



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

“DR EDUARDO LICEAGA”

TITULO

EXPRESION DE EXOSOMAS URINARIOS
DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO
EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN NEFROLOGIA

P R E S E N T A:

DRA. ELBA ONELIDA MEDINA HERNANDEZ

TUTOR

DR RAFAEL VALDEZ ORTIZ



DR. EDUARDO LICEAGA

Ciudad de México D.F; Julio 2016



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.

El presente trabajo se realizó en

En el Servicio de ginecología y Obstetricia del Hospital General de México, agradezco su colaboración al Dr. Jesús Carlos Briones Garduño y Dr. Ángel Augusto Pérez Catalayud.



En el laboratorio de Investigación de Metabolismo Mineral y Óseo del Hospital Infantil de México Federico Gómez, agradezco su confianza y apoyo a la Dra. Mara Medeiros Domingo y a todo su equipo de trabajo.

En la Unidad de Fisiología Molecular perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas y localizado en el INCMNSZ agradezco su colaboración y enseñanza a Dra. Lorena Rojas Vega y Dr. Gerardo Gamba Ayala
MUCHAS GRACIAS!!!



En el servicio de Nefrología del Hospital General de México.
Gracias: Dra. Monserrat Pérez Navarro y al Dr. Rafael Valdez Ortíz

Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido en hombros de gigantes

Isaac Newton

HOJA DE FIRMAS

DR. LINO E. CARDIEL MARMOLEJO
DIRECTOR DE EDUCACIÓN Y CAPACITACIÓN EN SALUD

DRA. MARIA DEL CARMEN CEDILLO PEREZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO

DR. RAFAEL VALDEZ ORTÍZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA UNIDAD 105B
(TUTOR DE TESIS)

| Índice | pág. | |
|---|-------------|---|
| 1. Resumen..... | 4 | 10. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....23 |
| 2. Abreviaturas..... | 5 | 11. Procedimiento..... 24 |
| 3. Marco Teórico | | 12. Análisis estadístico.....27 |
| <i>Preeclampsia</i> | 6 | 13. Resultados..... 28 |
| Diagnóstico de preeclampsia | | 17. Discusión..... 36 |
| <i>Riñón</i> | 9 | 18. Conclusiones.....36 |
| Componentes de la nefrona | | 20. Referencias.....36 |
| <i>Túbulo contorneado distal</i> | | 21. Cronograma..... 39 |
| El sodio y el riñón: cotransportador renal de Na ⁺ Cl ⁻ (NCC) | 10 | 22. Anexos |
| <i>Dimorfismo sexual</i> | | <i>Anexo 1:</i> Hoja de recolección de datos.....40 |
| <i>Embarazo y hormonas</i> | 13 | <i>Anexo 2:</i> Hoja de consentimiento informado grupo controles..... |
| Estrógenos | | <i>Anexo 3:</i> Hoja de consentimiento informado grupo casos..... |
| Progesterona | | |
| Prolactina | | |
| <i>Exosomas urinarios</i> | 17 | |
| 3. Planteamiento del problema..... | 19 | |
| 4. Justificación..... | 20 | |
| 5. Hipótesis..... | 21 | |
| 6. Pregunta de investigación..... | 20 | |
| 7. Objetivos..... | 22 | |
| 8. Tipo de diseño del estudio | 23 | |
| 9. Población y tamaño de la muestra..... | 23 | |

1. RESUMEN

Antecedentes

El NCC es localizado en la parte inicial del túbulo contorneado distal y se encarga de la regulación final del sodio con una reabsorción de únicamente 5-10%, jugando un papel central en el control de la presión sanguínea. NCC es el sitio de acción de los diuréticos tipo tiazida, fármacos utilizados en la práctica clínica y considerados como la primera opción farmacológica en el tratamiento de la hipertensión arterial. De forma experimental se ha observado una regulación hormonal del cotransportador NCC a estrógenos, prolactina y progesterona en modelos murinos.

Planteamiento del problema

La preeclampsia es una enfermedad del embarazo y afecta a un 3-6% de los embarazos. Se encuentra asociada con riesgo alto de parto pretérmino y mortalidad perinatal. En México, datos del consejo de evaluación de mortalidad materna del 2010, mostró que los trastornos hipertensivos del embarazo corresponden a la causa número uno de defunción materna. El estudio de factores de la posible participación de NCC con el desarrollo de preeclampsia permitirá conocer un aspecto no estudiado de su fisiopatología

Objetivos

General: Evaluar la expresión del cotransportador NCC sodio-cloro sensible a tiazidas SLC12A3 fosforilado mediante la cuantificación de la expresión de exosomas urinarios en mujeres embarazadas con y sin pre-eclampsia del Hospital General de México.

Específicos: Identificar las variables clínicas asociadas con la expresión de exosomas urinarios del cotransportador NCC fosforilado en pacientes embarazadas. Correlacionar la expresión de exosomas urinarios del NCC fosforilado con niveles séricos de estrógenos, progesterona y prolactina, y tensión arterial de mujeres embarazadas.

Hipótesis: Si la expresión del cotransportador sodio-cloro sensible a tiazidas SLC12A3 (NCC) fosforilado se encuentra relacionado con el desarrollo de preeclampsia entonces las mujeres que presenten preeclampsia mostrarán una expresión de NCC fosforilado mayor o igual al 10% en comparación con las mujeres embarazadas en ausencia de preeclampsia.

Metodología

Se trata de un estudio de casos y controles en el que se incluirán pacientes embarazadas con ≥ 20 semanas de gestación que acudan al servicio de ginecología, las cuales serán clasificadas de acuerdo a la presencia o no de preeclampsia de acuerdo a los criterios del American College of Obstetricians and Gynecologists 2013. En ambos grupos se tomarán variables clínicas y de laboratorios entre ellas la medición del cotransportador NCC fosforilado en exosomas urinarios. Las pacientes serán pareadas por edad y semanas de gestación.

Los datos obtenidos serán analizados en el paquete estadístico SPSS 22.0, donde se obtendrán medidas de tendencia central, se empleará t de student y X^2 para diferencia de medias y proporciones, se realizará correlación de Pearson entre las diferentes variables continuas de interés, considerando un IC al 95%, y valor de $p \leq 0.05$.

Abreviaturas

| | |
|------------------------------------|---|
| a.a | Aminoácidos |
| AAH | Asa ascendente de Henle |
| Ca²⁺ | Calcio |
| CD | Conducto colector |
| Cl⁻ | Cloro |
| ER | Receptor de estrógenos |
| E2 | Estradiol |
| ENaC | Canal de Na ⁺ epitelial sensible a amilorida |
| FeNA | Fracción excretada de sodio |
| FeBUN | Fracción excretada de urea |
| GPGR | Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G |
| GR | Receptor de insulina |
| HCO₃⁻ | Bicarbonato |
| HTA | Hipertensión arterial |
| IR | Receptor de Insulina |
| K⁺ | Potasio |
| mRNAs | Ácidos ribonucleicos mensajeros |
| miRNA | Micro ácido ribonucleico |
| MVB | Cuerpos multivesiculares |
| MR | Receptor de mineralocorticoides |
| Na⁺ | Sodio |
| NCC | Cotransportador Na ⁺ : Cl ⁻ sensible a tiazidas |
| pNCC | NCC fosforilado |
| PR | Receptor de progesterona |
| PAM | Presión arterial media |
| PRL | Prolactina |
| PRLR | Receptor de prolactina |
| SPAK | STE-20 proline-alanine-rich kinase |
| TP | Túbulo proximal |
| TCD ó DCT | Túbulo contorneado distal |
| TFG | Tasa de Filtrado glomerular |
| w.b. | Western blot |

2. MARCO TEORICO

La fisiología femenina tiene fenómenos únicos como la menstruación, el embarazo y la lactancia que para su función requieren de la retención de volumen.

El cotransportador Na⁺: Cl⁻ (NCC), es una proteína que se ha reportado tener una regulación dimórfica en ambos géneros en muestras de rata, ratón y humano. En los humanos en particular, diferencia es observada tanto en la expresión como en fosforilación/ activación de NCC. Dichas diferencias estuvieron relacionadas con una mayor expresión y fosforilación/activación de la cinasa maestra encargada de activar a NCC, STE-20 proline-alanine-rich kinase (SPAK), siendo mayor en mujeres que en hombres, debido a que las hormonas ováricas y la prolactina son las responsables de la regulación dimórfica sexual.

Esta regulación dimórfica también observada en humanos, dio la pauta para poder analizar el estado del cotransportador NCC en mujeres embarazadas con preeclampsia, ya que el embarazo condiciona modificación en la producción de hormonas sexuales para mantener el embarazo y llegar a término.

No encontramos hasta el momento ningún estudio que evalué la modificación que tiene el cotransportado NCC en respuesta al cambio hormonal durante el embarazo y su posible asociación con preeclampsia, debido a que la actividad de este cotransportador es crítica para la regulación de múltiples variables fisiológicas como son la presión sanguínea, el potasio sérico, el metabolismo ácido-base y excreción de calcio urinario.

PREECLAMPSIA

La preeclampsia, es una enfermedad multisistémica caracterizada por hipertensión, proteinuria y/o disfunción a órganos-diana después de la semana 20 de gestación en una mujer embarazada previamente normotensa. Estos embarazos incrementan el riesgo para mortalidad materna y/o fetal o morbilidad seria.^{1,2} La condición complica cerca del 3-6% de los embarazos, con un 1.5 a 2 veces mayor incidencia en el primer embarazo.³ La hipertensión severa y signos/síntomas de daño a órgano blanco son considerados un espectro severo de la enfermedad. Mientras que la eclampsia se refiere al desarrollo de crisis convulsivas en mujeres con preeclampsia, en la ausencia de otras condiciones neurológicas que podrían contribuir a las crisis convulsivas.⁴

Son considerados como factores de riesgo para la presencia de preeclampsia, el primer embarazo (nuliparidad), historia familiar de preeclampsia en familiar de primer

grado, embarazo gemelar, edad materna avanzada, condiciones médicas preexistentes como diabetes pregestacional, presión sanguínea mayor o igual a 130/80mmHg en la primer visita prenatal, anticuerpos antifosfolipidos, índice de masa corporal ≥ 26.1 , enfermedad renal crónica, en este sentido se ha observado que la historia previa de preeclampsia incrementa el riesgo de desarrollar preeclampsia en embarazos subsecuentes con un RR de 7.19, 95% IC 5.85-8.83, comparados con mujeres sin historia de preeclampsia.⁵ La fisiopatología de la preeclampsia probablemente involucra tanto factores maternos como factores fetoplacentarios. Anormalidades en el desarrollo de la vasculatura placentaria temprana es considerada una causa primaria de relativa perfusión baja, hipoxia, e isquemia, lo cual conduce a la liberación de numerosos factores dentro de la circulación materna que alteran la función endotelial sistémica materna, causa HTA y otras manifestaciones de la enfermedad. Aunque el anormal remodelado de la arteria es ampliamente considerado como un rol crítico, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes permanecen oscuros^{6,7} Pequeños cambios en la presión sanguínea son un marcador de riesgo de desarrollo preeclampsia, mujeres que subsecuentemente desarrollan preeclampsia tienen más alta presión sistólica así como presión arterial media (PAM) antes del inicio clínico de la enfermedad.⁸

Estableciendo el diagnóstico de preeclampsia:

El colegio Americano de ginecología y obstétrica, convoco a un grupo de trabajo de expertos en el manejo de hipertensión en el embarazo y publico sus recomendaciones basadas en la evidencia para la práctica clínica, el cual lo engloba en cuatro categorías: **1)** preeclampsia-eclampsia, **2)** hipertensión crónica (de cualquier causa), **3)** Hipertensión crónica con preeclampsia superimpuesta y **4)** hipertensión gestacional.

En cuanto a preeclampsia- eclampsia, se ha reconocido la naturaleza sindrómica de la preeclampsia, por lo que el panel de expertos elimino la proteinuria como parte indispensable del criterio diagnóstico. En ausencia de proteinuria, la preeclampsia es diagnosticada como hipertensión en asociación con otras características clínicas.

Criterios diagnósticos de preeclampsia

- 1)** Presión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg ó mayor o igual a 90 mmHg de presión diastólica en dos ocasiones con al menos 4 horas de diferencia posterior a las 20 semanas de gestación en mujer con presión arterial normal previa, o Presión arterial sistólica 160 mmHg o mayor, o presión arterial diastólica de 110 mmHg puede ser confirmada dentro de un intervalo corto (minutos) para facilitar la terapia antihipertensiva oportuna.

Y **a)** proteinuria definida como la excreción de 300mg o más de proteínas en la recolección de orina de 24 horas. Alternativamente el tiempo de excreción que es extrapolada a el valor de orina de 24 horas o a la razón proteína/creatinina a por lo menos 0.3 (cada medida como mg/dl) es usada.

En ausencia de proteinuria, la hipertensión de nuevo inicio con el nuevo inicio de cualquiera de los siguientes hace el diagnóstico:

- b)** Trombocitopenia (conteo de plaquetas menor de 100,000/ microlitos)
- c)** Daño hepático (elevación en sangre de transaminasas dos veces la concentración normal)
- d)** Desarrollo nuevo de insuficiencia renal (elevación de creatinina sérica mayor de 1.1mg/dl o el doble de la concentración sérica en ausencia de otra enfermedad renal)
- e)** Edema pulmonar
- f)** Nuevo inicio de alteraciones cerebrales o visuales

Para considerar que la paciente cursa con preeclampsia severa se toman los siguientes parámetros

- a) Presión arterial sistólica 160 mmHg o mayor, o presión arterial diastólica de 110 mmHg o mayor en dos ocasiones al menos 4 horas de diferencia mientras el paciente se encuentra recostada en cama (a menos que el antihipertensivo se inicie antes de tiempo).
- b) Trombocitopenia (conteo de plaquetas menor de 100,000/ microlitros)
- c) Daño hepático (elevación en sangre de transaminasas dos veces la concentración normal)
- d) Desarrollo nuevo de insuficiencia renal (elevación de creatinina sérica mayor de 1.1mg/dl o el doble de la concentración sérica en ausencia de otra enfermedad renal)
- e) Edema pulmonar
- f) Nuevo inicio de alteraciones cerebrales o visuales

Eclampsia

Es la fase convulsiva de la enfermedad y es considerada entre las manifestaciones más severas de la enfermedad, frecuentemente precedido por eventos premonitorios tal como cefalea severa e hiperreflexia, pero puede ocurrir en ausencia de estos signos o síntomas

Preeclampsia con criterios de severidad

- a) Hipertensión Presión arterial sistólica 160 mmHg o mayor, o presión arterial diastólica de 110 mmHg o mayor en dos ocasiones al menos 4 horas de diferencia mientras el paciente se encuentra recostada en cama (a menos que el antihipertensivo se inicie antes de tiempo)
- b) Cefalea
- c) Dolor en hipocondrio derecho⁹

Breve anatomía del Riñón

Los componentes específicos del riñón son las nefronas, el conducto colector y una única microvasculatura.

Una nefrona consiste de un corpúsculo renal (glomérulo) conectado a un enmarañado y tortuoso túbulo que finalmente drena dentro de un ducto colector. El glomérulo comprende un penacho de capilares especializados unido al mesangio. Un ducto colector es formado en la corteza renal cuando varias nefronas se unen.

Túbulos renales. El túbulo renal es subdividido dentro de varios distintos segmentos: un túbulo proximal (TP), un túbulo intermedio, un túbulo distal y el conducto colector.

El asa de Henle comprende la parte recta del túbulo proximal (representando el engrosamiento ascendente del asa), la parte delgada descendente y la parte delgada ascendente (ambas extremidades delgadas representan la porción intermedia), y la porción ascendente (representa la porción del túbulo distal), la cual incluye la mácula densa

El túbulo contorneado distal (TCD). El epitelio es bastante altamente diferenciado, mostrando la mayoría de interdigitaciones basolaterales de las células y mayor densidad de mitocondrias en todas las porciones de la nefrona, en este segmento de la nefrona es donde ocurre la regulación fina¹⁰.

Aunque el TCD sólo reabsorbe una pequeña cantidad de Na^+ , es un importante sitio de regulación fina de la reabsorción de Na^+ ya que al estar fuera del alcance de la regulación glomerulotubular puede establecer un gradiente de concentración transepitelial, responde a varias hormonas incluyendo mineralocorticoides y a la hormona antidiurética y es el sitio de acción de antidiuréticos ampliamente utilizados en la clínica llamados tiazidas.

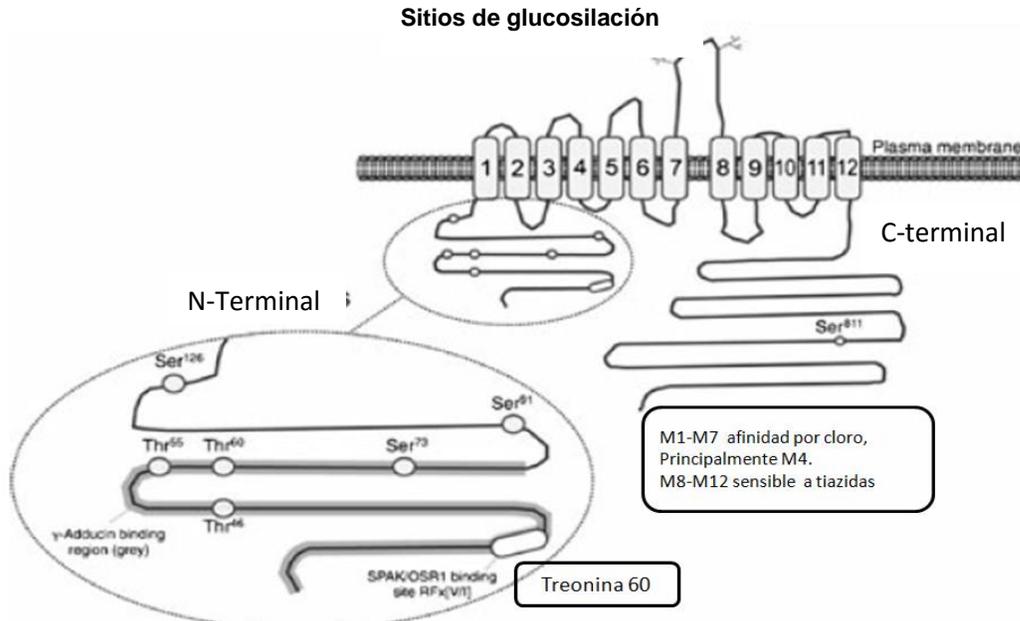
Esta idea se ve reforzada por el hecho de que todos los desordenes monogénicos caracterizados a la fecha con alteraciones en la PA son causados por mutaciones en los genes que codifican para proteínas que afectan el manejo renal distal de sodio ¹¹.

El sodio y el riñón: cotransportador renal de Na^+Cl^- (NCC)

El catión sodio (Na^+) es un principal determinante del volumen extracelular y por lo tanto la presión arterial. Después de la filtración por el glomérulo, la recuperación de sodio en el volumen extracelular requiere el movimiento a través de las células epiteliales del riñón, lo cual implica transporte secuencial a través de la superficie apical y basolateral ^{12,13}. En la parte inicial del túbulo contorneado distal de la nefrona (También llamado DCT1), se encuentra localizado el cotransportador sodio-cloro sensible a tiazidas (NCC).¹⁴ Únicamente 5-10% de la carga filtrada de sodio es reabsorbido en el TCD, es un proceso transcelular impulsado por la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, la cual saca Na^+ hacia el espacio extracelular generando un gradiente de concentración que favorece la entrada de Na^+ por la membrana apical a través de dos diferentes vías: el cotransportador electroneutro NCC y ENaC que reabsorbe Na^+ de manera electrogénica. Esto es posible porque no es afectado por la retroalimentación tubuloglomerular. Debido a esta propiedad, NCC juega un rol pivote en el volumen del líquido extracelular y el control de la presión sanguínea ^{15,16}

El NCC, también conocido como cotransportador SLC12A3, es una proteína de membrana que pertenece a la familia de transportadores SLC12 cloro-catiónicos y se localiza en la membrana apical de las células del TCD de la nefrona, en donde constituye una de las principales vías de reabsorción de Na^+Cl^- ¹⁷. El gen que codifica para el NCC se localiza en el cromosoma 16q13 ¹⁸. Dependiendo de la especie de la que sea clonado el NCC puede contener 1,002 a 1,028 residuos de aminoácidos, con un dominio hidrofóbico central que contiene 12 regiones transmembranales (TM 1-12) interconectadas por seis asas extracelulares y cinco asas intracelulares. El segmento de interconexión más largo está entre la región TM 7 y 8, el cual está glucosilado, por lo que se presume que ve al lado extracelular¹⁹ Mientras que el dominio hidrofóbico central está flanqueado por un dominio amino-terminal corto y un dominio carboxilo-terminal largo, presumiblemente localizado dentro de la célula.²⁰ **Figura 1**

Figura 1 Estructura de NCC



El cotransportador Na⁺: Cl⁻, NCC y su respuesta a fármacos

NCC es sensible a los medicamentos tipo tiazida como hidroclorotiazida, clortalidona, bendroflumetiazida, metazolona, etc. ²¹.

Regulación Hormonal de NCC

Existe evidencia de que los estrógenos, progesterona y prolactina estimulan la expresión y la fosforilación de NCC ya que es conocido que la fosforilación es un sustituto para aumento de la actividad NCC^{22, 23}. Esto quedó demostrado en un estudio en el que la ovariectomía en ratas dio como resultado una disminución de la expresión y fosforilación del cotransportador, de igual manera al administrar estrógenos a ratas masculinas se observó un significativo incremento en la fosforilación de NCC. En este sentido se ha reportado que el estradiol, progesterona y prolactina, hormonas involucradas en el ciclo sexual, embarazo y lactancia, tiene regulación a la alta de la actividad de NCC. Mayor expresión/fosforilación de NCC fue corroborado en humanos por análisis de exosomas urinarios ²⁴.

Numerosas vías de señalización hormonal (aldosterona, angiotensina II, vasopresina, glucocorticoides, insulina, norepinefrina, estradiol, progesterona, prolactina y hormona paratiroidea) regulan la actividad de NCC al mantener la homeostasis de múltiples variables fisiológicas como la presión arterial, potasio sérico, metabolismo ácido-base, excreción urinaria de calcio ²⁵. **Figura 2**

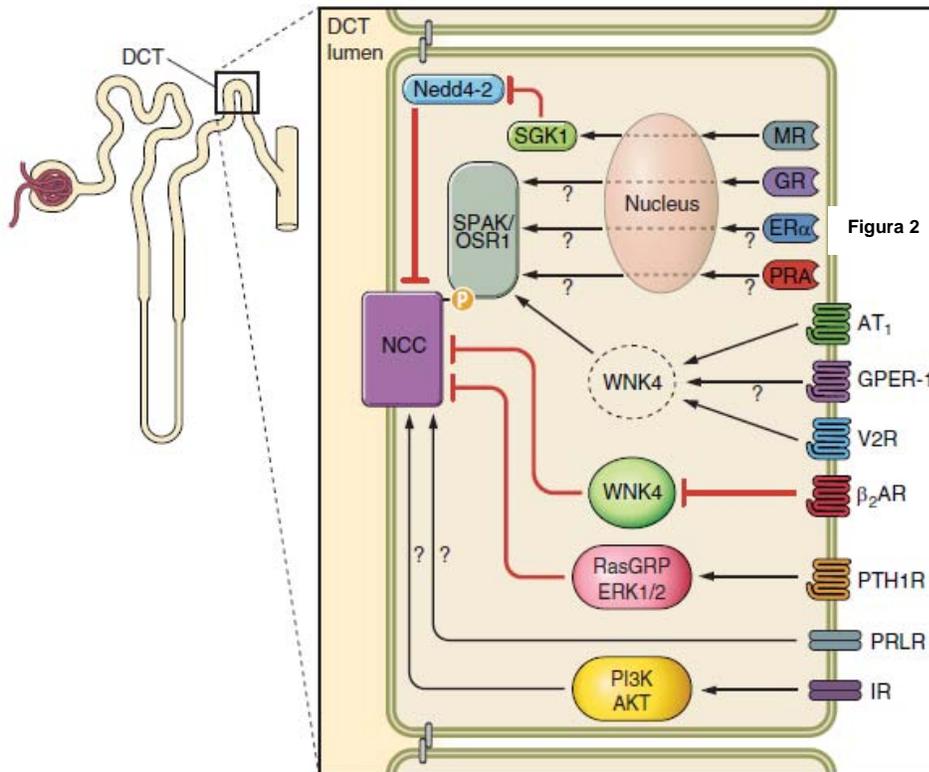


Fig 2. Ilustración de una vía transversa del túbulo contorneado distal (DCT2) Con todas las hormonas conocidas que regula el cotransportador NCC.

Los receptores de hormonas son localizados en la

AJP-Renal Physiol • doi:10.1152/ajprenal.00354.2015 • www.ajprenal

Dimorfismo sexual

Ocurre cuando los sexos de una especie son diferentes uno del otro. Es un fenómeno que se cree evoluciono para asegurar el éxito reproductivo de los individuos. El signo más visible del dimorfismo sexual son las características sexuales secundarias ²⁶. Los cambios dimórficos sexuales se deben al efecto sistémico de las hormonas predominantes en cada uno de los sexos, en el caso de mamíferos las hembras producen en los ovarios dos tipos de hormonas: estrógenos y progestágenos. En el caso de los machos son los andrógenos (principalmente testosterona) secretados y producidos por los testículos ²⁷.

Embarazo y Adaptaciones endócrinas.

El embarazo conduce a cambios profundos anatómicos y fisiológicos en casi todos los órganos. Estas adaptaciones al embarazo, comienzan justo después de la concepción y evoluciona posteriormente.

Las adaptaciones endócrinas maternas a el embarazo involucran el hipotálamo, pituitaria, paratiroidea, tiroides, glándula adrenal, y ovario y están unidas a la interacción de la unidad fetal-placentaria-materna.

Estrógenos

Hormonas sexuales esteroideas (derivadas del colesterol) de tipo femenino principalmente, producidos por los ovarios, la placenta es la principal fuente de estrógenos durante el embarazo. La glándula adrenal fetal provee abundante precursores de estrógeno C19 (dehidroepiandrosterona).

El estradiol (E2) (17 β -estradiol, 1,3,5 (10 β -Estratrien-2,17 β -diol) es un estrógeno natural con una masa molecular de 272,3 daltons. La mayor parte del estradiol circulante esta unido a proteínas. Se estima que solo el 1-3% del estradiol esta libre (no unido).

Receptores de estrógenos

El mecanismo clásico de acción estrogénica es la difusión de estrógenos dentro de la célula donde se une al receptor de estrógenos que se localiza en el núcleo. La unión del receptor de estrógenos (ER) a los estrógenos se le llama complejo estrógeno –ER. El complejo estrógeno –ER se une a la secuencia de elementos de respuesta a E2, directa o indirectamente a través de interacciones proteína-proteína vía la proteína activador 1 (AP1) en la región promotora de los genes responsivos a estrógenos, resultando en el reclutamiento de coactivadores o correpresores al promotor, incrementando o disminuyendo respectivamente los niveles de ARN y la producción de la proteína asociado y su respuesta fisiológica ²⁸. El mecanismo clásico o genómico ocurre típicamente en un transcurso de horas.

En contraste, los estrógenos pueden iniciar respuestas fisiológicas específicas en muchos tejidos en los primeros segundos a minutos después de la unión con su ligando, es decir un mecanismo no- genómico.

Se han clasificado las acciones del receptor de estrógenos con base en la localización de su acción: membranal, citosolico o nuclear.

Se han descrito dos tipos de receptores de estrógeno: ER que es miembro de los receptores nucleares y el receptor de estrógeno acoplado a proteínas G GPR30 (GPER), que pertenece a la familia de los receptores nucleares, y el receptor de estrógeno acoplados a proteínas G. **Ver Figura 3**

La principal función del receptor de estrógeno es la de actuar como factor de transcripción que se une al ADN con el fin de regular la expresión génica. Sin embargo, el receptor de estrógeno presenta funciones adicionales, independientes de la unión a ADN. Existen dos formas diferentes del receptor de estrógenos, referidas como las formas $\alpha\beta$

Su distribución ER α es expresado mayoritariamente en endometrio, células del estroma ovárico y del hipotálamo.

Receptor ER β es expresado mayoritariamente en riñones, cerebro, hueso, corazón, pulmón, próstata y células del endotelio²⁹.

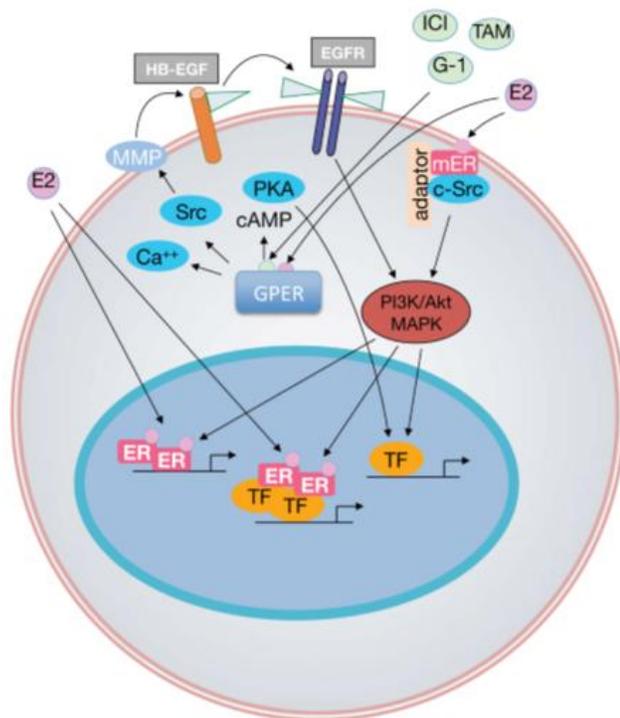


Figura 3

Vía de señalización genómica y no genómica

Tomado de:

Nat Rev Endocrinol; 7(12):715-726

Progesterona

Tanto hombres como mujeres producen niveles bajos de progesterona, una hormona esteroidea, en la corteza suprarrenal. La progesterona es importante, no sólo como hormona, sino como precursora de los estrógenos, andrógenos y esteroides suprarrenales.

La progesterona es necesaria para el mantenimiento del embarazo en fases iniciales. La producción de progesterona placentaria incrementa entre las cinco y siete semanas y la placenta es la principal fuente de progesterona posteriormente. Las concentraciones séricas son relativamente constantes a las 8-10 semanas de gestación, a menos que el embarazo este fracasando. A las 10-12 semanas los niveles aumentan más rápidamente.

Sin embargo el rol de la progesterona en etapas finales del embarazo no ha sido bien definida. La progesterona no disminuye en todas las mujeres antes de entrar en labor, y el promedio de los niveles circulantes de progesterona durante labor son similares a aquellos medidos una semana previa.

Receptores de progesterona.

Los receptores de **progesterona (PR)** son factores de transcripción que consistente en un dominio de unión a ADN rodeado de una región amino terminal que contiene las funciones activantes (AF) e inhibientes (IF) y una región bisagra rio abajo y carboxilo terminal que es el dominio de unión a ligando. Existen dos isoformas del PR: PARA y PRB, las cuales solo difieren en que el PRB humano contiene 164 a.a. adicionales arriba de la región amino-terminal, dicha secuencia le confiere una actividad funcional.

Los PR's, están expresados en los tejidos reproductivos femeninos, pero también están ampliamente distribuidos en tejidos no reproductivos como el timo, el hueso, los vasos sanguíneos, el sistema nervioso central y el riñón³⁰.

PROLACTINA

La prolactina (PRL) es un péptido de cadena sencilla, compuesto por 198 a.a., con tres puentes disulfuro intracatenarios y peso molecular aproximado de 25 000 daltons y es secretada por la hipófisis anterior.

La concentración de prolactina sérica incrementa a través del embarazo, alcanzando un pico a la llegada del alumbramiento para preparar el pecho para lactación. La magnitud del incremento es variable el término medio fue 207ng/ml con rango de 35 a 600ng/ml. **Ver Figura 4**

La principal función fisiológica de PRL es la de estimular y mantener la lactancia en las mujeres. La secreción normal de prolactina varía en función del tiempo lo que hace que los niveles de PRL sean de 2-3 veces superiores durante la noche que durante el día. La vida media biológica de la prolactina es de 20-50 min

Concentraciones de prolactina sérica incrementan durante el embarazo

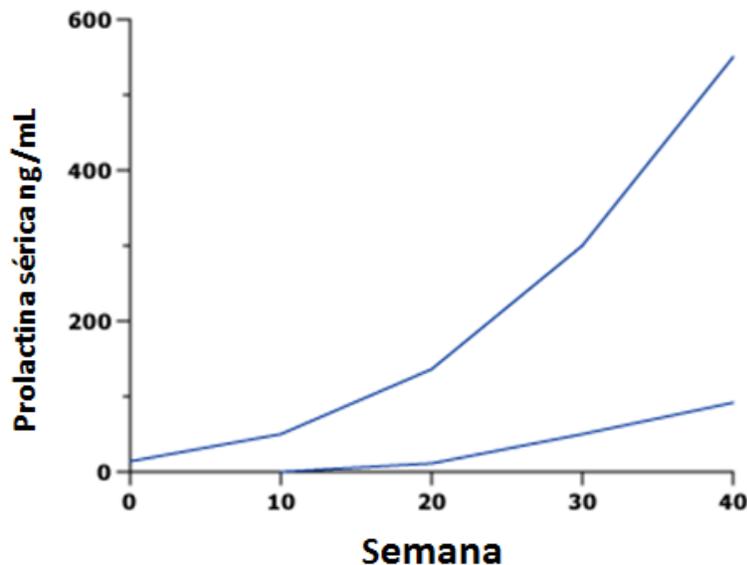


Figura 4 Concentraciones de prolactina sérica en función del tiempo de gestación, mostrando un incremento en prolactina como progresa en el embarazo. La zona de líneas representa el valor del rango observado.

Tomado de Tyson JE, Ito P, Guyda H, et al. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. Am J obstet

El receptor de prolactina (PRLR) es miembro de la superfamilia de receptores de citocinas. Existen isoformas cortas, medias y largas del PRLR. El PRLR se expresa ampliamente en órganos periféricos como la hipófisis, el corazón, los pulmones, el timo, el bazo, el páncreas, las glándulas renales, el útero, el músculo esquelético, la piel y el riñón³¹. **Ver Figura 5**

La PRL tiene diversos efectos, uno es la osmoregulación en mamíferos, el cual lo hace a través de la reducción renal de la excreción de Na^+ y K^+ y el estímulo de la Na^+/K^+ ATPasa de en la médula externa del riñón de rata. Además la PRL incrementa la excreción de iones Na^+ y Cl^- con el sudor, incrementa la absorción de agua en todos los segmentos de intestino y disminuye el transporte de agua en la membrana amniótica humana, en un transporte que podría estar contribuyendo en la madre embarazada para la lactancia.

En el túbulo proximal la prolactina promueve la retención de Na , K y agua, además de que el receptor se expresa en el AAH, TCD y conducto colector³²

Seis semanas después del parto, la secreción de estradiol disminuye y la concentración basal sérica de prolactina es usualmente normal en la madre .

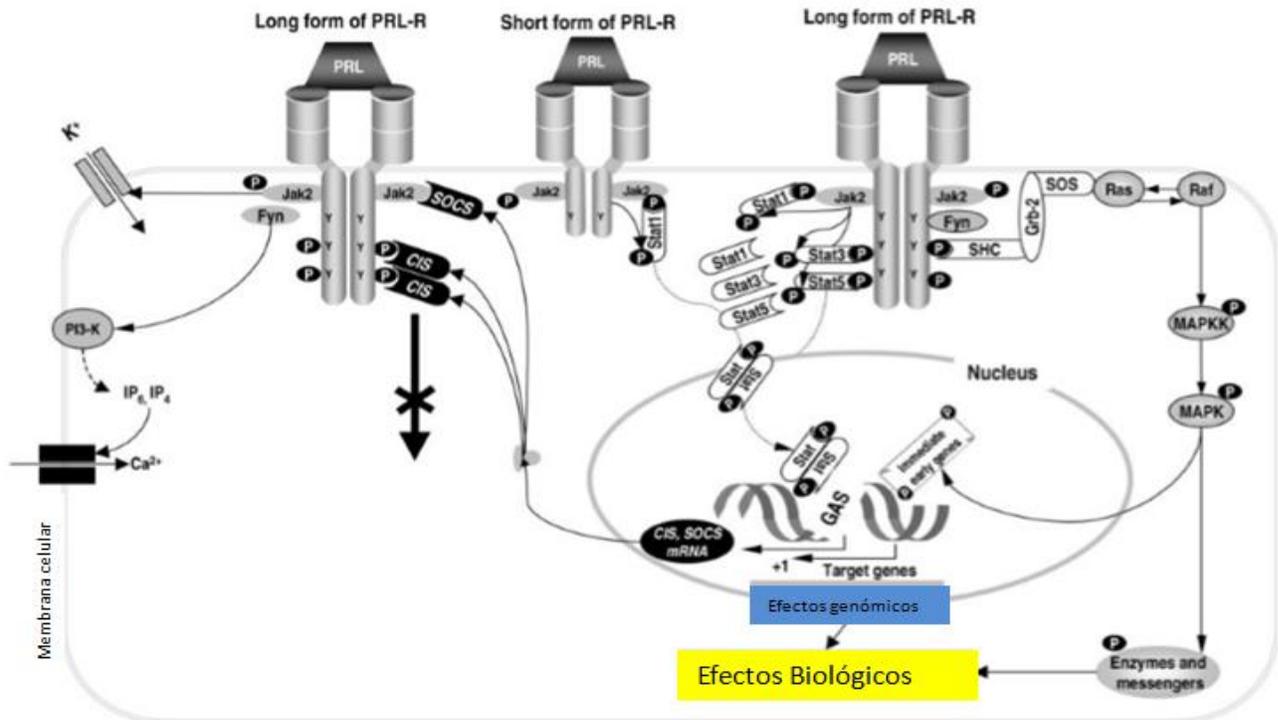


Figura 5 Vías de transducción de señales para iniciar la activación del receptor de prolactina. Vía Jak/STAT: Miembros de la familia de proteínas de transducción de señal y activador de la transcripción (STAT).

Tomado de Freeman ME, Kanyicska B, et al, Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion, *Physiological Reviews*,80(4), 2000.

Exosomas

Son vesículas unidas a la membrana de origen endosomal, presentes en un amplio rango de líquidos biológicos, incluyendo sangre y orina. El rango va entre 30 y 100nm de diámetro, y consiste de una doble capa limitante lipídica, proteínas transmembrana y un núcleo hidrofílico que contiene proteínas, mRNAs y micro RNAs. Exosomas pueden actuar como un vehículo extracelular por el cual las células se comunican.

La orina es la muestra ideal biológica para descubrir nuevos biomarcadores para enfermedades renales porque es de una recolección fácil no invasiva

Los exosomas urinarios son liberados de las células del epitelio renal, incluyendo podocitos, células del túbulo renal y células del epitelio transicional. **Ver Fig 6**

El análisis de exosomas urinarios por Western Blot de muestras de pacientes con diagnóstico de Síndrome de Bartter tipo I muestra ausencia del cotransportador 2 Sodio-potasio-cloro (NKCC2)

Esto ha demostrado que los factores de transcripción pueden ser detectado y pueden ser concentrados en exosomas urinarios ³³.

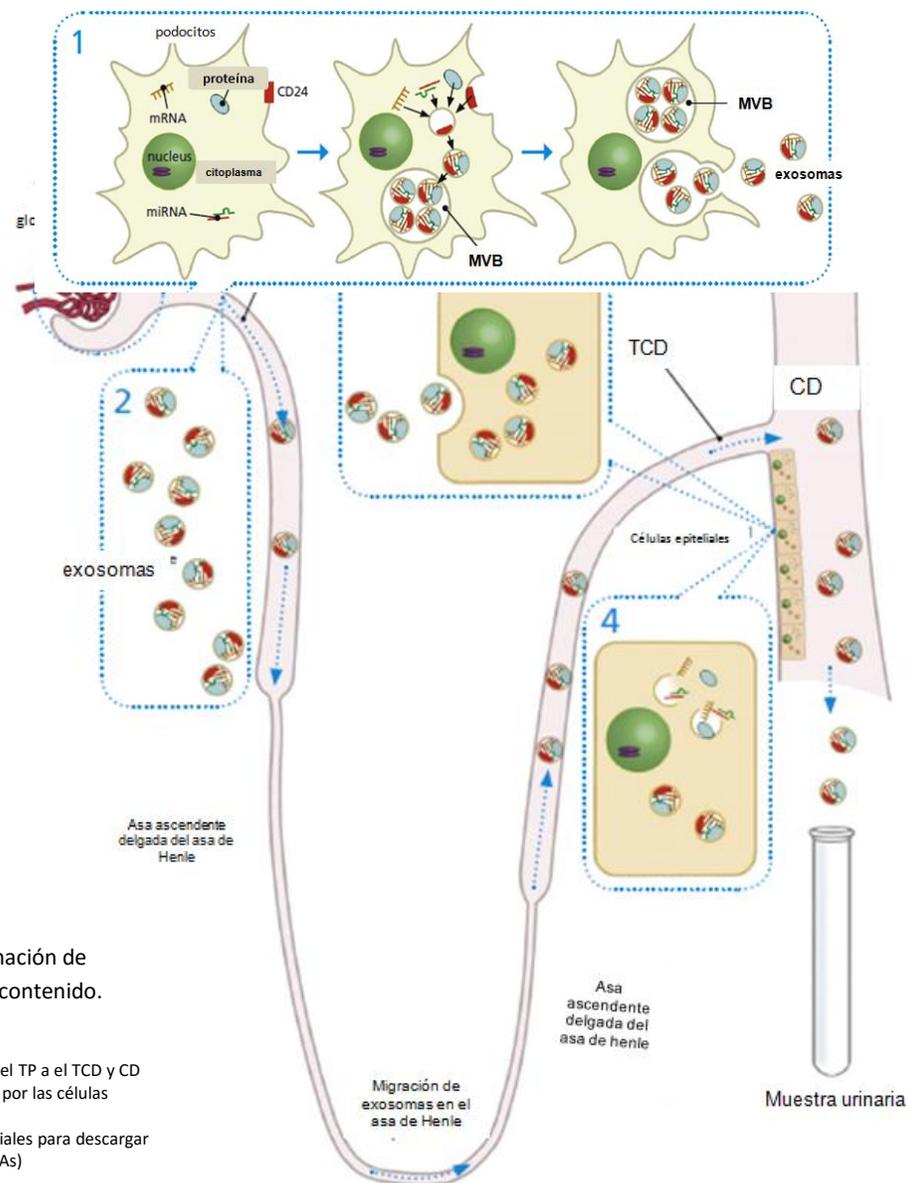


Figura 6

Representación esquemática de la formación de exosomas urinarios por las células y su contenido.

1. Exosomas generados en podocitos
2. Exosomas liberados por podocitos migran del TP a el TCD y CD
3. Los exosomas son captados principalmente por las células epiteliales en el CD
4. Exosomas se fusionan con las células epiteliales para descargar la carga funcional (proteínas, mRNAs, miRNAs)

Tomado de : Doreen YP, Hamish, et al Exosomes and the Kidney: Blaming the Messenger, Nephrology 18(2013) 1-10.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pre-eclampsia es una enfermedad del embarazo y afecta a un 3-6% de los embarazos. Se encuentra asociada con riesgo alto de parto pretérmino y mortalidad perinatal. En México, datos del consejo de evaluación de mortalidad materna del 2010, mostró que los trastornos hipertensivos del embarazo corresponden a la causa número uno de defunción materna. El estudio de factores de la posible participación de NCC con el desarrollo de preeclampsia permitirá conocer un aspecto no estudiado de su fisiopatología

La pre-eclampsia es una enfermedad multisistémica específica del embarazo, complicando 3-6 % de los embarazos y se ha asociado con alto riesgo de parto pretérmino, restricción del crecimiento intrauterino y mortalidad perinatal datos del consejo de evaluación de mortalidad materna en México del 2010 mostró que los trastornos hipertensivos corresponden a la causa número uno de defunción materna en mujeres en edad reproductiva y dentro de estos la pre-eclampsia-eclampsia el principal. Los factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia son múltiples, no siendo prevenible el desarrollo de esta entidad, por lo que el conocimiento de su fisiopatología y factores involucrados en el desarrollo es primordial. Datos experimentales sugieren la participación del estradiol-progesterona-prolactina con la expresión del cotransportador NCC fosforilado. Se desconoce la participación del cotransportador NCC fosforilado con el desarrollo de preeclampsia-eclampsia de mujeres embarazadas.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La expresión del cotransportador NCC fosforilado estará incrementada en pacientes embarazadas con preeclampsia-eclampsia?

5. JUSTIFICACION

Asociada con una alta incidencia de morbimortalidad materna, la preeclampsia constituye un problema de salud pública en nuestro país. A pesar de que se ha demostrado la participación del cotransportador NCC fosforilado en el desarrollo de hipertensión, y que estudios experimentales han demostrado la participación del eje estrógeno-progesterona-prolactina con la expresión del cotransportador NCC fosforilado, y que este último al incrementarse participa directamente en el desarrollo de hipertensión arterial, hasta el momento no se sabe cuál es el rol que juega en la evolución de preeclampsia durante el embarazo.

El confirmar esta participación en pacientes embarazadas justificaría un tratamiento con diuréticos de tipo tiazida, fármacos inhibidores del cotransportador NCC y medicamento que hasta ahora no es utilizado pero que por su bajo costo permitiría un tratamiento económico y dirigido para un problema de salud materno-fetal.

6. HIPOTESIS

Si la expresión del cotransportador sodio-cloro sensible a tiazidas SLC12A3 (NCC) fosforilado se encuentra relacionado con el desarrollo de preeclampsia entonces las mujeres que presenten preeclampsia mostraran en 10% una mayor expresión de NCC fosforilado en comparación con las mujeres embarazadas en ausencia de preeclampsia.

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión del cotransportador NCC sodio-cloro sensible a tiazidas SLC12A3 fosforilado mediante la cuantificación de la expresión de exosomas urinarios de mujeres embarazadas con y sin pre-eclampsia en el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

Objetivos específicos

8. Conocer las variables clínicas asociadas con la expresión de exosomas urinarios del cotransportador NCC fosforilado en pacientes embarazadas.
8. Correlacionar la expresión de exosomas urinarios del NCC fosforilado con niveles séricos de estrógenos, progesterona y prolactina de mujeres embarazadas.
8. Correlacionar la fracción excretada de sodio, equilibrio ácido base de mujeres embarazadas con la expresión de exosomas urinarios del NCC fosforilado.
8. Identificar la relación entre la expresión del cotransportador sodio-cloro sensible a tiazidas en exosomas urinarios del NCC fosforilado y las cifras de tensión arterial de pacientes embarazadas.

8. PACIENTES Y METODOS

1. Tipo y diseño del estudio:

Se trata de un estudio de casos y controles. Se incluirán mujeres que acudan al Servicio de Ginecología del Hospital general de México con ≥ 20 semanas de gestación, las cuales serán clasificadas de acuerdo a la presencia del evento de interés en este caso preeclampsia.

- a) Casos: Mujeres embarazadas con ≥ 20 semanas de gestación, que cumplan con los criterios de diagnóstico de acuerdo a Hypertension in pregnancy, Report of the American Collage of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy 2013.
- b) Controles: Mujeres embarazadas, que acudan a control del embarazo, tener ≥ 20 semanas de gestación, que cursen con embarazo normoevolutivo.

Ambos grupos serán valorados al primer contacto y durante todo el seguimiento del embarazo, así como la valoración para la inclusión a este estudio por un médico ginecólogo Dr. Ángel Augusto Pérez Calatayud, concordado con el Jefe de Ginecología y Obstetricia: Dr. Jesús Carlos Briones Garduño. Los grupos serán pareados por edad y semanas de gestación. Se realizaran dos mediciones una al momento del diagnóstico y otra posterior a la resolución del embarazo (1 mes).

2. Calculo de Tamaño de la muestra:

El tamaño de muestra será a conveniencia. Y se incluirán todos aquellos casos de preeclampsia que sean diagnosticados por el servicio de Ginecología y obstetricia durante el periodo de abril-junio de 2016, que además cumplan con los criterios de inclusión. Cabe mencionar que este es un estudio piloto, en que se evaluará la participación y expresión de NCC fosforilado en la preeclampsia por primera vez.

Por cada caso que se incluya se incluirá un control, el cual será pareado por edad y semanas de gestación.

3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

- 3.1 Casos: Mujeres embarazadas con ≥ 20 semanas de gestación, con Diagnóstico de Preeclampsia de acuerdo a Hypertension in pregnancy, Report of the American Collage of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy 2013.
- 3.2 Criterios para el diagnóstico de preeclampsia. Presión sistólica ≥ 140 mmHg o presión diastólica ≥ 90 mmHg en dos ocasiones al menos 4 horas de diferencia después de la semana 20 de gestación en pacientes previamente

normotensos. Si la presión sistólica es ≥ 160 mmHg o presión diastólica es ≥ 110 mmHg, la confirmación dentro de minutos es suficiente y proteinuria ≥ 0.3 gramos en orina de 24 horas en muestra de orina o índice proteína (mg/dL)/creatinina (mg/dL) ≥ 0.3 . Tira reactiva 1+ si una medición cuantitativa no es disponible. En pacientes con hipertensión de nuevo inicio sin proteinuria, el nuevo inicio de cualquiera de los siguientes es diagnóstico de preeclampsia: Conteo de plaquetas $< 100,000$ /microlitro, Creatinina sérica > 1.1 mg/dl o el doble de creatinina sérica en la ausencia de otras enfermedades renales, transaminasas hepáticas al menos dos veces la concentración normal, edema pulmonar, síntomas visuales o cerebrales. La presencia de uno o más de los siguientes indica el diagnóstico de "preeclampsia con características clínicas". Síntomas de disfunción del sistema nervioso central. Anormalidades hepáticas. Elevación de la presión sanguínea severa, plaquetas $< 100,000$ plaquetas/microlitro. Anormalidades renales: insuficiencia renal progresiva (creatinina sérica > 1.1 mg/dl o el doble de la concentración de creatinina sérica en ausencia de otras enfermedades renales).

- a) Controles: Mujeres embarazadas, que acudan a control del embarazo, tener ≥ 20 semanas de gestación, que cursen con embarazo normoevolutivo.
- b) Criterios de exclusión: Hipertensión arterial sistémica previa a embarazo, preeclampsia sobreañadida a hipertensión crónica
- c) Criterios de eliminación: Pacientes que su muestra no haya podido ser procesada.

4. Procedimiento del estudio:

Se incluirán dos grupos de pacientes embarazadas que acudan al servicio de ginecología y obstetricia del Hospital General de México. Selección de la paciente (casos y controles) y toma de muestras. El primer grupo de pacientes (casos) estará integrado por:

- a) Mujeres embarazadas con diagnóstico de preeclampsia de acuerdo a Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy.
- b) El segundo grupo de pacientes denominadas controles consistirá en: mujeres embarazadas que acudan a control del embarazo, determinándose en la consulta posterior a la semana 20 embarazo normo-evolutivo, que no cumpla con ningún criterio diagnóstico de preeclampsia. Cada caso será pareado por edad y semanas de gestación con al menos un control. Tanto de los casos

como los controles. Se les invitara a participar a las pacientes que acudan al servicio de ginecología a la consulta, ya sea a la consulta de control de embarazo sano o a la consulta de urgencias, si acude a la consulta de control de embarazo sano y se clasifica como embarazo normo-evolutivo, entonces se invitara a participar en el protocolo, de modo contrario si se realiza el diagnóstico de preeclampsia se invitara a participar en el estudio. En ambos casos se otorgara el consentimiento informado y posteriormente se tomara muestras de sangre, orina (**Ver diagrama 1**) y se llenara la información de los parámetros bioquímicos. Mediante una hoja de recolección de datos del expediente clínico. **Anexo 1**

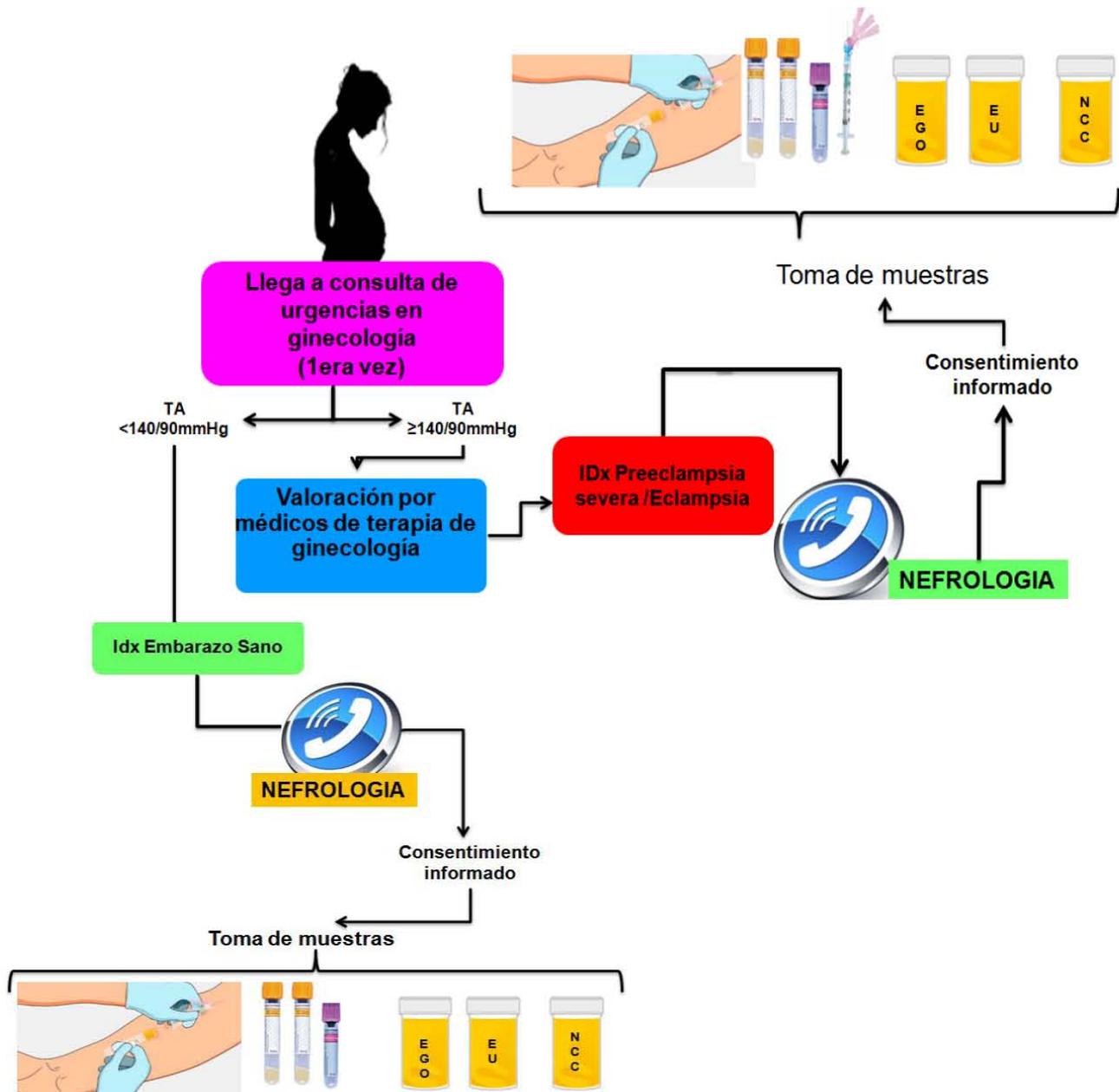
5. Procesamiento y almacenamiento de la muestra:

Todas las muestras de sangre y 2 frascos con muestra de orina son procesados en el Laboratorio Central del Hospital General de México. Para evaluar el estado de NCC en mujeres embarazadas con preeclampsia y mujeres sanas, se aislaron exosomas a partir de muestra de orina. El protocolo consistió en la recolección de una muestra de orina de 40ml al momento de la selección de la paciente. Esta orina fue trasladada al Hospital Infantil de México en donde se le agregó inhibidores de proteasa en un lapso no mayor de 3 horas del momento de la toma hasta el traslado. El inhibidor de proteasa debe estar almacenado a una temperatura de -20 grados centígrados. Una vez que se agrega los inhibidores de proteasa a la muestra de orina se almacenó a -80°C.

6. Extracción de exosomas urinarios

Para la extracción de exosomas se descongeló la orina en hielo y se debe vortexear intensamente para homogenizar la orina. Se tomó 10ml de la muestra y se centrifugo a una velocidad de 17,5000 g por 10 min a una temperatura de 37°C. De este procedimiento se obtiene el supernadante (S1) que se pasa a otro tubo limpio. El pellet 1 de 17,000 g se agrega DDT (dedithiothreitol) a una concentración final de 200mg/ml o en solución de aislamiento, dejar incubar 5-10 min a 37° y vortexear cada 2 minutos, centrifugar 13,600 rpm/10 min/37°C, tomar supernadante (S2). Tomar la mezcla del supernadante (S1 + S2) y mezclarlos, centrifugar por 120 minutos /200000g/4°C, el supernadante 3 se desecha y el pellet 3 se solubiliza en 50µl de solución de aislamiento 1.5% SDS y 50mMTris-HCL (pH6.8). Al final de estos pasos queda lista la proteína para cuantificación y corrida en gel de acrilamida. Si no se realiza procedimiento inmediatamente, guardarlas a -80 +o a -20 si es por poco tiempo.

Diagrama 1 de selección de la paciente (casos y controles) y toma de muestras



7. Western Blot (w.b)

Para evaluar los niveles de expresión y fosforilación de NCC, se utilizaron anticuerpos contra NCC, así como fosfoanticuerpos que reconocen epítopes fosforilados dentro de estas proteínas.

a) Preparación de la muestra:

El pellet resuspendido obtenido previamente, se descongela; se preparan alícuotas: 20µl=4µl Laemmli 5X + Buff A. + Proteína (en función de la normalización por creatinina),

b) Electroforesis en gel:

Corrida: Correr a 50 V, 30 min, y luego a 100V el tiempo necesario para obtener la separación deseada de los marcadores.

c) Transferencia:

Transferir en cámara semi-seca a 10V, 1 hora 30 min. Membrana de PVDF

d) Bloqueo

Se hidrata la membrana con metanol puro. Se **enjuaga** con TBS + Tween, **bloquear con leche** al 5-10% en TTBS 1-1.5h. Diluir Ac con leche al 5%.

e) Detección. Método en dos pasos

Anticuerpo primario: Incubar overnight a 4°C.

Lavar 4 veces con TTBS 5 min.

Anticuerpo secundario: Incubar 1.5 horas, T.A. (Sheep 1:5000)

Lavar 8 veces con TTBS en agitación, 5 minutos.

f) Análisis (Detección colorimétrica)

Revelar con sustrato y se evalúa por densitometria

8. Análisis estadístico

En ambos grupos se tomaran variables clínicas y de laboratorio entre ellas la medicos del cotransportador NCC fosforilado en exosomas urinarios. Las pacientes serán pareadas por edad y semanas de gestación. Los datos obtenidos serán analizados en el paquete estadístico SPSS 22.0, donde se obtendrán medidas de tendencia central, se empleará proporciones, asociación de variables cualitativas, prueba exacta de Fisher, se realizará correlación de entre las diferentes variables continuas de interés, considerando un IC al 95%, y valor de $p \leq 0.05$.

9. Resultados

9.1 Características generales de la población.

Con una edad promedio fue de 28.4 ± 7.32 años sólo una paciente analizada tenía antecedente de preeclampsia. El promedio de embarazos de 2.14 ± 2.69 , las mujeres con preeclampsia cursaban con 36.72 ± 1.72 semanas de gestación en contraste con las 18.8 ± 16.25 semanas del grupo control. Dentro de las variables clínicas encontramos que las pacientes con preeclampsia tuvieron un IMC superior de 33.29 ± 6.1 kg/m² respecto al grupo control sin tener significancia estadística. Con relación a la evaluación de los parámetros hemodinámicos las pacientes con preeclampsia tuvieron una presión arterial sistólica de 159 ± 6.4 mmHg, una presión arterial diastólica 97.7 ± 2.6 mmHg y una presión arterial media de 118 ± 1.4 mmHg con diferencia estadística significativa al comparar estas cifras con el grupo control ($p =$; $p =$; y $p =$; respectivamente). Dentro del tratamiento antihipertensivo el 25% utilizó 1 antihipertensivo y el 75% utilizó 2 antihipertensivos. Del grupo de fármacos empleados el 50% se administró sulfato de magnesio y un 50% calcioantagonistas y 25% alfametildopa (**Ver tabla 1**)

Tabla 1. Características de la población

| Variables | Población Total n=7 | Preeclampsia Total n=4 | Controles Total n=3 | P Fisher |
|--|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Edad \pmDE | 28.4 \pm 7.32 | 27.5 \pm 9.1 | 29.6 \pm 5.5 | 0.421 |
| Historia de preeclampsia (%) | 1 (14.3) | 1(25) | 0(0) | 0.350 |
| Numero de gestas | 2.14 \pm 2.69 | 2 \pm 0 | 2.3 \pm 1.15.3 | 0.350 |
| Semanas de gestación | 29.07 \pm 13.6 | 36.72 \pm 1.72 | 18.8 \pm 16.25 | 0.321 |
| IMC | 30.4 \pm 5.3 | 33.29 \pm 6.1 | 29.5 \pm 5.1 | 0.321 |
| TAS | 133.8 \pm 32 | 159 \pm 6.4 | 100 \pm 10 | 0.321 |
| TAD | 83 \pm 18.7 | 97.7 \pm 2.6 | 65.3 \pm 5.7 | 0.136 |
| PAM | 99.8 \pm 23.1 | 118 \pm 1.4 | 7.5 \pm 6.9 | 0.321 |
| Uso de antihipertensivos (%) | 4(57.1) | 4(100) | 0 | 0.008 |
| Número de antihipertensivos (%) | | | | |
| 0 | 3(42.9) | 0(0) | 0 (0) | 0.029 |
| 1 | 1(14.3) | 1(25) | 0(0) | 0.350 |
| 2 | 3(42.9) | 3(75) | 0(0) | 0.047 |
| Tipo de antihipertensivos (%) | | | | |
| Calcioantagonistas | 2(28.6) | 2(50) | 0(0) | 0.147 |
| Vasodilatador | 1(14.3) | 1(25) | 0(0) | 0.350 |
| Sulfato de Mg | 2(28.6) | 2(50) | 0(0) | 0.147 |

9.2 Hallazgos de laboratorio.

Las variables bioquímicas. No hubo diferencias significativas en la hemoglobina ni el hematocrito, (grupo control Hb 13.8 ± 3.35 , Hcto 41.5 ± 7.45 y pacientes con preeclampsia con Hb 12.5, Hcto de 39.4 ± 3.1), No se encontró niveles de glucosa alterado en ámbos grupos.

En cuanto a la función renal los niveles de creatinina fueron similares en ambos grupos (grupo control 0.6 ± 0.11 versus 0.67 ± 0.12) el nivel de urea fue menor en el grupo control siendo de 17.4 ± 4 versus 19.2 ± 2.9 , con TFG calculado mediante CKDEPI de 121.2 ± 11.27 en el grupo control y de 117.2 ± 11.1 , FeNa y Fe BUN no se encontraron diferencias significativas. El nivel de proteinuria fue mayor en pacientes con preeclampsia, no encontrándose estadísticamente significativo (**Ver tabla 2**)

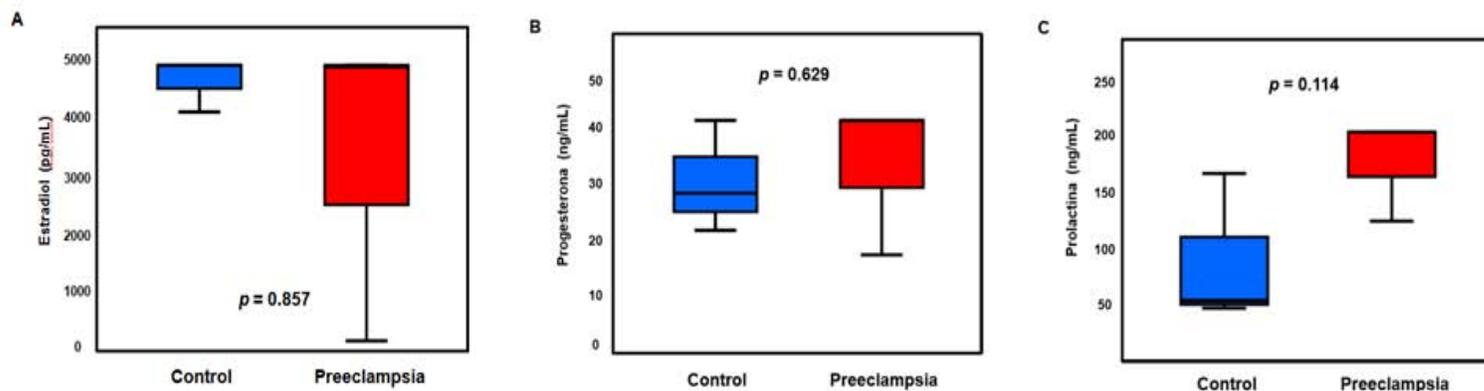
Tabla 2 de resultados de laboratorio

| Variable | Control n=3 | Preeclampsia n=4 | P |
|-------------|-------------------|---------------------|-------|
| Hemoglobina | 13.8 ± 3.35 | 12.5 | 0.857 |
| Hematocrito | 41.5 ± 7.45 | 39.4 ± 3.1 | 1.000 |
| Glucosa | 83.3 ± 10.2 | 89 ± 3.1 | 0.629 |
| Creatinina | 0.6 ± 0.11 | 0.67 ± 0.12 | 0.629 |
| Urea | 17.4 ± 4 | 19.2 ± 2.9 | 0.629 |
| CKDEPI | 121.2 ± 11.27 | 117.2 ± 11.1 | 1.000 |
| FeNa | 0.36 ± 0 | 0.93 ± 0.48 | 0.500 |
| FeBUN | 47.6 ± 0 | 44.5 ± 19.7 | 1.000 |
| Proteinuria | 0 ± 0 | 877 ± 1440 | 0.350 |

9.3 Estudios hormonales

El perfil hormonal de estrógenos, progesterona y prolactina fueron medidos en ambos grupos (**Figuras 7 A-C**). En la figura 7A observamos que los niveles de estradiol (pg/ml) se encuentran en un mayor rango de nivel en las pacientes con preeclampsia pero sin diferencia estadística significativa; mientras que los niveles de progesterona tampoco mostraron diferencias significativas ($p = 0.629$); y en tanto los niveles de prolactina aunque fueron mayor tampoco mostraron diferencia entre grupos ($p = 0.114$).

Figura 7



9.4 Expresión de pNCC

Se realizó la cuantificación de la expresión de exosomas urinarios del contranportador NCC mediante estudio de Western Blot en ambos grupos. Se cuantifico el NCC, su forma natural, activa (pNCC) y el control (TSG1).

De forma general se observó una mayor expresión de NCC en las pacientes con preeclampsia al comparar con la expresión de NCC de las pacientes del grupo control (**Figura 8A**), sin embargo, al realizar el análisis densitométrico estas diferencias no se encuentran estadísticamente significativa, mediante la prueba de U-Mann-Whitney como se observa en la figura 8B. El resultado del análisis densitométrico del NCC es expresado en las bandas como el doble de NCC sobre TSG1, lo cual da una proporción expresada en números.

9.5 Expresión de pNCC con marcadores hemodinámicos

Los estudios de correlación de la expresión de exomas urinarios con parámetros clínicos de presión arterial se muestran en la figura 9. Como se puede observar no se encontró correlación entre la expresión de pNCC con los niveles de presión arterial sistólica, diastólica y presión arterial media como se muestra en las imágenes 9 A, B y C

9.6 Expresión de pNCC con hormonas

La evaluación de correlación de la expresión de pNCC con los parámetros hormonales tampoco mostró diferencia estadística significativa. En la figura 9 no se encuentra correlación entre los niveles de Estradiol ($r=0.259$, $p=0.575$), progesterona ($r=0.250$, $p=0.389$) y prolactina ($r=0.250$, $p=0.389$) con los niveles de pNCC

Figura 8

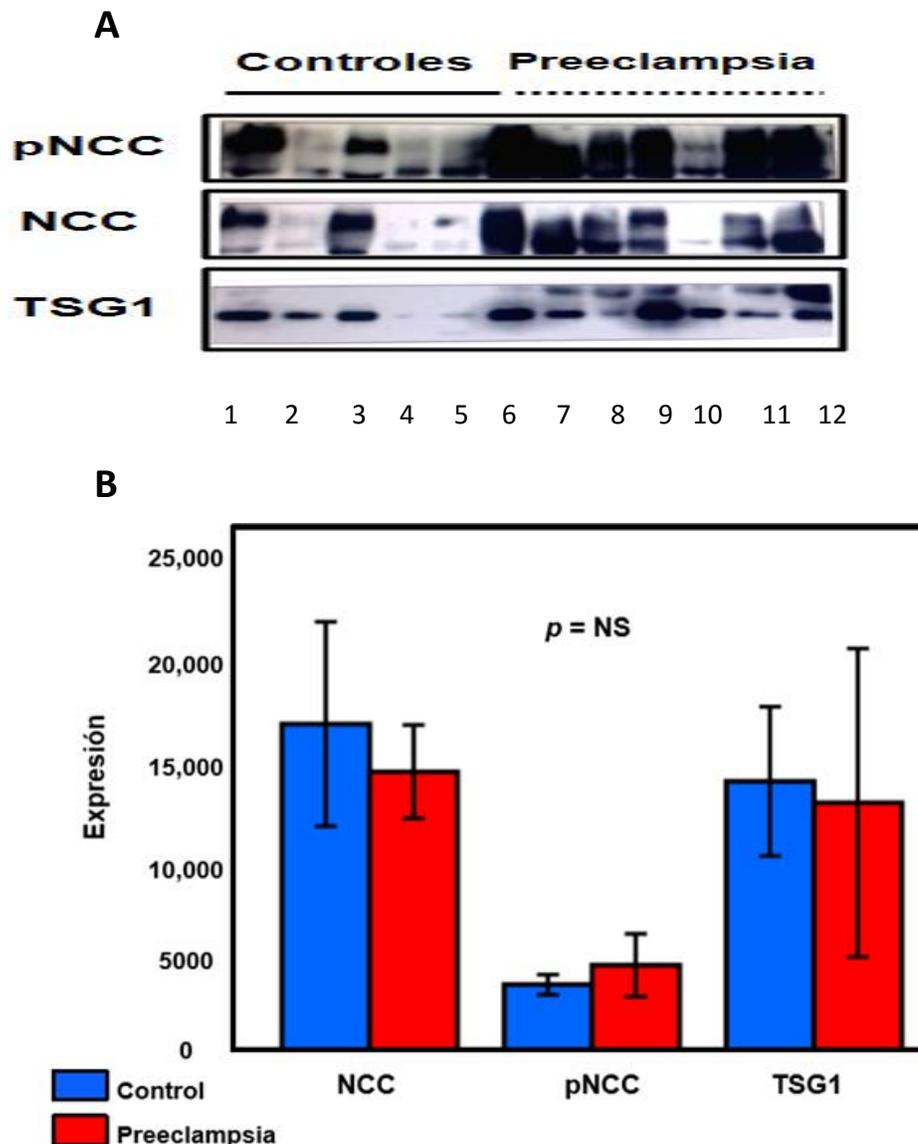


Figura 9

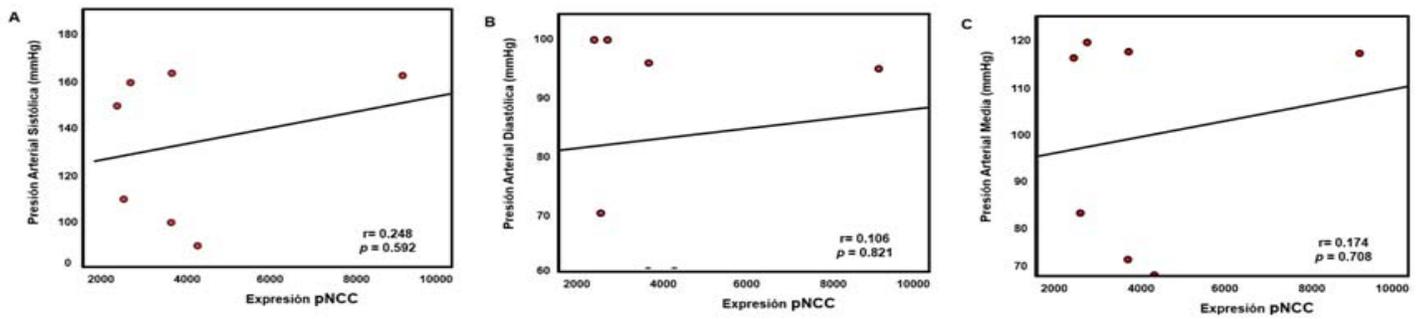
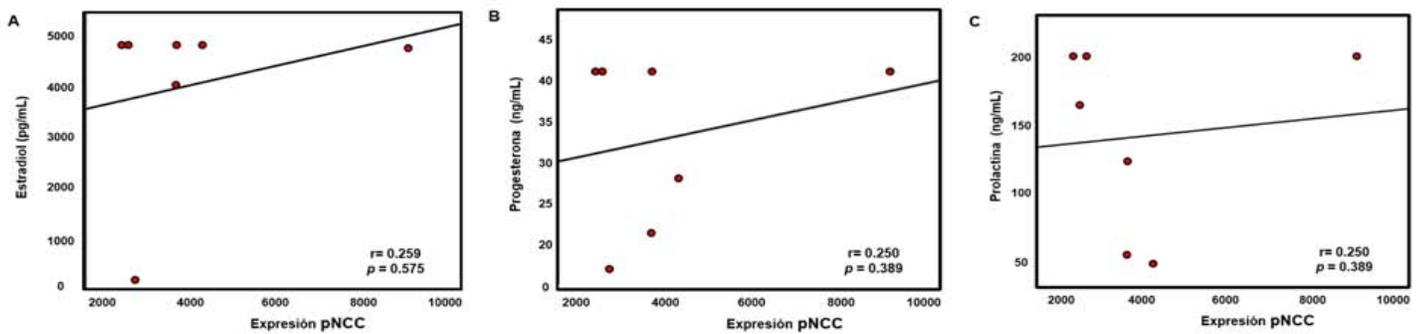


Figura 10



10. Discusión y conclusiones

La preeclampsia es un problema de salud pública a nivel mundial. Es una enfermedad con alta morbilidad y con múltiples vías fisiopatológicas implicadas. No hay estudios previamente publicados sobre el papel que juega el cotransportador NCC en la preeclampsia.

Los estudios en los cuales inicialmente surgió la pregunta de si los transportadores de sodio evaluados mediante la cuantificación de exosomas urinarios son marcadores de la reabsorción tubular de sodio en pacientes hipertensos, no explicó el mecanismo patogénico de la hipertensión sensible a sal (34)

Hay estudios en humanos en quienes se trata de asociar los niveles de expresión de NCC fosforilado con hipertensión arterial. En 2015 Gamba y colaboradores realizaron una cohorte prospectiva soportando datos de una asociación entre la activación de NCC y el desarrollo de hipertensión en el postrasplante en pacientes hombres tratados con tacrolimus (35)

A pesar de no haber una clara relación entre la hipertensión arterial y la expresión de exosomas urinarios, hasta ahora no se había considerado evaluar la potencial influencia hormonal, que estados como el embarazo conlleva.

El embarazo es uno de los estados único de la mujer en donde hay una modificación en las concentraciones de hormonas séricas (prolactina, estrógenos, progesterona), Al analizar la expresión/fosforilación de NCC, en específico en las ratas, no se observó una diferencia en la expresión total del transportador entre las hembras y los machos, pero sí un incremento en las fosforilación de las hembras (23). Por lo que en el presente estudio si se observo un incremento en la expresión de la fosforilación en las pacientes con preeclampsia versus las pacientes controles, lo cual pudiera deberse a una regulación hormonal diferente entre ambos grupos que condicione una expresión mayor de NCC fosforilado en mujeres con preeclampsia, sin embargo es difícil con este tamaño de la muestra hacer esta aseveración.

Se ha demostrado que la actividad de este cotransportador es crítica para la regulación de varias variables fisiológicos como son la presión arterial, el potasio sérico, metabolismo ácido base, excreción de calcio urinario, la cual es modulada por numerosas vías de regulación hormonal, regulada por aldosterona, angiotensina II, vasopresina, glucocorticoides, insulina, norepinefrina, estradiol, progesterona, prolactina, y hormona paratiroidea (25). La mayor expresión observada en pacientes con preeclampsia versus pacientes sanas, se debe tomar con cautela, a pesar de no haber sido estadísticamente significativas, ya que el incremento de peso podría condicionar resistencia a la insulina la cual no ha sido evaluada.

Las variaciones en la toma de la muestra de la mujer con preeclampsia fue dentro de las 24 horas antes o 24 horas después del parto, es una variable que podría haber influenciado en nuestros resultados. La administración de glucocorticoides administrados como parte de la maduración fetal en la paciente ó la pérdida sanguínea durante el parto o la cesárea pudieron haber sido factores asociados capaces de haber activado el sistema renina angiotensina aldosterona y potencialmente incrementado la fosforilación de NCC. Por lo que muchas variables intervienen siendo difícil establecer una relación causal.

Por otro lado, analizando individualmente a cada una de las pacientes que participaron, en el grupo control, la paciente número 6 (que es la que muestra mayor expresión de NCC fosforilado), es una paciente de 27 años de edad, con antecedente de tabaquismo positivo, IMC29.5, con un embarazo de 30.5 semanas de gestación, quien desarrollo durante el trabajo de parto coriamnioitis, ruptura prematura de membranas, finalizando su embarazo de forma torpida y poco favorable, por lo que consideramos que la mayor expresión de NCC fosforilado podría a ver sido activada por otros factores.

En el grupo de pacientes embarazadas con preeclampsia observamos la paciente número 10, en la que se observó menor expresión de NCC fosforilado. Se trato de una mujer de 25 años de edad, quien cumplió con los criterios diagnóstico de preeclampsia severa incluida la presencia de proteinuria en exámen general de orina de 500mg, sin embargo, la recolección de la muestra para la determinación de exosomas urinarios se aislo posterior a la resolución del embarazo. Sobre esto último, nosotros pensamos que la determinación de la expresión de exosomas urinarios quizás tambien esté influenciada por la temporalidad de la toma de la muestra (previo o posterior a resolución del embarazo), en donde, si es previo a la resolución del embarazo, existen potenciales factores que podrían influir en la expresión de los exoxosomas: 1) inicio de tratamiento antihipertensivo; 2) administración de soluciones intravenosas; 3) ingesta de sodio de la dieta; 4) administración de glucocorticoides para la maduración pulmonar fetal, etcetera. En contra parte, si la determinación se realiza posterior a la resolución del embarazo su expresión puede ser influenciada por la pérdida sanguínea durante el parto o cesárea, estados de hipovelemia *per seque* activen al sistema renina angiotensina aldosterona y en consecuencia la activación de NCC; o bien otro potencial factor que podrían influenciar la disminución en la expresión de NCC postparto seria el alumbramiento en donde la ausencia de factores endocrinos placentarios conlleva a una mejoría en las cifras tensionales, atenuando el estímulo hipertensivo así como menor expresión de NCC fosforilado.

Debido a múltiples factores que influyen en la expresión de NCC fosforilado, se requiere la selección intuitiva de pacientes que cumplan los criterios de preeclampsia

severa ya que hasta el momento no existe un gold estándar para realizar el diagnóstico, así como precisar el tiempo de la toma de muestra para determinación de la expresión de exosomas urinarios de NCC fosforilado tomando en cuenta las variables previamente comentadas.

Nosotros consideramos que con los resultados de nuestro trabajo hasta ahora no podemos descartar la participación del NCC en la fisiopatología del edema y la hipertensión de mujeres embarazadas. Así mismo consideramos que los estudios no son concluyentes para definir una asociación clínica. Basado en lo anterior, sugerimos continuar nuestro trabajo con una selección mas analítica de las pacientes a incluir en el estudio y con una vision de aumentar el número de pacientes analizadas.

11. Bibliografía

1. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol.* 2003; 27(3):239-46.
2. Briones CG, Calderón JM, Moreno AA, González JI, Díaz MA, Briones JC. Preeclampsia: Una nueva teoría para un viejo problema. *Medigrafic.* 2006; 22(2):99-104.
3. Hernández S, TohS, Cnattingius S. Risk of preeclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ.* 2009; 338:b2255.
4. Roberts JM, Druzin CM, August PA, Gaiser RR, Granger JP, Guyton BS, et al. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology.* 2013;122(5): 1122-1131.
5. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005; 330(7491):565.
6. Park HJ, Shim SS, Cha DH. Combined screening for early detection of Preeclampsia. *Int J. Mol Sci.* 2015; 16:17952-17974.
7. Cetin I, Huppertz B, Burton G, Cuckle H, Gonen R, Lapaire O, et al. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies?. *Placenta.* 2011; 32(1):S4-S16.
8. Crossen JS, Vollebregt KC, de Vrieze N, Riet G, Mol BW, Franx A, et al. Accuracy of mean arterial pressure and blood pressure measurements in predicting pre-eclampsia: Systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2008; 336:1117-1120.
9. Roberts JM, Druzin M, Bkris G, August PA, et al. Task Force on Hipertensión in Pregnancy, The American College of Obstetricians and Gynecologists
10. Johnson RJ, Floegue J, Feehally J, et al, *Comprehensive Clinical Nephrology*, Fourth Edition, elservier, 2010.
11. Castañeda BM, Arroyo JP, Gamba G. Independent regulation of Na⁺ and K⁺ balance by the kidney. *Med Princ Pract* 21: 101-114, 2012.
12. Guyton AC. Blood pressure control special role of the kidneys and body fluids. *Science.* 1991; 252(5014):1813-1816.
13. Glover M, Mercier Zuber, O'Shaughnessy KM. Hypertension, Dietary Salt Intake, and the Role of the Thiazide-Sensitive Sodium Chloride Transporter NCCT. *Cardiovascular Therapeutics.* 2011; 29(1):68-76.
14. Arroyo JP, Lagnaz D, Ronzaud C, Staub O, Gamba G. Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. *Physiology (Bethesda).* 2011; 26(2):115-123.

15. Gamba G. The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297(4): F838-F848.
16. Chen Z, Vaughn DA, and Fanestil DD. Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J Am Soc Nephrol.* 1994;5(4):1112-1119.
17. Gamba G. Molecular Physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):423-493.
18. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lyttlon J, Hediger MA, et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 Apr;90(7):2749-53.
19. Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vázquez N, Nishio T, Gamba G, et al. N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na(+): Cl (-) cotransporter. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(2):271-82.
20. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lyttton J, Lee WS, Hediger MA, et al. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)- chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17713-22.
21. Chabner B. Brunton L, Knollman B, Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Twelfth Edition. McGraw-Hill Education / Medical, 2011.
22. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HKR, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, et al. Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci.* 2008; 121(5):675-684.
23. Rojas L, Reyes LA, Ramirez V, Bautista R, Rafael C, Gamba G, et al. Ovarian Hormones and Prolactin Increase the Renal NaCl Cotransporter Phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015; 308(8): F799-F808.
24. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong p, Korzeniewski SJ, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management, *Nat Rev Nephrol.* 2014 Sep; 10(9):531-540.
25. Rojas V, Gerardo G, Mini-review: regulation of the renal NaCl cotransporter by hormones, *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F10-F14, 2016.
26. McPerson FJ, Chenoweth PJ. Mammalian sexual dimorphism. *Anim Reprod Sci* 131:109-122, 2012
27. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology, 2015. Elsevier Health Sciences.
28. Deroo BJ. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116:561-570, 2006.

29. Prossnitz ER, Barton M, The G protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease, *Nat Rev endocrinol*; 7(12): 715-726.
30. Bumke VC, Bähr V, Diederich S, et al. Expression of the progesterone receptor and progesterone-metabolising enzymes in the female and male human kidney. *J Endocrinol* 175: 349-364, 2002
31. Freeman ME, Kanyicska B, et al, Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion, *Physiological Reviews*,80(4), 2000
32. Evan AP, Palmer GC, Lucci MS, et al. Prolactin-induced stimulation of rat renal adenylate cyclase and autoradiographic localization to the distal nephron. *Nephron* 18: 266-276, 1977.
33. Doreen YP, Hamish, et al Exosomes and the Kidney: Blaming the Messenger, *Nephrology* 18(2013) 1-10.
34. Esteva-Font C, Wang X, Ars E, et al, Are Sodium Transporters in Urinary Exosomes Reliable Markers of Tubular Sodium Reabsorption in Hypertensive Patients?, *Nephron physiology*, (114) 2010 25-34.
35. Rojas-Vega, Jimenes-Vega, et al, Increased phosphorylation of the renal Na⁺-Cl cotransporter in male kidney transplant recipient patients with hypertension: a prospective cohort, *Am J Physiol Renal Physiol*, July 2015.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

| | Septiembre- 2015 | Octubre 2015- | Noviembre 2015 | Diciembre 2015 | Enero 2016 | Febrero 2016 | Marzo 2016 | Abril 2016 | Mayo 2016 | Junio 2016 | Julio 2016 |
|---|------------------|---------------|----------------|----------------|------------|--------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| Revisión de la literatura | | | | | | | | | | | |
| Elaboración del protocolo | | | | | | | | | | | |
| Someter a comité de investigación y comité de ética, Hospital General de México | | | | | | | | | | | |
| Invitación y obtención de consentimiento informado | | | | | | | | | | | |
| Lista de chequeo de criterios de inclusión/Exclusión | | | | | | | | | | | |
| Obtención de datos | | | | | | | | | | | |
| Reclutamiento de pacientes y toma de muestras. | | | | | | | | | | | |
| Montaje y procesamiento de técnica | | | | | | | | | | | |
| Procesamiento de datos | | | | | | | | | | | |
| Elaboración de manuscrito final | | | | | | | | | | | |

**ANEXO 1. HOJA FRONTAL DE RECOLECCION DE DATOS.
EXPRESION DE EXOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN
PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPسيا**

FOLIO: _____

NOMBRE: _____ FECHA: _____

ECU: _____ EDAD: _____ NÚMERO DE EMBARAZO: _____ EDAD

SEMANAS DE GESTACIONAL _____

PESO: _____ Kg Talla: _____ cm IMC: _____

| | | | | |
|---|-----------|------------------------------|---|------------|
| Antecedente de preeclampsia o eclampsia | (SI) (NO) | Complicaciones madre: | Eclampsia | (si) (no) |
| | | | Encefalopatía posterior reversible | (si) (no) |
| | | | Falla renal aguda | (si) (no) |
| | | | | |
| Presión arterial | | mmHg | Requerimiento de tratamiento de sustitución renal | (si) (no) |
| Presión arterial media | | | Tiempo de requerimiento de sustitución renal | |
| Uresis horaria | | ml/kg/hr | Tiempo de requerimiento de hemodiálisis | |
| Tipo de medicamentos antihipertensivos utilizados | | | Tabaquismo | (si) (no) |
| Tipo De medicamentos antihipertensivos utilizados | | | Diabetes Mellitus | (si) (no) |
| Número de antihipertensivos | | | Producto | |
| Complicaciones durante el embarazo | (si) (NO) | Peso al nacimiento | | Kg |
| | | Talla al nacimiento | | Cm |
| | | Tipo de término del embarazo | Parto () Cesárea () | |
| | | Resultado del embarazo | Vivo () Muerto () Óbito () | |



**ANEXO 1. HOJA REVERSA DE RECOLECCION DE DATOS.
EXPRESION DE EXOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN
PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA**

| Muestra de sangre venosa periférica | |
|---|---|
| Electrolitos séricos Na+ Cl- K+ Ca+ P Mg+ | Progesterona Estradiol Prolectina |
| Urea: _____ | B-2 microglobulina |
| Creatinina: _____ | Ácido Úrico |
| Perfil de lípidos Colesterol: HDL: LDL: | Citometría hemática Hb Hto plaquetas |
| Gasometría venosa pH: PCO2: HCO3: | |
| ALT AST | |
| Glucosa | Albúmina |

| Muestra orina | | |
|--|-------------------------|--|
| Electrolitos urinarios Na+ Cl- K+ Ca+ Cr BUN | Examen general de orina | Determinación de exosomas urinarios. de NCC. Rotulación de muestra: |
| Una muestra de orina (Cantidad variable) | | |
| Recolección de orina con cuantificación de proteínas de 24 horas | | |



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 1 de 7

Nombre del investigador principal: Rafael Valdez Ortiz

Sede donde se realizará el estudio: Hospital General de México “Dr Eduardo Liceaga”

Siglas del nombre de la paciente: _____ Edad: ___ México D.F a _____ de _____ del 2016.

Nombre del familiar responsable o responsable legal: _____

Edad: _____ parentesco: _____ con domicilio en: _____

Por medio de la presente, deseamos a invitarlo a usted (siglas de la paciente) _____ participe en este estudio de investigación titulado: “Expresión de exosomas urinarios del cotransportador NCC fosforilado en pacientes embarazadas con preeclampsia” que se llevará cabo en el Hospital general México. El objetivo de su participación como paciente mujer embarazada (mujer con embarazo sin ninguna complicación hasta el momento), es compararla con un grupo de pacientes embarazadas con hipertensión para saber cómo se observa en la orina el cotransportador sodio-cloro (una molécula del riñón que controla la sal en el cuerpo) en el desarrollo de preeclampsia (enfermedad hipertensiva que se produce durante el embarazo)

La investigación puede proporcionar información que ayude en el futuro inmediato, a mujeres que cursen con esta enfermedad

Antes de decidir participar, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 2 de 7

Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada

1. Justificación del estudio. La pre-eclampsia es una enfermedad específica del embarazo. Complica el 3-6 % de los embarazos y se asocia con riesgo alto de adelanto del nacimiento, así como incremento en la mortalidad antes, durante o después del parto. Información del Consejo de Evaluación de Mortalidad Materna en México del 2010, mostró que la hipertensión en el embarazo es la causa número uno de muerte materna siendo la pre-eclampsia-eclampsia la principal. Los factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia son muchos y no se puede prevenir, por lo que el conocimiento de su causa y de los factores involucrados en el desarrollo es fundamental en este padecimiento.

2.- Objetivo: conocer el papel que juega la expresión del cotransportador (sodio-cloro) mediante su evaluación cuantificándolo en la orina, en el desarrollo de preeclampsia. Después asociaremos su presencia con el desarrollo de preeclampsia. A pesar de que usted no padece esta enfermedad, su participación es de gran importancia ya que nos ayudara a valorar el comportamiento del cotransportador sodio-cloro en pacientes sanas.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 3 de 7

3. Beneficios: Aportara el beneficio científico de conocer el comportamiento de este cotransportador en mujeres sanas, para ser comparado con el grupo de mujeres embarazadas con preeclampsia (hipertensión arterial inducida por el embarazo)

4. Procedimientos del estudio. Toma de muestras sanguíneas mediante de una vena y toma de muestra urinaria. Se tomaran 4 tubos de muestras de sangre, así como la obtención de 1 (una) muestras de orina de 24 horas y dos muestras de orina de 40ml cada una.

5. Riesgo del estudio: Estudio de investigación con riesgo mayor mínimo. Únicamente podría ocurrir alguna complicación de la venopunción como es formación de hematoma (moretón). En la obtención de la muestra de orina no hay riesgo alguno.

6. Aclaraciones: Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

7. Alternativas: Para este estudio, la única manera es tomando las muestras que se han comentado. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su totalidad. No tendrá que hacer gasto económico alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenido con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Titulo del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 4 de 7

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.

Si tuviera alguna duda o aclaración favor de comunicarse con el Dr. Rafael Valdez Ortiz Investigador principal, al teléfono: 5521285063 ó 5523182868, disponible las 24 hrs. del día; o con la Dra. Estela García Elvira, Presidente del Comité de Ética al teléfono 27 89 2000, ext 1330.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (siglas del paciente) _____

He leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma de familiar responsable y/o responsable legal
Dirección _____ Fecha _____

Testigo 1
(Nombre y firma) _____ Parentesco: _____ Fecha: _____
Dirección: _____

Testigo 2
(Nombre y firma) _____ Parentesco: _____
Fecha: _____
Dirección: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 5 de 7

He explicado a la paciente (siglas de la paciente) _____ La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda.

Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Rafael Valdez Ortiz.

Firma del investigador

Fecha

Por medio de la presente, acepto participar en el proyecto de investigación titulado “expresión de exosomas urinarios del cotransportador NCC fosforilado en pacientes embarazadas con preeclampsia” Registrado en el Comité Local de investigación. El objetivo de este estudio es ser un grupo control (sin enfermedad) para comparar la determinación de la expresión del cotransportador NCC en pacientes con preeclampsia. Se tomaran 4 tubos de muestras de sangre mediante venopunción, así como la obtención de 1 (una) muestras de orina de 24 horas y dos muestras de orina de forma aislada. Efectos secundarios del procedimiento pueden producirse por la toma de sangre en la vena como hematoma (moretón). En la toma de muestra urinaria no hay algún riesgo. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 6 de 7

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se lleven a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación

Entiendo que conservo el derecho de no aceptar a entrar al protocolo en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibe de esta institución.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Antes de decidir participar, lea con cuidado el presente documento y tómese el tiempo que requiera para realizar cualquier pregunta o discutir este estudio con cualquier persona que participe en la investigación, con su familia o con cualquier otro profesional de la salud.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Titulo del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

GRUPO CONTROL

Número de aprobación de protocolo: di/16/105-B/03/041

Hoja 7 de 7

Documento de consentimiento

Usted puede decidir no participar en el estudio, o bien decidir retirarse del estudio. En cualquier caso, no perderá ninguna prestación a la que tenga derecho. Le sugerimos que conserve copia de este documento para consultarlo posteriormente.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en este estudio

Siglas y firma del sujeto de estudio: _____

Familiar responsable o representante legal: _____

Teléfono de casa o celular: _____

Testigo 1.

Nombre y firma:

Dirección: _____

Relación con la paciente: _____

Testigo 2

Nombre y firma: _____

Dirección: _____

Relación con la paciente: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Titulo del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Número de aprobación de protocolo: DI/16/105-B/03/041

Hoja 1 de 7

Nombre del investigador principal: Rafael Valdez Ortiz

Sede donde se realizará el estudio: Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Siglas del nombre del paciente: _____ Edad: ____ México D.F a ____ de _____ del 2016.

Nombre del familiar responsable o responsable legal: _____

Edad: _____ parentesco: _____ con domicilio en: _____

Por medio de la presente, deseamos a invitarlo a usted:

Nombre del familiar responsable: _____ a participar en este estudio de investigación que se llevará cabo en el Hospital general México. Cuyo objetivo es conocer el papel que juega el cotransportador sodio cloro en el desarrollo de preeclampsia (enfermedad hipertensiva que se produce durante el embarazo). Este cotransportador regula la cantidad de sal y líquido en el organismo. Cabe mencionar que su participación es voluntaria. Usted puede decidir no participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento. En cualquier caso no perderá ninguna forma de atención médica en el Hospital. La investigación puede proporcionar información que ayude, en el futuro inmediato, a otras mujeres se encuentren en una situación similar a la suya.

Antes de decidir participar, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Número de aprobación de protocolo: DI/16/105-B/03/041

Hoja 2 de 7

Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. Justificación del estudio. La pre-eclampsia es una enfermedad multisistémica específica del embarazo, complicando 3-6 % de los embarazos y se ha asociado con alto riesgo de parto pretérmino, restricción del crecimiento intrauterino y mortalidad perinatal datos del consejo de evaluación de mortalidad materna en México del 2010 mostró que los trastornos hipertensivos corresponden a la causa número uno de defunción materna en mujeres en edad reproductiva y dentro de estos la pre-eclampsia-eclampsia el principal. Los factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia son múltiples, no siendo prevenible el desarrollo de esta entidad, por lo que el conocimiento de su fisiopatología y factores involucrados en el desarrollo es primordial.

2.- Objetivo: Sera conocer el papel que juega la expresión del cotransportador NCC (sodio-cloro sensible a tiazidas) mediante su cuantificación con exosomas urinarios, en el desarrollo de preeclampsia, y si este se correlaciona con las cifras de hipertensión arterial entre otros parámetros.

3. Beneficios: Podrá conocerse un factor que influye en el desarrollo de hipertensión en la preeclampsia. El bloqueo del cotransportador NCC, con fármacos tipo tiazida en el tratamiento de hipertensión arterial sistémica es ampliamente utilizado hoy en día, es considerado fármaco de

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Hoja 3 de 7

primera línea, y su costo es bajo, por lo que podría plantear la posibilidad de utilizar este fármaco en el embarazo o el desarrollo de nuevos fármacos que bloquen este cotransportador

4. Procedimientos del estudio. Toma de muestras sanguíneas mediante venopunción y toma de muestra urinaria

5. Riesgo del estudio: Alguna complicación de la venopunción como es formación de hematoma, de la muestra de orina no hay riesgo.

6. Aclaraciones: Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

7. Alternativas: La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su totalidad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenido con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Número de aprobación de protocolo: DI/16/105-B/03/041

Hoja 4 de 7

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.

Si tuviera alguna duda o aclaración favor de comunicarse con el Dr. Rafael Valdez Ortiz, al teléfono: 5521285063 ó 5523182868, disponible las 24 hrs. del día; o con la Dra. Estela García Elvira, Presidente del Comité de Ética al teléfono 27 89 2000, ext 1330.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (nombre del familiar responsable o representante legal) _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma de familiar responsable y/o responsable legal
Dirección _____ Fecha _____

Testigo 1
(Nombre y firma) _____ Parentesco: _____ Fecha: _____
Dirección: _____

Testigo 2
(Nombre y firma) _____ Parentesco: _____ Fecha: _____
Dirección: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Número de aprobación de protocolo: DI/16/105-B/03/041

Hoja 5 de 7

He explicado al Sr(a). _____ La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda.

Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Rafael Valdez Ortiz.
Firma del investigador

Fecha

Por medio de la presente, acepto participar en el proyecto de investigación titulado

Registrado en el Comité Local de investigación. El objetivo de este estudio es determinar la expresión del cotransportador NCC en pacientes con preeclampsia. Se tomarán 4 tubos de muestra de sangre mediante venopunción, así como la obtención de 1 muestra de orina de 24 horas y dos muestras de orina de forma aislada. Efectos secundarios del procedimiento pueden producirse por venopunción como equimosis (moretón en el sitio de punción)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Número de aprobación de protocolo: DI/16/105-B/03/041

Hoja 6 de 7

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se lleven a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación

Entiendo que conservo el derecho de no aceptar a entrar al protocolo en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibe de esta institución.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Antes de decidir participar, lea con cuidado el presente documento y tómese el tiempo que requiera para realizar cualquier pregunta o discutir este estudio con cualquier persona que participe en la investigación, con su familia o con cualquier otro profesional de la salud.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio de investigación:

“EXPRESION DE EXOSOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR NCC FOSFORILADO EN PACIENTES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA”

Grupo caso

Número de aprobación de protocolo: DI/16/105-B/03/041

Hoja 7 de 7

Documento de consentimiento

Usted puede decidir no participar en el estudio, o bien decidir retirarse del estudio. En cualquier caso, no perderá ninguna prestación a la que tenga derecho. Le sugerimos que conserve copia de este documento para consultarlo posteriormente.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en este estudio

Siglas y firma del familiar responsable: _____

Familiar responsable o representante legal: _____

Teléfono de casa o celular:-

Testigo 1.

Nombre y firma: _____

Dirección: _____

Relación con la paciente: _____

Testigo 2

Nombre y firma: _____

Dirección: _____

Relación con la paciente: _____