group report on high blood pressure in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 183: S1–22. doi: 10.1067/mob.2000.107928
6. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986) *Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants*. Br J Obstet Gynaecol 93: 1049–1059. doi: 10.1111/j.1471-0528.1986.tb07830.x
7. Furuya M, Ishida J, Aoki I, Fukamizu A (2008) *Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension*. Vasc Health Risk Manag 4: 1301–1313.
8. Yinon Y, Kingdom JC, Odutayo A, Moineddin R, Drewlo S, et al. (2010) *Vascular dysfunction in women with a history of preeclampsia and intrauterine growth restriction: insights into future vascular risk*. Circulation 122: 1846–1853. doi: 10.1161/circulationaha.110.948455
9. Veas CJ, Aguilera VC, Munoz IJ, Gallardo VI, Miguel PL, et al. (2011) *Fetal endothelium dysfunction is associated with circulating maternal levels of sE-selectin, sVCAM1, and sFlt-1 during pre-eclampsia*. J Matern Fetal Neonatal Med. doi: 10.3109/14767058.2011.556204
10. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, et al. (1989) *Preeclampsia: an endothelial cell disorder*. Am J Obstet Gynecol 161: 1200–1204. doi: 10.1016/0002-9378(89)90665-0
11. Sibai BM (2004) *Preeclampsia: an inflammatory syndrome?* Am J Obstet Gynecol 191: 1061–1062. doi: 10.1016/j.ajog.2004.03.042
12. Ahn H, Park J, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J (2010) *Immunologic Characteristics of Preeclampsia, a Comprehensive Review*. Am J Reprod Immunol 65: 377–394. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00913.x
13. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM (2010) *Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy*. J Leukoc Biol 88: 625–633. doi: 10.1111/j.1749-7474.2010.02311.x
14. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, et al. (2001) *Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol 185: 792–797. doi: 10.1067/mob.2001.117311
15. Holthe MR, Staff AC, Berge LN, Lyberg T (2004) *Leukocyte adhesion molecules and reactive oxygen species in preeclampsia*. Obstet Gynecol 103:

- 913–922. doi: 10.1097/01.aog.0000124806.39111.ba
16. Luppi P, Deloia JA (2006) *Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines*. Clin Immunol 118: 268–275. doi: 10.1016/j.clim.2005.11.001
 17. Nagamatsu T, Schust DJ (2010) *The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface*. Reprod Sci 17: 209–218. doi: 10.1177/1933719109349962
 18. Kim JS, Romero R, Cushenberry E, Kim YM, Erez O, et al. (2007) *Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor*. Placenta 28: 571–576. doi: 10.1016/j.placenta.2006.07.007
 19. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, et al. (2010) *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood 116: e74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558
 20. Dan MIHU, Lavinia SABAU, et al *Evaluation of Leukocytes and Neutrophils, Markers of Inflammatory syndrome in Preeclampsia*. Applied Medical Informatics. Vol. 27, No. 3/2010, PP: 15-22
 21. Janeway, Charles (2001). "Appendix II. CD antigens". *Immunobiology* (5 ed.). New York: Garland. ISBN 0-8153-3642-X.
 22. Vidranski, V; Laskaj, R; Sikiric, D; Skerk, V (2015). "Platelet satellitism in infectious disease?". Biochem Med (Zagreb) 25: 285–94

TABLAS

Tabla 1. Características demográficas de pacientes que cursaron con preeclampsia y controles.

	Control (n= 8)	Preeclampsia (n=15)	<i>p</i>
Edad materna (años)	23.1 ± 5.8	31.4 ± 7.4	0.013
Talla (cm)	1.5 ± 0.02	1.6 ± 0.04	0.018
Peso (Kg)	68.8 ± 5.15	60.4 ± 13.2	0.109
IMC (kg/m ²)	24.4 ± 2.4	28.9 ± 6.3	0.102
Presión arterial sistólica	111.4 ± 6.9	146.8 ± 10.5	≤0.001
Presión arterial diastólica	68.3 ± 4.1	91.7 ± 23.0	0.001
Edad gestacional	38.7 ± 1.9	32.2 ± 6.5	≤0.001

FIGURAS

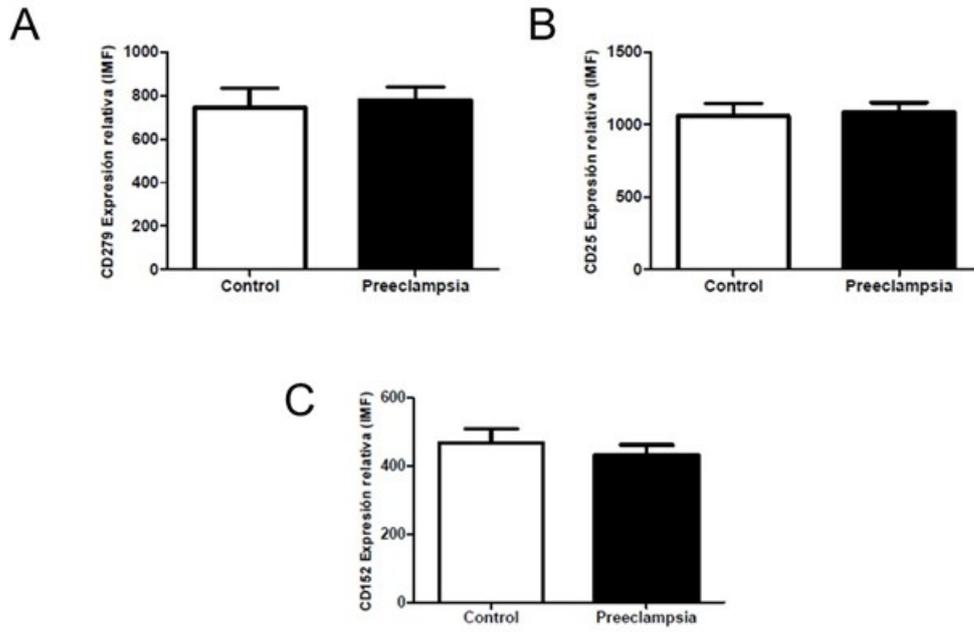


Figura 1

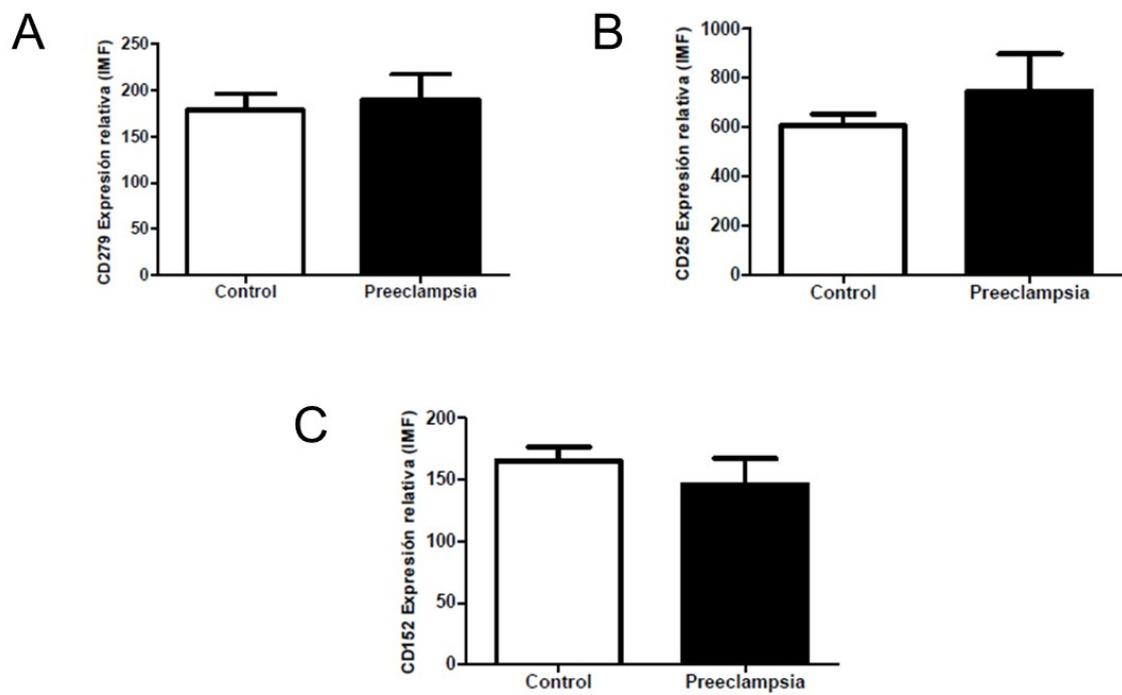


Figura 2

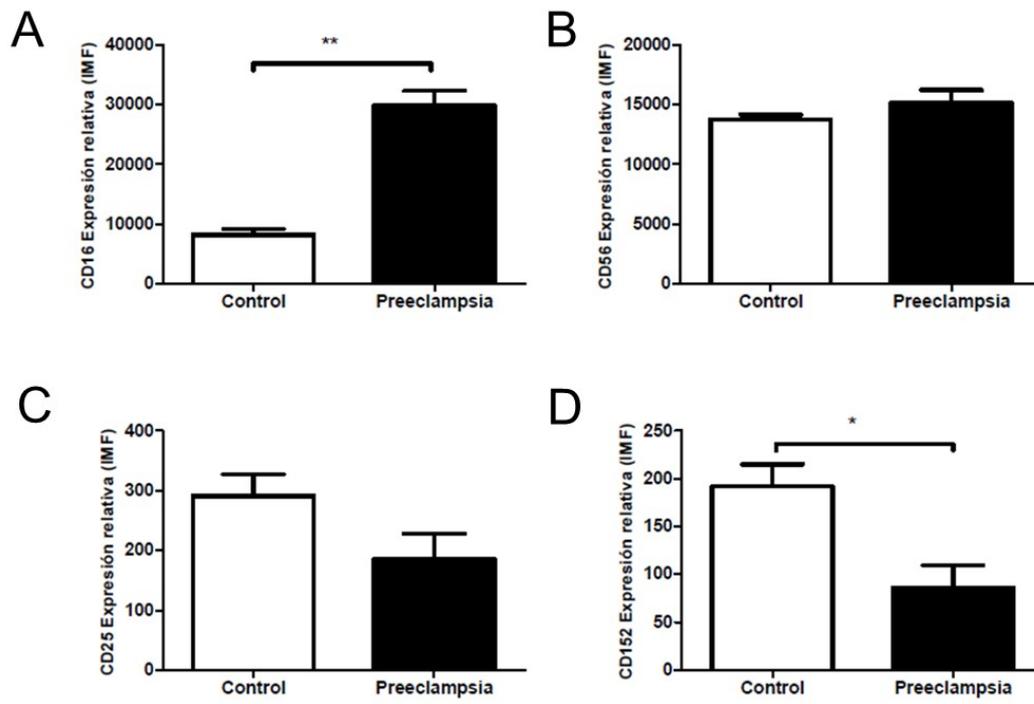


Figura 3

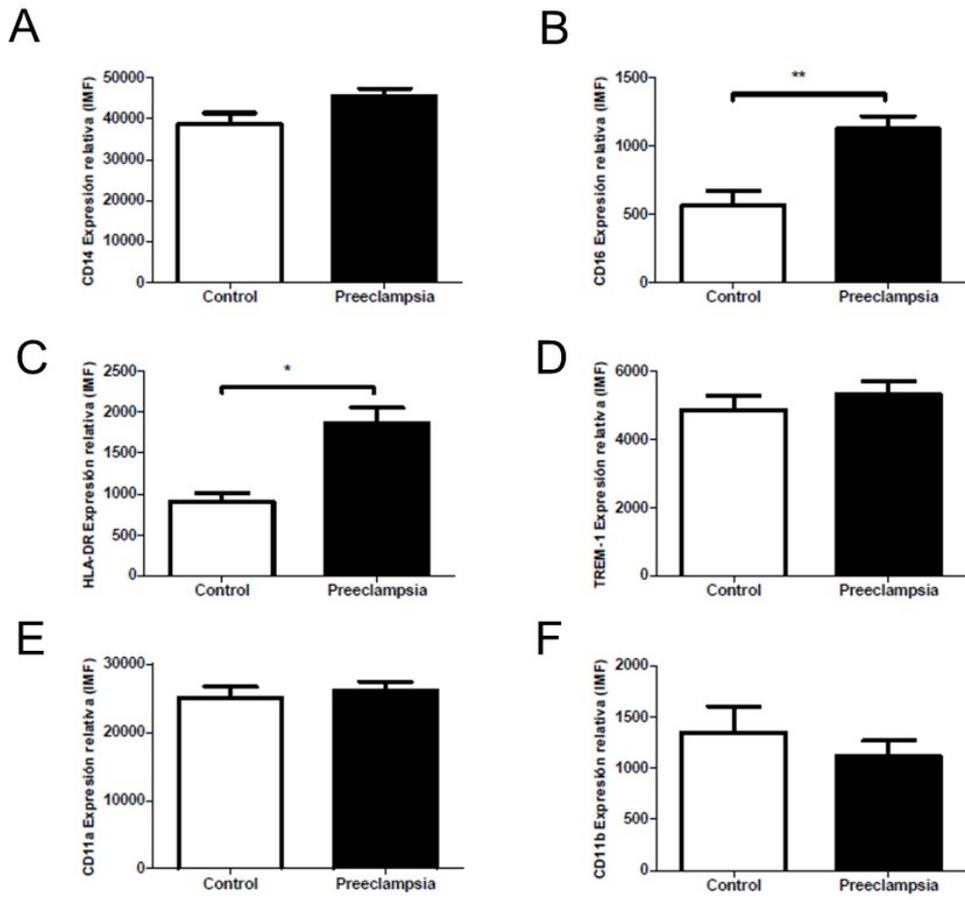


Figura 4

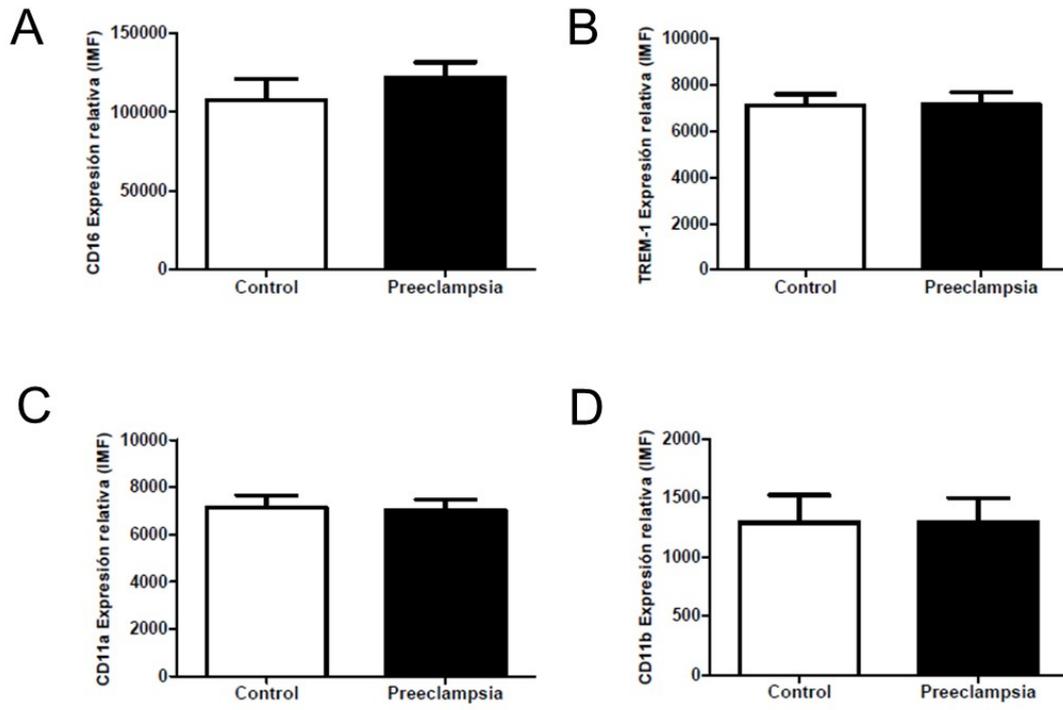


Figura 5

PIES DE FIGURAS

Figura 1 Perfil de expresión los linfocitos T CD4⁺ Se analizaron tres receptores de superficie CD279 (A), CD25 (B), y CD152 (C) en las pacientes sanas (control) y en las pacientes con desarrollo de preeclampsia (casos).

Figura 2 Perfil de expresión los linfocitos B. Se analizaron tres receptores de superficie CD279 (A), CD25 (B), y CD152 (C) en las pacientes sanas (control) y en las pacientes con desarrollo de preeclampsia (casos).

Figura 3 Perfil de expresión células NK. Se analizaron cuatro receptores de superficie CD16 (A), CD56 (B), CD25 (C) y CD152 (D) en las pacientes sanas (control) y en las pacientes con desarrollo de preeclampsia (casos).

Figura 4 Perfil de expresión en monocitos clásicos. Se analizaron seis receptores de superficie CD14 (A), CD16 (B), HLA-DR (C) y TREM-1 (D), CD11a (E), y CD11b (F). en las pacientes sanas (control) y en las pacientes con desarrollo de preeclampsia (casos).

Figura 5 Perfil de expresión en neutrófilos. Se analizaron cuatro receptores de superficie CD16 (A), TREM-1(B), CD11a (C) y CD11b (D) en las pacientes sanas (control) y en las pacientes con desarrollo de preeclampsia (casos).

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha de inicio 10 de abril del 2015

Fecha de término: 29 de junio 2016

ACTIVIDAD	MES CALENDARIO PROGRAMADO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	X	X	X		X	X				X	X	
PREPARACIÓN DEL PROYECTO	X	X										
COLECTA DE LAS MUESTRAS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE					X	X	X			X	X	
REVISIÓN DE EXPEDIENTES							X				X	
PROCESAMIENTO DE DATOS						X	X				X	
ANÁLISIS DE INFORMACIÓN							X				X	
PRESENTACION DE RESULTADOS EN CONGRESO											X	
AVANCES DE TESIS							X	X		X	X	
OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO												X