



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**APLICACIÓN DE UN BIOENSAYO *IN VITRO* PARA**  
**DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA**  
**ANGIOTENSINA II COMO PREDICTOR DEL DESARROLLO**  
**DE PREECLAMPSIA.**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA :**  
**MARÍA GUADALUPE BERUMEN LECHUGA**

**TUTOR:**  
**DOCTOR ALFREDO LEAÑOS MIRANDA**  
**IMSS CMN SIGLO XXI, UMAE HGO NUM 4**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX**

**FEBRERO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

**A mi Hijo y a mi Esposo con infinito amor.**

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Agradecimientos**

Este trabajo de Tesis realizado en la Universidad Nacional Autónoma de México es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas que hicieron posible su culminación, a las cuales quiero agradecer en este apartado.

En primer lugar, a mi director de tesis el Dr. Alfredo Leños Miranda, mi más amplio agradecimiento por haber confiado este trabajo en mi persona, por su paciencia ante mi inconsistencia y por su valiosa orientación, seguimiento y supervisión, pero sobre todo por su motivación y apoyo para llegar a la conclusión de este trabajo. Su experiencia, consistencia y perseverancia son una fuente de motivación.

A mis profesores, especialmente a la Dra. Katherine Jáuregui Renaud por el interés mostrado en mi trabajo y las sugerencias otorgadas, así como por sus valiosas enseñanzas, logrando mejoras en mi formación y en mí persona le doy las gracias. Al Dr. Sergio Flores Hernández y el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré también agradezco sus enseñanzas.

Hago extensiva mi gratitud al equipo de investigación del Laboratorio G de la unidad de investigación en medicina reproductiva del HGO Número 4 “Luis Castelazo Ayala” a la Dra. Inova Campos Galicia y Dr. Carlos José Molina Pérez por su colaboración, espíritu de grupo y apoyo incondicional, por los buenos y los malos momentos gracias.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo y el cariño de mis padres Lorenzo y Guadalupe y mis hermanos (Martín, Carlos, Juan, Joel y Jaime), pilares fundamentales en mi vida, por sus palabras de aliento, comprensión y apoyo incondicional mi eterna gratitud.

A mi suegra Eugenia y mi suegro Edmundo (QEPD), así como a mis cuñados Daniel, Edmundo e Isaac por su motivación y apoyo, muchas gracias.

A mi hijo Carlos Eduardo por tu amor, apoyo incondicional y comprensión por mis ausencias y mis malos momentos, infinitas gracias. Eres mi razón y mi principal

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

motivación, las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi gran amor y agradecimiento hacia ti, te amo infinitamente hijo.

A mi esposo Carlos José por ser fuente de inspiración para el logro de este objetivo, porque sin tu apoyo no habría logrado desarrollar con éxito este proyecto de grado. Por tu amor, confianza, lealtad, tolerancia y apoyo incondicional, para ti con todo mi amor, admiración y respeto mi eterno agradecimiento.

Finalmente agradezco a Dios porque sin él nada de esto hubiera sido posible.

María Guadalupe Berumen Lechuga

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Contenido**

Portada.....	0
Dedicatoria.....	1
Agradecimientos.....	2
Contenido .....	4
Resumen Estructurado.....	10
Objetivo.....	10
Marco Teórico.....	10
Métodos y pacientes.....	10
Resultados.....	10
Conclusiones.....	11
Palabras Clave.....	11
Marco Teórico .....	12
Generalidades.....	12
Aspectos epidemiológicos y factores de riesgo.....	13
Fisiopatología de la preeclampsia.....	14
Placentación normal y anormal .....	14
Biomarcadores en la detección de preeclampsia.....	16
Sistema renina angiotensina aldosterona.....	18
Angiotensina II.....	19
Receptor AT2 (AT2R).....	19
Receptor AT1 (AT1R).....	20

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Vías de señalización del receptor AT1 .....	21
SRAA en embarazo normal y preeclampsia. ....	23
Autoanticuerpos anti-receptor tipo 1 de la Ang II (AT1R-AA) .....	24
Angiotensina 1-7 .....	27
Angiotensina II .....	29
Justificación y Planteamiento del problema. ....	35
Pregunta de Investigación 1.....	37
Hipótesis pregunta de investigación 1 .....	37
Objetivo para pregunta de investigación 1 estudio transversal analítico. ....	37
Pregunta de Investigación 2.....	37
Hipótesis para pregunta de investigación 2 .....	37
Objetivo Para pregunta de investigación 2 .....	37
Pacientes, Material y Métodos .....	38
Lugar donde se Realizó el Estudio. ....	38
Diseño de la Investigación.....	38
Pregunta de Investigación, hipótesis y objetivo 1. ....	38
Pregunta de investigación, hipótesis y objetivo 2.....	38
Diseño de la muestra para el estudio transversal analítico .....	39
Criterios de selección: .....	39
Diseño de la muestra para el estudio de casos y controles anidado en una cohorte. ....	41
Criterios de selección: .....	41
Definición de las Variables.....	43

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Estudio transversal analítico.....	43
Variable Independiente.....	43
Variable Dependiente o de clasificación .....	43
Estudio Casos y Controles anidado en una cohorte.....	45
Variable dependiente .....	45
Variable independiente .....	46
Variables de confusión .....	47
Variables descriptoras.....	49
Descripción y Consideraciones Generales del Estudio. ....	53
Estudio transversal analítico.....	53
Estudio de casos y controles anidado en una cohorte.....	53
Análisis Estadístico. ....	55
Análisis exploratorio. ....	55
Análisis Descriptivo. ....	55
Análisis inferencial y magnitud de la asociación. ....	55
Tamaño de la Muestra. ....	57
Estudio transversal analítico.....	57
Estudio Casos y controles anidado en una cohorte.....	57
Aspectos Éticos .....	59
Riesgo del estudio.....	59
Apego a las normas éticas. ....	59
Consentimiento informado. ....	59

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Contribuciones y beneficio a los participantes.....	60
Balance riesgo/beneficio.....	60
Confidencialidad.....	60
Obtención del consentimiento informado. ....	61
Selección de participantes. ....	61
Beneficios al final del estudio. ....	61
Factibilidad. ....	62
Resultados.....	63
Expresión estable y especificidad de la respuesta del receptor de angiotensina II tipo 1 humano (AT1R) y del factor nuclear de células T activadas (NFAT) en la línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK-293). ....	63
Bioensayo en células hAT1-NFAT-Luc HEK-293 de la Ang II en suero.....	69
Estudio transversal analítico.....	73
Concentración sérica de Angiotensina II en embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa.....	75
Estudio Casos y controles anidado en una cohorte.....	77
Cambios gestacionales en las concentraciones séricas de Angiotensina II medidas por bioensayo <i>in vitro</i> . ....	79
Concentración sérica de Angiotensina II medida por bioensayo <i>in vitro</i> y riesgo de desarrollar preeclampsia. ....	80
Discusión. ....	86
Conclusiones.....	93
Anexo 1. Cronograma de Actividades.....	94

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Anexo 2. Carta de consentimiento informado Estudio de Casos y Controles anidado en una cohorte .....	97
Anexo 3. Carta de consentimiento informado Estudio Transversal analítico. (Embarazo normal sin preeclampsia).....	103
Anexo 4. Carta de consentimiento informado Estudio Transversal analítico. (Preeclampsia Leve o severa).....	109
Anexo 5. Manual de Procedimientos.....	115
Anexo 6. Descripción del Bioensayo utilizado en esta investigación. ....	122
Anexo 7. Clasificación y tipos de Bioensayos .....	124
Anexo 8. Técnica del Bioensayo <i>in vitro</i> .....	125
Medio de Cultivo de Crecimiento .....	125
100 ml DMEM suplementado .....	125
Medio de Cultivo de crecimiento Suplementado con Geneticina (antibiótico aminoglucósido al cual las células Hek 293 son resistentes.....	125
Descongelamiento y siembra de células hek-293.....	125
Disgregación celular o tripsinización. (campana estéril).....	126
Conteo Celular.....	126
Resiembra o Pase celular.....	127
Medio de Cultivo para Bioensayo 100 ml.....	127
Placa de Bioensayo.....	127
Medio de cultivo (depletado de suero) 200 ml.....	127
Muestras Para Agonismo. (Ang II pura 1 mcg/10 mcl) .....	128
Preparar Stock Ang II de 2 ml a 2 mcg/ml.....	128

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Muestras para Antagonismo (telmisartán 1 mcg/3 mcl).....	128
Preparar Stock Telmisartán de 1.5 ml a 4 mcg/ml .....	130
Para la Lectura final.....	130
Determinación de concentración de Ang II.....	130
Referencias Bibliográficas.....	131

**“Aplicación de un bioensayo *in vitro* para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Resumen Estructurado.**

### **Objetivo.**

- 1) Determinar si existe diferencia en la concentración sérica de angiotensina II (Ang II) medida por un bioensayo *in vitro* entre mujeres con un embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa.
- 2) Determinar si las concentraciones séricas de Ang II medida por un bioensayo *in vitro* están asociadas al riesgo de desarrollar preeclampsia.

### **Marco Teórico.**

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica específica del embarazo que afecta entre el 5 al 8% de todos los embarazos y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal en todo el mundo, por lo que representa un problema de salud pública. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) juega un papel importante en la regulación de la función renal y la presión arterial en una variedad de condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, por lo que el embarazo y la preeclampsia no son una excepción. Se ha demostrado que las mujeres con un embarazo normal tienen una respuesta vascular disminuida a la infusión de Ang II, mientras que en las pacientes con preeclampsia presentan una sensibilidad incrementada a ella, la cual, incluso está presente antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Sin embargo, los estudios que abordan la relación entre las concentraciones circulantes de Ang II y preeclampsia han rendido resultados controversiales. Con el fin de re-evaluar si la concentración sérica de Ang II se asocia a la preeclampsia y si puede ser de utilidad en su predicción, en el presente estudio empleamos un bioensayo *in vitro* previamente validado el cual responde específicamente y de una manera dosis-dependiente a la Ang II.

### **Métodos y pacientes.**

Para determinar diferencias en la concentración sérica de Ang II entre mujeres con embarazo normal y pacientes con preeclampsia leve y severa a su diagnóstico, se realizó un estudio transversal comparativo. Se incluyeron 30 mujeres con embarazo normal y 60 mujeres con preeclampsia (30 con preeclampsia leve y 30 con preeclampsia severa). Para determinar la utilidad de la concentración sérica de Ang II con el riesgo de desarrollar preeclampsia, se realizó un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de 412 mujeres con embarazo único. Se eligieron 30 mujeres que eventualmente desarrollaron preeclampsia (casos) y 30 mujeres con un embarazo normoevolutivo (controles). Las mujeres fueron reclutadas a partir de las 12 semanas de gestación y fueron seguidas a intervalos de 4 semanas hasta la semana 36 semanas o hasta la resolución del embarazo.

### **Resultados.**

En el estudio transversal, la mediana de la concentración sérica de Ang II en las mujeres con un embarazo normal fue significativamente mayor que en las pacientes con

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

preeclampsia leve o severa (70.4 ng/ml [RIQ 14.4-213.8] vs. 15.2 ng/ml [RIQ 4.5-43.4] y 7.6 ng/ml [RIQ 2.5-19.9], respectivamente [ $p \leq 0.007$ ]). Además, las concentraciones séricas de Ang II fueron significativamente más elevadas en las pacientes con preeclampsia leve que en las pacientes con preeclampsia severa ( $p=0.04$ ).

En el estudio de casos y controles, encontramos que las mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia tuvieron concentraciones séricas de Ang II más bajas que las mujeres con un embarazo normal desde la semana 12 de gestación y hasta el final del seguimiento ( $p \leq 0.03$ ). El riesgo de desarrollar preeclampsia fue mayor entre las mujeres con valores de la concentración sérica de Ang II en el cuartil más bajo de la distribución de los controles. La RM fue significativa desde las 12 semanas de gestación y en adelante ( $\geq 3.8$ ,  $p \leq 0.02$ ).

**Conclusiones**

Existe diferencia en la concentración sérica de Ang II medida mediante un bioensayo *in vitro* entre mujeres con embarazo normal, mujeres con preeclampsia leve y con preeclampsia severa, estos hallazgos sugieren una relación entre la concentración de Ang II y la severidad de la enfermedad. Los cambios en las concentraciones séricas de Ang II medida por un bioensayo *in vitro* preceden al desarrollo de preeclampsia y su concentraciones bajas están asociadas al riesgo de desarrollarla.

**Palabras Clave.**

Embarazo, Preeclampsia, Biomarcadores, Angiotensina II, SRAA.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Marco Teórico**

### **Generalidades.**

La preeclampsia es un síndrome específico del embarazo que usualmente ocurre después de las 20 semanas de gestación y que se caracteriza por el desarrollo de hipertensión con cifras de presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg o diastólica  $\geq 90$  mmHg en mujeres previamente normotensas, acompañada de proteinuria significativa, definida como una excreción urinaria de proteínas de 300 mg o más en una muestra de orina de 24 horas o por una relación proteína/creatinina  $\geq 0.3$  mg/mg. Si además de lo anterior, se acompaña de uno o más de los siguientes criterios aún en ausencia de proteinuria, será considerada como preeclampsia con datos de severidad: a) presión arterial sistólica  $\geq 160$  mmHg o una diastólica  $\geq 110$  mmHg, b) trombocitopenia menor a 100,000/ $\mu$ l, c) daño hepático manifestado por elevación de enzimas hepáticas (al doble de la concentración normal) o dolor abdominal en el cuadrante superior derecho o epigastrio persistente o ambas, d) insuficiencia renal progresiva (creatinina sérica  $>1.1$  mg/dl o el doble del valor basal en ausencia de otra enfermedad renal), e) edema pulmonar o cianosis y f) trastornos visuales o cerebrales de nueva aparición (1,2).

Aunque el origen de este síndrome aún no es claro, se ha sugerido entre sus posibles causas una falla en la regulación de los factores genéticos y las vías biológicas que contribuyen a un comportamiento anormal en la preeclampsia, lo que afecta la fisiología placentaria debido a una disfunción endotelial causada por un desequilibrio entre los factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos placentarios: con disminución del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) y del factor de crecimiento placentario (PlGF, por sus siglas en inglés) y altas concentraciones del factor soluble fms-like tirosina cinasa 1 (sFlt-1, por sus siglas en inglés) y de la endoglina soluble (sEng), , así como a un desequilibrio en la producción y acción de agentes vasoactivos que resulta en vasoconstricción y disminución en la perfusión a nivel multiorgánico y placentario (3,4,5).

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Aspectos epidemiológicos y factores de riesgo.**

La preeclampsia afecta hasta un 10% de las mujeres embarazadas y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal en todo el mundo, por lo que representa un problema de salud pública (6,7). Se estiman alrededor de 60,000 a 100,000 muertes maternas por año en el mundo. En México, ocasiona el 25 % de las muertes maternas y en el Instituto Mexicano del Seguro Social, se reportaron 1,033 muertes maternas por preeclampsia-eclampsia de acuerdo a los comités de estudios de mortalidad materna durante el periodo de 1987-1996 (7) y es reportada como la principal causa de morbilidad y mortalidad materna en el año 2012 con una razón de muerte materna 26.4 por cada 100,000 nacidos vivos (8). El Instituto Nacional de Geografía Estadística e Informática el 10.05.13 reporta una razón de mortalidad materna durante el año 2012 de 50.3 defunciones por cada 100,000 nacidos vivos, un 76% se debieron a complicaciones obstétricas directas, de las cuales un 32% correspondieron a enfermedades hipertensivas del embarazo (9,10,11).

En la UMAE Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” durante el año 2012 se atendieron un total de 10,678 nacimientos según lo referido en la revista de la misma unidad y un total de 1,621 pacientes se reportaron complicadas con enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo en cualquiera de sus modalidades durante dicho periodo (12).

Por otro lado, la preeclampsia es referida como la primera causa de ingreso a la unidad de cuidados intensivos por causa materna, debido principalmente a complicaciones mayores como hemorragia cerebral, infarto o ruptura hepática e insuficiencia renal aguda. Otras complicaciones también frecuentes son eclampsia definida como presencia de convulsiones de gran mal de nueva aparición antes, durante o después del parto en una mujer previamente diagnosticada con preeclampsia, así como el síndrome HELLP acrónimo en inglés de (elevación de enzimas hepáticas, hemólisis y plaquetopenia) cuyos criterios diagnósticos son: hemolisis caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, hallazgo de esquistocitos y equinocitos en frotis de sangre periférica, incremento de bilirrubina

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

indirecta y elevación de deshidrogenasa láctica usualmente >600 UI/L, elevación de enzimas hepáticas al doble del valor normal y disminución del recuento plaquetario por debajo de 100,000). Desde el punto de vista perinatal está asociada con un riesgo incrementado de muerte fetal, feto pequeño para edad gestacional (FPEG), prematuridad y síndrome de distrés respiratorio neonatal o enfermedad de membrana hialina, lo que conlleva a un mayor número de ingresos a la unidad de cuidados intensivos neonatales y por lo tanto ocasiona un incremento en los costos de la atención médica materna y neonatal (13,14,15).

Entre los factores de riesgo relacionados con preeclampsia se incluyen primiparidad, preeclampsia en embarazo anterior, hipertensión arterial crónica o enfermedad renal crónica, historia de trombofilia, embarazo múltiple, fertilización in vitro, historia familiar de preeclampsia, diabetes pregestacional tipo 1 y 2, obesidad, lupus eritematoso sistémico y edad materna avanzada (>40 años), así como estrato socioeconómico bajo, pobre educación, privación física y social. (16,17,18,19,20). Recientemente Sykes y colaboradores han relacionado al sexo femenino fetal con el riesgo de desarrollar preeclampsia e hipertensión gestacional (21,22). Paradójicamente el tabaquismo materno se ha asociado con una reducción de alrededor del 30% en el riesgo de desarrollar preeclampsia, debido a que se ha demostrado que la expresión placentaria del factor del VEGF es mayor en mujeres fumadoras y este aumento en las primeras etapas del embarazo podría contribuir a la disminución del riesgo de desarrollar preeclampsia (23,24).

### **Fisiopatología de la preeclampsia**

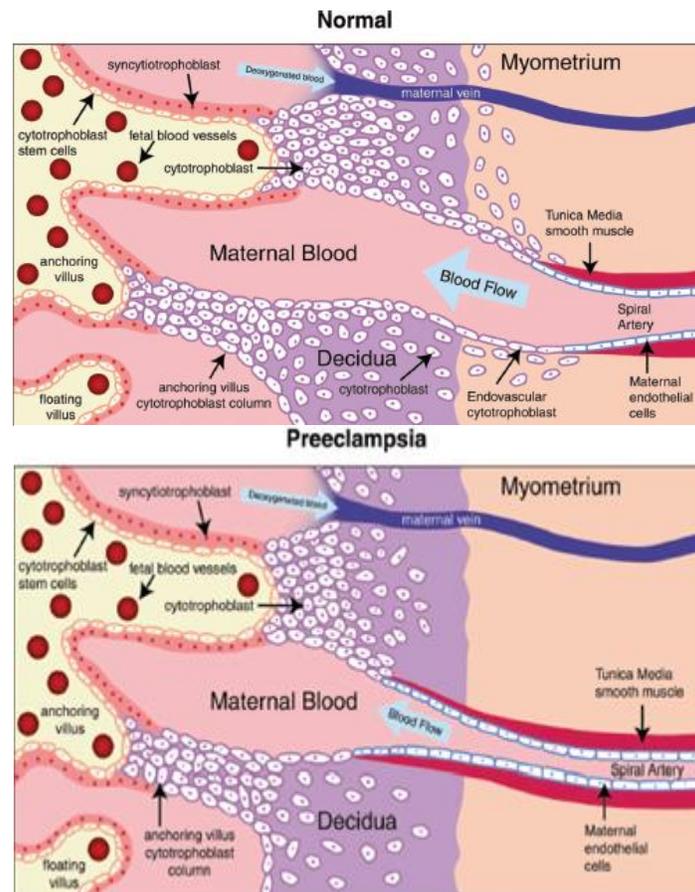
#### **Placentación normal y anormal**

En el desarrollo placentario normal, la invasión del citotrofoblasto de origen fetal invade las arterias espirales uterinas maternas, transformándolas de vasos de pequeño calibre y alta resistencia a vasos de mayor calibre y baja resistencia, con la capacidad de proveer una perfusión placentaria adecuada para el sostén y crecimiento del feto; durante este proceso

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

de invasión vascular, el citotrofoblasto se diferencia de un fenotipo epitelial a un fenotipo endotelial, un proceso referido como pseudovasculogénesis o mimetismo vascular (Figura 1. Superior). En la preeclampsia, el citotrofoblasto falla para adoptar un fenotipo endotelial y en vez de una invasión profunda a las arterias espirales uterinas, la invasión es muy superficial lo que ocasiona que permanezcan con sus características anteriores, es decir; siguen siendo vasos de pequeño calibre y alta resistencia (Figura 1. Inferior). (25,26,27)



**Figura 1.** Desarrollo placentario en embarazo normal y embarazo complicado con preeclampsia (Tomado y modificado de Camille et al [26]).

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Biomarcadores en la detección de preeclampsia.**

En los últimos años hemos sido testigos de una notable mejoría en el manejo de las mujeres preeclámplicas, sin embargo no se ha manifestado significativamente en la disminución de su morbilidad y mortalidad sobre todo en los países en vías de desarrollo, ya que el desafío radica en la identificación temprana de la enfermedad, incluso antes de los signos clínicos propios de la preeclampsia.

Por lo tanto, es relevante mencionar que la placentación anormal es central para la evolución de este proceso de la enfermedad. Sin embargo, el factor desencadenante es aún desconocido. Interesantemente, una intensa investigación realizada en este campo ha dado a conocer diferentes biomoléculas que desempeñan un papel importante en la vasculogénesis de la placentación temprana y manifestaciones clínicas de disfunción endotelial sistémica característica de la preeclampsia, como son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y principalmente del factor de crecimiento placentario (PIGF) el cual muestra una disminución significativa desde las 9-11 semanas de gestación y que su máximo descenso precede por varias semanas las manifestaciones clínicas de la preeclampsia. Así como de su proteína bloqueadora, el sFlt-1, y del bloqueador del factor del crecimiento transformante  $\beta$ -1, la sEng y de la relación entre ambos factores pro-angiogénicos (PIGF) y anti-angiogénicos (sFlt-1 y sEng). (28,29).

Se ha demostrado que un incremento significativo de la relación sFlt-1/PIGF precede por alrededor de 5 semanas el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la preeclampsia. (2,15,30) Aunque este desequilibrio entre los factores pro- y anti-angiogénicos no es específico de la preeclampsia, ya que también se presenta en casos de restricción del crecimiento intrauterino puro, por lo que, la gravedad y el momento del desequilibrio angiogénico, junto con la susceptibilidad materna pueden determinar la presentación clínica de la preeclampsia. (31)

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) también ha sido implicado en la fisiopatología de la preeclampsia, incluyendo los anticuerpos agonistas anti-receptor de la

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Ang II tipo 1 (AT1-AA) (32) y la Ang II. Así como también, otros marcadores inmunológicos como la proteína 13 placentaria y proteína A plasmática asociada al embarazo, marcadores endócrinos como la inhibina A y la activina A, marcadores genéticos como los miRNAs donde se ha demostrado una desregulación en las placentas de mujeres preeclámpticas del miR155, miR-210 y miR-34a y por último, marcadores ultrasonográficos como la velocimetría doppler para la evaluación de las arterias uterinas en el embarazo temprano (33,34). En la tabla 1 se muestra un resumen del estado actual del conocimiento acerca de algunos biomarcadores en la preeclampsia.

**Tabla 1. Potenciales biomarcadores para la detección temprana de preeclampsia**

<b>Marcadores Angiogénicos</b>	Proangiogénicos	PlGF	Disminuido
	Antiangiogénicos	sFlt1	Incrementado
		Rel PlGF/sFLT1	Incrementado
		sEng	Incrementado
<b>SRAA</b>		AT1-AA	Incrementado
		Ang II	Controversia
<b>Marcadores inmunológicos</b>		PP-13	Disminuido
		PAPP-A	Disminuido
<b>Marcadores endócrinos</b>		Inhibina A	Incrementado
		Activina A	Incrementado
<b>Marcadores genéticos</b>		miR-210	Desregulado
		miR-34 <sup>a</sup>	Desregulado
		miR-155	Desregulado

PlGF (factor de crecimiento placentario), sFlt1 (factor soluble fms-like tirosina cinasa 1), sEng (endoglina soluble), PP13 (proteína placentaria 13), PAPP-A (proteína A plasmática asociada al embarazo), miR (microRNA). Tomado y modificado de Kar M. Referencia 33.

Siguiendo en esta línea de búsqueda de potenciales biomarcadores Kenny LC y cols. realizaron un estudio de cohorte en 5623 mujeres entre 14-16 semanas buscando desarrollar un método para predecir preeclampsia combinando diversos factores clínicos y biomarcadores, sin embargo múltiples combinaciones proporcionaron solo una modesta predicción de preeclampsia, por lo que la búsqueda del mejor modelo de predicción del desarrollo de preeclampsia debe continuar (35,36).

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Sistema renina angiotensina aldosterona.**

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) juega un papel importante en la regulación a corto y largo plazo de la presión arterial durante una variedad de condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, donde el embarazo y la preeclampsia no son una excepción.

Embriológicamente el riñón y el útero se desarrollan en íntima proximidad, cada uno a través de los conductos metanéfricos y paramesonéfricos respectivamente, una vez maduros éstos órganos tienen una similitud en la disposición de su vasculatura, es decir ambos cuentan con arterias arcuatas con ramificaciones colocadas radialmente, de éstas ramificaciones surgen las arterias espiral y glomerular del útero y el riñón, respectivamente. Las arterias espirales del útero en el embarazo son invadidas por la placenta para formar la unidad fetoplacentaria, donde el flujo intervelloso materno de la unidad fetoplacentaria del útero grávido es la contraparte conceptual del flujo glomerular en el riñón, por lo tanto los mecanismos bioquímicos vasomotores que regulan el flujo sanguíneo entre estos órganos es también similar. Los diferentes componentes del SRAA se encuentran extensamente distribuidos a lo largo de la unidad úterofetoplacentaria. El angiotensinógeno, la renina, la enzima convertidora de angiotensina, la angiotensina I (Ang I), la Ang II y los receptores de la Ang II tipo 1 y 2 (AT1R y AT2R) se encuentran en la placenta y útero, incluyendo el endometrio y miometrio, membranas fetales y líquido amniótico. Incluso el RNAm del angiotensinógeno está presente en el conjunto placentario a partir de las 6 semanas de gestación (37-40).

El SRAA es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, en el que la renina que es sintetizada por las células granulares del aparato yuxtaglomerular del riñón, escinde al angiotensinógeno en su porción amino terminal para formar el decapeptido Ang I (38-39). El riñón es el único sitio conocido en donde la prorrenina es convertida en renina y la única fuente de renina plasmática. El hígado es el lugar más importante de expresión del gen del angiotensinógeno, pero su RNAm también se expresa en varios lugares extrahepáticos, incluyendo el cerebro, grandes arterias, el riñón, tejido adiposo y el corazón. Se ha estimado que más del 85% de la ang I se forma dentro de los

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

tejidos, más que en el plasma, hasta ahora no hay pruebas de que la síntesis local de angiotensinógeno afecte la velocidad de formación de Ang I en los tejidos. Una vez convertida la Ang I a partir del angiotensinógeno por la acción de la renina, ésta es convertida proteolíticamente en Ang II (39).

### **Angiotensina II**

La Ang II (considerado el péptido efector principal de este sistema) es un octapéptido originado por la escisión de 2 aminoácidos en la región carboxilo-terminal de la ang I por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) principalmente a nivel pulmonar. Sin embargo, ahora se sabe que muchos tejidos, incluidos vasos sanguíneos, riñón, corazón, cerebro y placenta son capaces también de generar en forma local Ang II a través de vías no dependientes de la ECA (vías no-ECA) como la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G (teniendo como sustrato la ang I) y a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato al angiotensinógeno). La Ang II actúa a través de al menos dos clases de receptores, los receptores AT1R y AT2R. La vida media de la Ang II en la circulación es corta < 1 minuto (40,43).

La Ang II no distingue los receptores AT1R y AT2R, es decir; se une al receptor AT2R con afinidad similar a la del receptor AT1R y la acción funcional dependerá por lo tanto de qué receptor se encuentre con más expresión en el organismo. La mayoría de los efectos fisiológicos de la Ang II son mediados a través de los receptores AT1R ya que los receptores AT2R se expresan principalmente durante el periodo fetal y se asocian con la diferenciación y regeneración celular. (41,42)

### **Receptor AT2 (AT2R)**

El AT2R tiene una masa molecular de 41 kDa. El gen del AT2R ha sido localizado en el cromosoma X y se compone de 3 exones y la secuencia codificadora se encuentra en el tercer exón. A diferencia del AT1R, distribuido en una amplia variedad de tejidos, el AT2R se encuentra expresado primordialmente en tejidos fetales, por lo que tiene una distribución amplia en el feto y ésta disminuye con la edad (patrón transitorio de expresión),

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

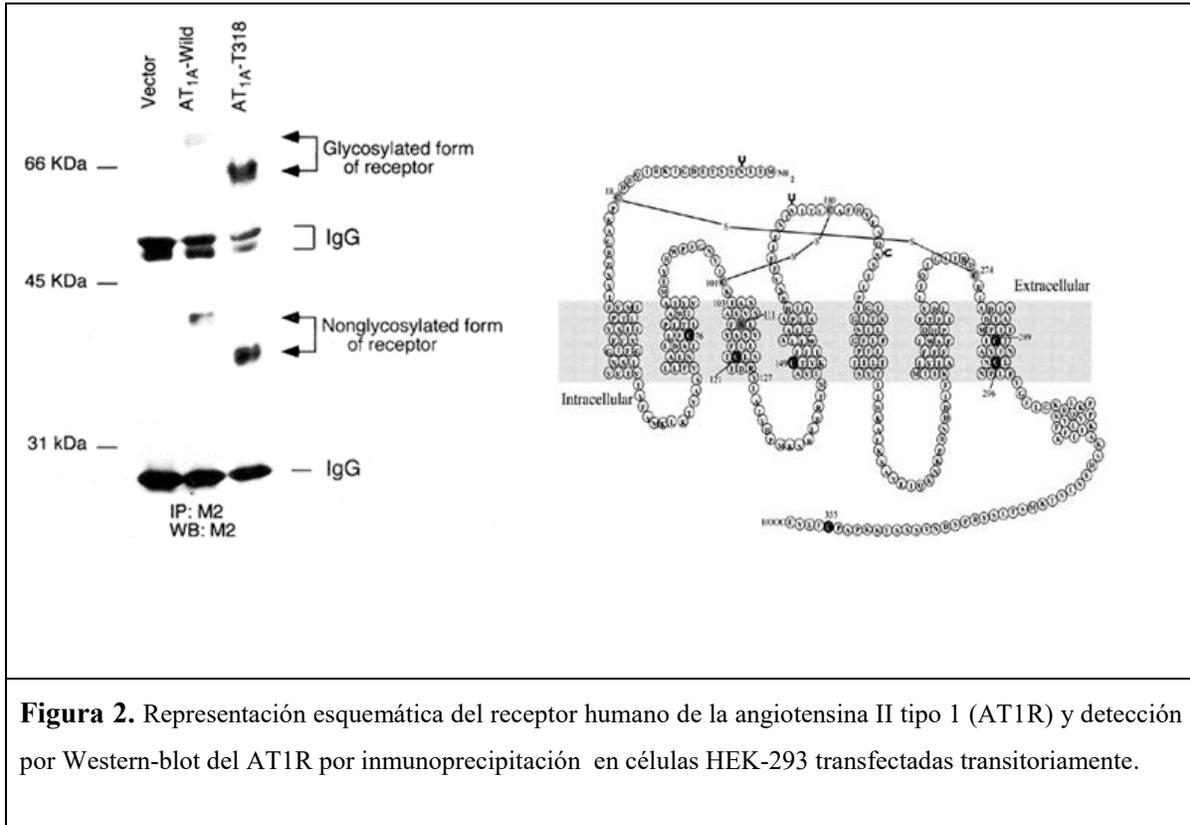
permaneciendo expresado en el adulto en tejidos como la aorta y arterias coronarias y con una densidad mucho menor en la médula suprarrenal, cerebro y tejidos reproductores. (39) El AT2R compensa el efecto del AT1R desempeñando una función importante en el desarrollo, diferenciación celular y la reparación de tejidos. Mientras que la Ang II fomenta la fosforilación de varias proteínas mediante el AT1R, la desfosforilación ocurre por su acción a través del AT2R. Los efectos más visibles de la estimulación del AT2R son vasodilatación, antiproliferación (al disminuir la migración de células endoteliales) y modulación en la formación de matrices. (40,44)

**Receptor AT1 (AT1R)**

El AT1R de la ang II pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G, los cuales se caracterizan por tener 7 dominios transmembranales conectados por 3 asas intracelulares y 3 asas extracelulares, al igual que el AT2R tiene una masa molecular de 41 kDa y es codificado por un gen localizado en el cromosoma 3 (Figura 2). Se expresa principalmente en las glándulas suprarrenales, el músculo liso vascular, el riñón, corazón y cerebro (33,39). Las vías de señalización del AT1R son diversas, como la inhibición de la adenilciclase y la estimulación o activación de la fosfolipasa C, D y A2, así como los canales de calcio, siendo así que su estimulación promueve la movilización de calcio en cuestión de segundos, así mismo el AT1R está acoplado a cascadas de señalización intracelular que regulan la transcripción de genes y la expresión de proteínas que median la proliferación y crecimiento celular. Una vez estimulado el AT1R por la ang II inicia una secuencia de transcripciones que conllevan a una serie de efectos sistémicos y locales estimulando la proliferación celular o induciendo la apoptosis. Una función observada del AT1R es la inducción y activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandinas y de tromboxano A-2, activando al factor-1 alfa inducido por hipoxia, el cual aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando así la angiogénesis y la remodelación vascular. (40)

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

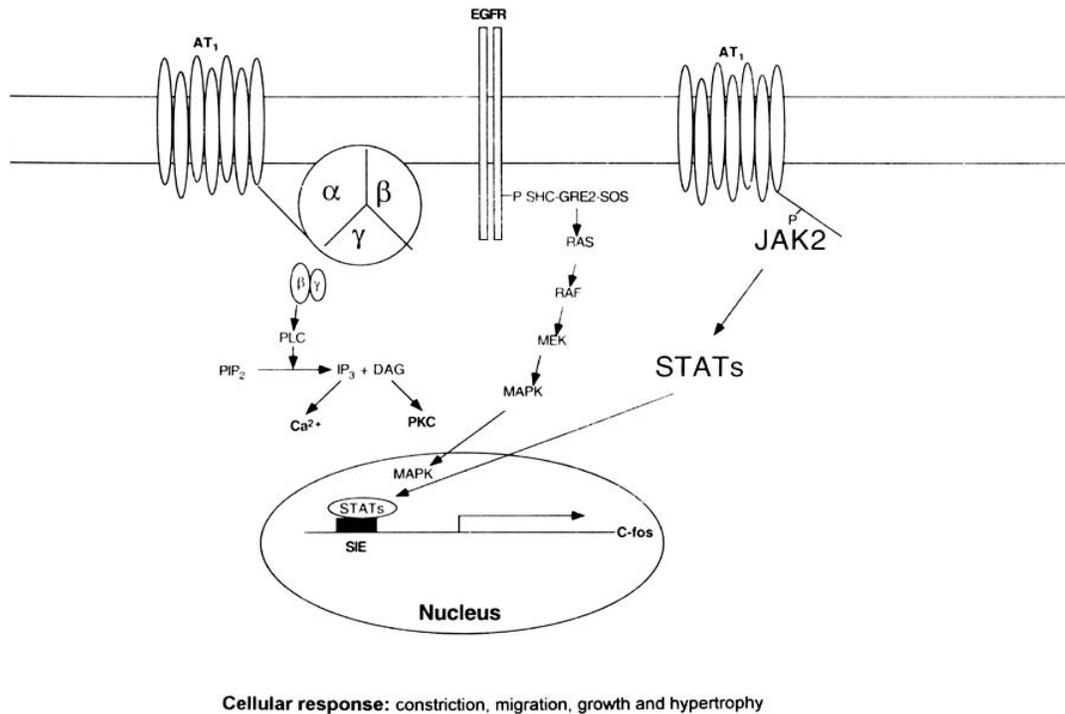


### Vías de señalización del receptor AT1.

Los estudios enfocados en las vías de transducción de señales mediadas por el AT1R han hecho evidente que la señal inducida por ang II varía de segundos por activación de la fosfolipasa C, generación de inositol fosfatos y la liberación de Ca<sup>2+</sup>, a minutos activada por mitógeno (proteína de activación de la quinasa) y a horas (activación de cinasa Janus (JAK). [Figura 3]

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI



Cellular response: constriction, migration, growth and hypertrophy

Figura 3. Ilustración de la vía de transducción de señal de la cascada de proteína G y tirosina cinasa. Imagen tomada de Watanabe T. et al (45)

La activación de la proteína G por el AT<sub>1</sub>R inicia una búsqueda para la región del receptor AT<sub>1</sub> que media esta activación. El acoplamiento a proteínas G es dependiente de la región proximal carboxilo-terminal de receptor AT<sub>1</sub>, específicamente el grupo hidrofóbico del Tyr312, Phe313 y Leu314. (45)

### ***Internalización del receptor AT<sub>1</sub>.***

Los receptores acoplados a la proteína G son internalizados por un proceso de endocitosis vesicular revestidas de clatrina. Este escudo de vesículas revestidas de clatrina consiste en 1) un complejo de proteínas de clatrina y 2) un complejo de adaptador de clatrina. La primera media la internalización del complejo receptor-ligando de la membrana plasmática, y los segundos transportan las proteínas de la red trans-Golgi recién sintetizadas. Así pues, los complejos de adaptador se encuentran inmediatamente adyacentes a la cara

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI  
citoplasmática de la membrana plasmática y son capaces de interactuar directamente con el extremo carboxilo terminal de los receptores.

***Desensibilización del receptor AT1.***

La transducción de señales de los receptores acoplados a proteína G (fosforilación Ang II dependiente) a menudo se acompañan por una rápida desensibilización, es decir, la atenuación de la respuesta celular a la exposición prolongada o repetida por agonistas. Por 3 mecanismos principales 1) desenganche rápido de la proteína G, 2) Secuestro de los receptores en vesículas endosomales, y 3) la regulación por disminución de la cantidad total de receptores. El rápido desacoplamiento del complejo ligando-receptor de proteína G se produce en un tiempo muy corto (de segundos a minutos después de la unión del ligando) y desplaza al receptor a una forma de baja afinidad.

***Tráfico del receptor AT1.***

El complejo adaptador acoplado a Ang-II-AT1R se internaliza en endosomas. Después de la separación de la Ang II, el AT1R se recicla de nuevo a la membrana plasmática, mientras que Ang II es dirigida a la vía de degradación lisosomal para su eliminación. (41)

**SRAA en embarazo normal y preeclampsia.**

El SRAA es un importante regulador de la presión arterial y de la homeostasis de sodio y agua durante el embarazo. Algunos estudios sugieren la presencia de un SRAA local y específico en la unidad uteroplacentaria, ejemplo de ello es el estudio realizado por Jiangming Luo y colaboradores que reportan el hallazgo de todos los componentes necesarios del sistema renina angiotensina clásico expresadas en las células placentarias humanas, así como el grupo de investigación de Anton L y colaboradores que reportan que este SRAA desempeña un papel endócrino local que actúa a nivel placentario y del tejido uterino adyacente, reportando que la Ang II actúa principalmente a través del AT1R ya que tanto en las placentas de mujeres normales como en preeclámpticas el subtipo de receptor AT1R fue el predominante.(42:43:44,48)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Este SRAA local está involucrado en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos del embarazo, la ang II específicamente está involucrada en la regulación de la resistencia vascular y el flujo sanguíneo uteroplacentario, las concentraciones placentarias bajas de Ang II incrementan el flujo uteroplacentario, mientras que concentraciones altas de Ang II reduce el flujo uteroplacentario activando la expresión del gen inhibidor tipo I del activador de plasminógeno a través del AT1R, lo cual inhibe la invasión del trofoblasto proceso necesario para la adecuada unión entre el sistema circulatorio materno fetal. (44,45).

Por otro lado, en la unidad útero-fetoplacentaria los estrógenos producidos por la placenta causan activación y sobre-expresión del SRAA incrementando los niveles tisulares locales y séricos de angiotensinógeno y renina. Así como un incremento significativo de la ECA y como consecuencia la Ang II plasmática se incrementa durante el embarazo, para después disminuir a sus valores preconcepcionales posterior al puerperio. ( 46,47,48,49,50 )

**Autoanticuerpos anti-receptor tipo 1 de la Ang II (AT1R-AA)**

Múltiples estudios han reportado la presencia de AT1R-AA en mujeres con preeclampsia y que su presencia puede explicar muchas de las alteraciones fisiopatológicas presentadas en estas pacientes. ( 51, 52, 53, 54, 55, 56 ) Un estudio reportó una expresión del AT1R particularmente alta en la decidua, lo cual implica producción local de Ang II y AT1R-AA, demostrándose también el cruce de la barrera uteroplacentaria por este autoanticuerpo encontrándolo tanto en las madres como en sus infantes. (57)

Dragun y Riemekasten reportan la presencia de AT1R-AA en la circulación de pacientes con diferentes trastornos hipertensivos como hipertensión esencial, insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal, pacientes con trasplante renal con hipertensión maligna y rechazo al injerto, enfermedades autoinmunes como esclerosis sistémica, que son capaces de: 1) activar al AT1R de Ang II, 2) que estos autoanticuerpos contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad, 3) los títulos de anticuerpos se correlacionan con la severidad de la enfermedad, y 4) el bloquear o eliminar estos autoanticuerpos patógenos

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

tienen beneficio terapéutico. Con lo anterior se demuestra que los AT1R-AA no se limitan al embarazo (58, 59).

Walther en el 2005 (60) realiza un estudio con 2 poblaciones diferentes, el primer grupo estuvo conformado por 52 embarazos entre las 18-22 semanas, y una segunda población conformada por 36 embarazos al término de la gestación. En ambos grupos se determinó la presencia de AT1R-AA y por medio de velocimetría doppler de arterias uterinas se identificó si había una perfusión uterina normal o anormal.

El primer grupo (18-22 SDG) se vigilaron longitudinalmente y se dividieron en aquellas que tuvieron un curso normal del embarazo y quienes desarrollaron preeclampsia o retraso en crecimiento intrauterino (RCIU). De las 52 mujeres incluidas, 21 contaron con perfusión uterina normal y tuvieron un curso del embarazo normal y ninguna (0%) tuvo la presencia de AT1R-AA. Los 31 embarazos restantes con perfusión uterina anormal, 21 tuvieron un curso normal del embarazo, de los cuales 8 (39%) tuvieron AT1R-AA negativos y 13 (61%) contaron con AT1R-AA positivos, De los 10 embarazos restantes complicados: 5 desarrollaron preeclampsia tardía de los cuales 4 (80%) contaron con AT1R-AA positivos y 5 se complicaron con RCIU tardío de los cuales 3 (60%) fueron AT1R-AA positivos.

En el segundo grupo de estudio formado por 36 embarazos de término, 10 cursaron un embarazo normal, de los cuales 5 contaron con perfusión uterina normal y AT1R-AA negativos, en los 5 restantes con perfusión uterina anormal se detectaron AT1R-AA positivos (100%), los 26 embarazos restantes complicados fueron como sigue: 19 presentaron preeclampsia, de los cuales 17 (89%) tuvieron AT1R-AA positivos y 7 se complicaron con RCIU de los cuales 6 (86%) tuvieron AT1R-AA positivos.

Concluyendo que los AT1R-AA son un marcador temprano pero no específico de preeclampsia y que la generación de éste anticuerpo parece estar asociado con complicaciones secundarias a una alteración placentaria y ser causal de una perfusión útero-placentaria patológica. (59)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Huber y colaboradores reportan el hallazgo de embarazo normal y AT1R-AA positivo, lo cual es consistente con lo reportado por Walther de que este autoanticuerpo ya era detectado durante el segundo trimestre en la mayoría de las pacientes con perfusión uterina anormal identificada mediante uso de velocimetría doppler de arterias uterinas no solo en mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia o RCIU sino también en 13 de 21 mujeres que cursaron un embarazo sin complicaciones y parto normal. (61)

Continuando en la misma línea de investigación, Stepan y colaboradores estudiaron 51 pacientes, de las cuales 15 pacientes cursaron con embarazo normal, 36 con perfusión uterina anormal (detectada entre las 18 y 22 semanas de gestación mediante velocimetría doppler de arterias uterinas) de las cuales 25 pacientes presentaron una evolución del embarazo normal y 11 desarrollaron alteración (4 preeclampsia y 7 RCIU) donde la presencia de AT1R-AA fue de 0% en las primeras 15 pacientes, 60% en perfusión anormal con embarazo normoevolutivo y 73% en perfusión uterina anormal y embarazo complicado con preeclampsia o RCIU; en todos los casos con una correlación y valor de P no significativo, por lo que la generación de AT1R-AA parece estar estrechamente asociada con disminución de la perfusión uteroplacentaria en el que con frecuencia pero no siempre se desarrollan trastornos en el embarazo (específicamente Preeclampsia y RCIU).( 62)

Por otro lado, un estudio realizado en población de mujeres mexicanas donde se estudiaron 525 mujeres con embarazo a partir de las 20 semanas de gestación (99 con un curso normal del embarazo, 96 con preeclampsia leve y 330 con preeclampsia severa), la frecuencia de AT1R-AA tanto en mujeres sanas como en mujeres con preeclampsia leve o severa fue de 0%, lo cual genera controversia acerca de si los AT1R-AA en realidad juegan un papel directo en la fisiopatología de la preeclampsia o si simplemente son una consecuencia del proceso de una enfermedad subyacente. Los estudios donde se reportan AT1R-AA positivos son en población europea o norteamericana lo cual pudiera estar asociado a un proceso racial o de ancestría, por lo que debido al origen multifactorial de esta patología, podemos suponer que son otros los factores que influyen en el desarrollo de preeclampsia en nuestra población, dado que los AT1R-AA estuvieron ausentes.( 63)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Algunos autores también han reportado la presencia de altos niveles de AT1R-AA y factores antiangiogénicos (sFlt-1, sFlt-1/PlGF, sEng) elevados en la circulación de mujeres con preeclampsia e incluso han expresado que la presencia de AT1R-AA son los responsables del incremento de estas proteínas, sin embargo esta asociación no ha sido demostrada totalmente. (64,65, 66,67) Lo cual también contrasta con lo reportado en la población mestiza mexicana con AT1R-AA negativos, ya que en esta misma población se encuentra un incremento significativo de factores antiangiogénicos a pesar de la ausencia de AT1R-AA (3, 69).

**Angiotensina 1-7**

La angiotensina 1-7 (Ang 1-7), un componente bioactivo del SRAA con efecto depresor, vasodilatador y antihipertensivo, es producido por varios tejidos como el riñón, corazón, hipotálamo y ovario. Dicha producción se genera vía enzimas no-ECA dependientes, se incrementa significativamente durante un embarazo normal en comparación con mujeres no gestantes y aunque es considerado un péptido funcional su papel no es exacto en el SRAA, así también; tanto su regulación durante el embarazo y su efecto en el flujo sanguíneo uteroplacentario sigue siendo indefinido. (68)

Recientemente Yamaleyeva ML, Merrill y cols. Realizan un estudio para establecer la respuesta hemodinámica sistémica en la micro y macrocirculación periférica a la infusión de Ang 1-7 en mujeres sanas no gestantes, embarazadas sanas en el tercer trimestre de la gestación y en mujeres preeclámpticas. Reportando que a nivel sistémico al infundir 2000 pmol/min de Ang 1-7 en mujeres no gestantes sanas vs embarazadas sanas en el tercer trimestre, resulta en un incremento en el gasto cardíaco (medido por bioimpedancia) de  $9.4 \pm 6.4$  versus  $-3.3 \pm 2.1\%$ ,  $n=9-10$ , sin reportar diferencia significativa. La infusión braquial local de Ang 1-7 no tuvo efectos en el flujo sanguíneo del antebrazo (medido por pletismografía) en ninguno de los 3 grupos. Mientras que la aplicación iontoforética de una dosis de 5 mmol/l de Ang 1-7 produjo un incremento en el flujo sanguíneo de la piel (medido por doppler), el cual fue mayor en las mujeres con embarazo normal al compararlas con las preeclámpticas ( $182.5 \pm 93$  versus  $15.76 \pm 19.46\%$ ,  $n=14-15$ ).

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Interesantemente se midió el mismo efecto en el flujo de la piel tras la infusión de 1.0 pmol/l de Ang II encontrando que el flujo de la piel fue menor en embarazadas sanas vs preeclámpticas ( $-46.5 \pm 48.7$  versus  $108.7 \pm 49.1\%$ ,  $n = 14-15$ ). Concluyendo que la desregulación en la vasculatura de la piel puede contribuir al desarrollo de disfunción vascular e hipertensión en preeclampsia. (69)

A pesar de que se conoce que la Ang 1-7 actúa a través de su propio receptor, algunos autores refieren que interactúa con los receptores AT1R y AT2R de la Ang II. Aunque la Ang 1-7 tiene múltiples acciones, las principales son en su mayoría contrarrestar los efectos de la Ang II. (67,70).

Un hallazgo importante para establecer la relevancia de Ang (1-7) se logró con la identificación de su receptor: formado con 7 dominios transmembrana con características (GPCR/Mas) receptor acoplado a proteína G Mas (Mas/AT1-7R). Este hallazgo confirmó la evidencia previa obtenida en los estudios funcionales sugiriendo que este péptido ejerce sus acciones a través de la unión a un receptor distinto de los receptores AT1R y AT2R. Actualmente se acepta que el eje ECA2/Ang-(1-7)/Mas/AT1-7R es capaz de contrarrestar la mayor parte de las acciones perjudiciales del eje ECA/Ang II/AT1R especialmente en condiciones patológicas. Sin embargo, el papel de Ang- (1-7) no se limita a su acción contrareguladora. De hecho, la eliminación genética de Mas produce un fenotipo patológico rico que incluye disfunción cardíaca, aumento de la presión arterial (fondo genético dependiente), disminución de la función barorrefleja, disfunción endotelial, función reproductora reducida, aumento de la trombogénesis y alteración de lípidos y metabolismo de la glucosa. La afinidad de la Ang II para sus receptores es cerca de mil veces mayor que la que tiene para la proteasa que la convierte en Ang-(1-7) ECA-2. (71)

En un estudio comparativo de la expresión de los receptores de Angiotensina (AT1R, AT2R y Mas/AT1-7R) en modelos de ratas vírgenes, embarazadas y ratas embarazadas en quien se indujo hipertensión (RUPP), se encontró que los niveles de mRNA se regularon positivamente, siendo mayor la expresión del AT1R (3 veces más) en el sitio

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

interimplantación e implantación de las ratas gestantes tanto normales como RUPP, así como también fue el que más se unió a la Ang II del útero virgen. Fue seguido por el Mas/AT1-7R y en menor nivel el AT2R, lo cual sugiere una participación de todos receptores para el mantenimiento del embarazo temprano. El mRNA de los 3 receptores se redujo en la gestación tardía pero fueron equivalentes en ambos modelos (Ratas normotensas y RUPP), ésta disminución de los receptores de Ang en el útero puede surgir de la retroalimentación negativa de Ang II. En la placenta los niveles de AT1R son equivalentes en el modelo RUPP y normal. Pero hubo una unión aumentada de Mas / AT1-7R en la gestación tardía en RUPP lo cual puede representar un mecanismo compensatorio para reducir la resistencia vascular uteroplacentaria. (72) Haciendo manifiesto nuevamente que una acción principal de la Ang 1-7 es contrarrestar los efectos de la Ang II.

### **Angiotensina II**

Aunque en los últimos 50 años, varios estudios han dirigido la pregunta de si las concentraciones circulantes de la Ang II difieren entre mujeres con un embarazo normoevolutivo y con enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo, existe un consenso unánime en que muchos de los componentes circulantes del SRAA están incrementados en las mujeres con un embarazo normoevolutivo, en comparación con las mujeres con preeclampsia. (73)

En las mujeres con preeclampsia los niveles plasmáticos de renina, y ECA están paradójicamente suprimidos, con concentraciones elevadas de Ang II a nivel de las vellosidades coriónicas placentaria (74). Así también el AT1R normalmente inactivo en pacientes con embarazos normales, aunado a una expresión significativamente mayor del gen del receptor AT1 en las pacientes con preeclampsia, provoca que éste se mantenga constantemente activado y esto ocasiona una sensibilidad incrementada a la Ang II que se presenta antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad e incluso posterior al término de la gestación. (75,76 )

A este respecto, Gant en 1973 (77) realizó un ensayo clínico haciendo 769 infusiones de ang II en 120 primigestas que permanecieron sanas durante todo su embarazo y 421

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

infusiones de Ang II en 72 primigestas que desarrollaron hipertensión, demostrando que las pacientes con hipertensión y proteinuria tienen una respuesta vascular exagerada a la infusión de Ang II requiriendo menor dosis para evocar la misma respuesta presora que en mujeres con embarazo normal y esta dosis fue menor conforme avanzaba la edad del embarazo, haciéndose significativa a partir de las 23 SDG. Caso contrario de las mujeres con un embarazo normal quienes presentaron una respuesta vascular disminuida a la infusión de Ang II, ya que requirieron el doble de dosis de Ang II para presentar la misma respuesta vasomotora que en mujeres no embarazadas. (Figura 4.)

Esta sensibilidad incrementada a la Ang II se demostró que permanece incluso después de la interrupción de la gestación por un estudio realizado por Hladunewich en 2011 (78) quien comparó 16 mujeres con preeclampsia severa previa, 9 controles previamente embarazadas sin desarrollo de preeclampsia y 11 controles sin antecedente de embarazo, los 3 grupos respondieron a la infusión graduada de Ang II (a una dosis de 1-3 ng/kg/min) con aumento en la presión arterial el cual fue significativamente más pronunciado en el grupo de preeclampsia severa previa ( $p=0.037$ ) lo cual se correlacionó con una mayor expresión del receptor AT1. (76,77)

Mientras que durante los últimos años los estudios del SRAA y su posible influencia en el desarrollo de preeclampsia se han dirigido hacia la demostración de un SRAA local y el efectos de todos sus componentes, principalmente Ang II y AT1R sobre la misma (79), pocos estudios han medido las concentraciones de Ang II circulante en mujeres con preeclampsia y embarazo normal con resultados controversiales, es decir; unos reportan los niveles de Ang II como normales, otros más como disminuidos y recientemente como incrementada. (80, 81,82,83,84,85,86,87,88,89,90)

Cabe resaltar de entre ellos los siguientes estudios: Sykes (21) reportó que las concentraciones elevadas de Ang II y disminuidas de Ang 1-7 en el embarazo temprano se relacionan con un incremento en el riesgo de desarrollar hipertensión gestacional o preeclampsia, lo cual coincide con lo expresado por Merrill (90) quien reportó que la disminución plasmática de Ang 1-7 con la presencia de niveles elevados de Ang II es

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

consistente con el desarrollo de hipertensión en el embarazo, ya que los valores de Ang II son incluso mayores a los observados en mujeres no embarazadas ( $53.3 \pm 10.1$  vs  $20.1 \pm 1.5$  fmol/ml,  $p < 0.05$ ).

Gordon 1973 (83) estudio 66 mujeres entre 6 y 40 semanas de gestación y encontró que los niveles de Ang II plasmática fueron similares a las obtenidas en mujeres no gestantes [4-63 Pg/ml (media de  $25 \pm 14.5$ )] en 2/3 partes de la muestra, solo llamando la atención un incremento significativo entre las 21-30 semanas con una media de  $97.9 \pm 31.8$  pg/ml. La media de los niveles de Ang II plasmática en hipertensión y embarazo fue de ( $76.7 \pm 45$  pg/ml,  $n=6$ ), aunque en 2 de ellas con proteinuria significativa los niveles fueron menores a la media (33 y 58 pg/ml), a pesar de lo anterior, todos los resultados fueron comparados y referidos como similares a los niveles de un embarazo normal de la misma duración ( $64.2 \pm 35.9$  Pg/ml,  $n=9$ ). Furuhashi y cols. 1991 (87) tampoco encontró diferencia en el nivel plasmático de Ang II al comparar 37 mujeres con preeclampsia contra 19 sin preeclampsia ( $62.8 \pm 5.4$  vs.  $65.3 \pm 9.5$  pg/ml). Más recientemente, Velloso 2007 (74) comparó 20 mujeres embarazadas con y sin preeclampsia, sin encontrar diferencia significativa entre ambos grupos  $p=0.3225$  ( $54.1 \pm 7.0$  vs  $66.4 \pm 10.1$  pg/ml).

Finalmente el estudio de Bruno Langer 1998 (88) que comparó 7 pacientes desde el primer trimestre con un embarazo normal y 8 pacientes con preeclampsia estudiadas durante el tercer trimestre, los niveles de Ang II fueron medidos significativamente menores  $p < 0.05$  ( $3.6 \pm 1.3$  fmol/ml vs.  $23.2 \pm 9.2$  fmol/ml) en las pacientes con preeclampsia en comparación a los embarazos normales al tercer trimestre, es importante resaltar que este estudio utilizó la combinación de cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y radioinmunoensayo para la medición de los niveles de angiotensina I y angiotensina II durante el embarazo y la preeclampsia.

De acuerdo al estado actual del conocimiento lo único demostrado es que en las mujeres con un embarazo normal los niveles de Ang II se encuentran incrementados con el fin de mantener la presión arterial y que presentan una sensibilidad disminuida a la infusión de

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

ang II que se explica por la presencia de un aumento de progesterona y prostaciclina durante el embarazo y al hecho de que los receptores AT1R se encuentran en un estado monomérico inactivo, mientras que las pacientes con preeclampsia presentan una respuesta exagerada a ella debido a que los receptores AT1R están en su forma heterodimérica (condición ANG II-sensible), sin embargo, los estudios que abordan la relación entre las concentraciones circulantes de ang II y preeclampsia han rendido resultados controversiales y la causa exacta permanece indeterminada, por lo que se requiere de investigaciones adicionales (89).

Cabe señalar que cada uno de estos estudios fue llevado a cabo por medio de radioinmunoensayo (aunque en su mayoría los métodos no se detallan ampliamente), al requerir de pasos intermedios de separación para la medición de Ang II, se pueden generar errores en su medición por pérdida del analito y el uso de anticuerpos que pueden tener reacción cruzada con péptidos menores a la Ang II (Ang III-IV).

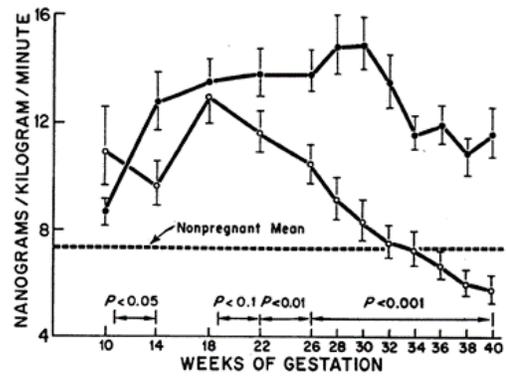
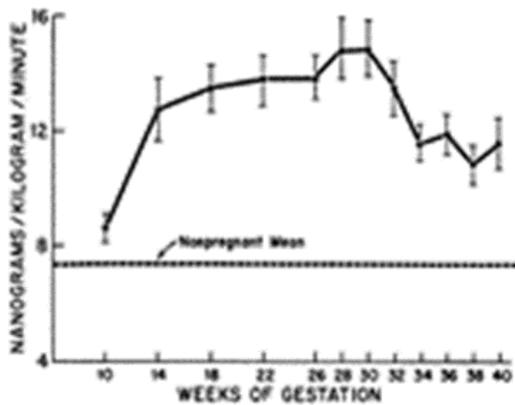
**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Figura 4.** Dosis requerida de infusión de Ang II y respuesta Presora en embarazo normal y con hipertensión

Figura 1. Media de dosis A-II (ng / kg / min) requeridos para evocar una respuesta presora en 120 primigestas que permanecieron normales durante todo el embarazo (769 infusiones). La media de dosis de A-II en no gestantes se muestra como una línea discontinua.

Figura 2 Comparación de dosis media A-II (ng / kg / min) en 120 primigestas normotensas (círculos negros) y 72 primigestas que desarrollaron hipertensión (círculos abiertos). Línea discontinua muestra No gestantes. La diferencia entre los dos grupos llegó a ser significativa después de 23 semanas (P menor que 0,01).



8

Imagen tomada y modificada de Gant et al. (77)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Tabla 2. Estudios realizados comparando las concentraciones circulantes de ang II entre mujeres con un embarazo normal y pacientes con preeclampsia.**

Estudio	No gestante	Angiotensina II		P
		Embarazo Normal	Preeclampsia	
<u>Gordon, 1973</u>	4-63 pg/ml	64.2±35.9 pg/ml	76.7±45 pg/ml	NS
<b>Langer, 1988</b>		23.2±9.2 fmol/ml	3.6±1.3 fmol/ml	<0.05
<u>Furuhashi, 1991</u>		62.8±5.4 pg/ml	65.3±9.5 pg/ml	NS
<i>Merril, 2002</i>	20.1±1.5 fmol/ml	53.3 ±10.1 fmol/ml	30.15±2.3 fmol/ml	<0.05
<u>Velloso, 2007</u>		54.1±7.0 pg/ml	66.4±10.1 pg/ml	NS
<i>Sykes, 2013</i>		120-130 pg/ml	Ang II↑ Ang 1-7 ↓	NR

NS (No significancia estadística) NR (No reportada)

**Todos los estudios anteriores fueron llevados a cabo por medio de Radioinmunoensayo.**

Con el fin de dilucidar si existe diferencia en la concentración sérica de Ang II entre mujeres con embarazo normal y con preeclampsia, así como si la concentración sérica de Ang II puede ser de utilidad en determinar el riesgo de preeclampsia es que se decidió usar un bioensayo *in vitro* para su determinación, el cual es específico y muy sensible. (Dirigirse a Anexo 6 y 8)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Justificación y Planteamiento del problema.**

La preeclampsia afecta hasta un 10% de todos los embarazos y es la principal causa de morbilidad y mortalidad materna y perinatal en México y en el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo. Se estiman más de 100,000 muertes maternas por año en todo el mundo, 800 mujeres por día mueren por causas prevenibles relacionadas con el embarazo, parto y puerperio. Debido a lo anterior, la preeclampsia representa un problema de salud pública.

Una vez reconociendo a la preeclampsia como la principal causa de complicaciones maternas y perinatales desde la década de los sesenta, la mayoría de las investigaciones en el área se han dedicado a la identificación de los factores de riesgo y fisiopatología de la misma, sin embargo lo único que contundentemente se ha identificado hasta hoy, es la falla en la placentación o invasión de trofoblasto, pero la causa de esta falla sigue siendo indefinida.

Múltiple evidencia señala que una la alteración en los niveles circulantes de los factores angiogénicos y anti-angiogénicos placentarios, el SRAA tanto local como sistémico juegan un papel importante en la patogénesis de la preeclampsia.

Dirigiendo la atención en el SRAA y específicamente en su péptido efector principal (Ang II) el cual regula la presión arterial en el embarazo y fuera de él, y gracias a que se desconocen los valores normales de Ang II en cualquier etapa del embarazo normal y que los estudios enfocados en la medición de los valores circulantes de Ang II que buscan asociarlo con el desarrollo de preeclampsia han generado controversia, son necesarias investigaciones adicionales, sobre todo con la utilización de otros métodos de medición ya que todos los estudios referidos midieron una respuesta inmune y allí puede radicar el motivo de los resultados contradictorios en la medición de dicho analito.

**“Aplicación de un bioensayo *in vitro* para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Por lo que es interesante para nosotros establecer si existe diferencia en la concentración sérica de Ang II medida mediante bioensayo *in vitro* el cual es específico y muy sensible, entre un embarazo normal y un embarazo complicado con preeclampsia leve y severa. Así como también es de nuestro interés conocer la concentración sérica de Ang II a diferentes edades gestacionales en embarazo normal y en embarazo que evolucione a preeclampsia y determinar si la concentración de Ang II a diferente edad gestacional en aquel embarazo normal que se complica con preeclampsia nos permite identificar a las pacientes con riesgo de desarrollarla. Para lo cual nos propusimos lo siguiente:

El primer propósito de este estudio consiste en determinar y comparar los valores de la concentración sérica de la Ang II por medio de bioensayo *in vitro* entre embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa, para identificar si existe y cual es diferencia entre los 3 grupos.

Un segundo propósito es determinar y comparar los valores de la concentración de Ang II por medio de bioensayo *in vitro* a las 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 Semanas de gestación en embarazo normal y embarazo normal que evoluciona a preeclampsia, con el fin de buscar asociación entre dichos valores y el desarrollo de preeclampsia.

Y nos llevó a plantear las siguientes preguntas:

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

### **Pregunta de Investigación 1**

¿Existe diferencia en la concentración sérica de la Ang II medida mediante un bioensayo *in vitro* entre mujeres con un embarazo normal y mujeres con preeclampsia leve o preeclampsia severa?

#### **Hipótesis pregunta de investigación 1**

1. La concentración sérica de Ang II en un embarazo normal será mayor que la concentración sérica de Ang II en preeclampsia leve.
2. La concentración sérica de Ang II en un embarazo normal será mayor que la concentración sérica de Ang II en preeclampsia severa.
3. La concentración sérica de Ang II en preeclampsia leve será mayor que la concentración sérica de Ang II en preeclampsia severa.

#### **Objetivo para pregunta de investigación 1 estudio transversal analítico.**

Medir y comparar la concentración sérica de la Ang II por medio de bioensayo *in vitro* en embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa

### **Pregunta de Investigación 2**

¿Cuál es la fuerza de asociación entre la concentración sérica de Ang II medida mediante bioensayo *in vitro* y el riesgo de desarrollar preeclampsia?

#### **Hipótesis para pregunta de investigación 2**

La concentración sérica de Ang II baja medida mediante bioensayo *in vitro* está asociada con el riesgo de desarrollar preeclampsia a las 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 semanas de gestación.

#### **Objetivo Para pregunta de investigación 2**

Determinar la fuerza de asociación entre la concentración sérica de ang II a las 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 semanas de gestación y el riesgo de desarrollar preeclampsia,

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Pacientes, Material y Métodos**

### **Lugar donde se Realizó el Estudio.**

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva de la Unidad Médica de Alta Especialidad de Gineco-Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **Diseño de la Investigación.**

#### **Pregunta de Investigación, hipótesis y objetivo 1.**

*Tipo de Estudio.*

- a) Por el control de la maniobra experimental por el investigador: Observacional.
- b) Por la captación de la información: Prolectivo.
- c) Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal.
- d) Por la presencia de un grupo control: Comparativo de 3 grupos
- e) Por la dirección del análisis: Sin dirección.

*Diseño: Estudio Transversal analítico de 3 grupos.*

#### **Pregunta de investigación, hipótesis y objetivo 2.**

*Tipo de Estudio.*

- a) Por el control de la maniobra experimental por el investigador: Observacional.
- b) Por la captación de la información: Prolectivo.
- c) Por la medición del fenómeno en el tiempo: Longitudinal.
- d) Por la presencia de un grupo control: Comparativo.
- e) Por la dirección del análisis: Con dirección Causa - Efecto

*Diseño: Estudio de Casos y Controles anidado en una Cohorte.*

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Diseño de la muestra para el estudio transversal analítico**

*Población diana:*

Mujeres embarazadas con  $>20$  SDG con diagnóstico de embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa.

*Población accesible:*

Mujeres embarazadas con  $\geq 20$  SDG atendidas en la UMAE HGO Numero 4, que cursen con embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa.

*Muestra:*

Mujeres con embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa consecutivas (muestreo no aleatorio), esto es, se tomaron a todas las gestantes consecutivas de la población accesible y que cumplieron con los criterios de inclusión en el periodo comprendido entre el 1° de agosto 2013 al 30 de noviembre 2014.

*Grupos de estudio:*

A partir de la muestra se identificaron a tres grupos: embarazo normal (que hayan culminado con un embarazo sin complicaciones,  $\geq 38$  SDG y con un RN normal), preeclampsia leve y preeclampsia severa.

**Criterios de selección:**

Criterios de inclusión para la muestra.

1. Mujeres embarazadas  $>20$  SDG
2. Con Diagnóstico de Embarazo normal (sin preeclampsia), preeclampsia leve y preeclampsia severa
3. Aceptar colaborar en el estudio.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

*Criterios de no inclusión para la muestra.*

1. Mujeres con embarazos múltiples.
2. Con diagnóstico de cualquier enfermedad crónica antes del embarazo o que sean diagnosticadas durante el mismo y que son consideradas factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia como diabetes tipo 1 y 2, hipertensión arterial crónica, trombofilias, enfermedades autoinmunes, nefropatía, cardiopatías, etc.

*Criterios de eliminación.*

1. No haberse obtenido en forma completa la información clínica o los resultados de laboratorio.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Diseño de la muestra para el estudio de casos y controles anidado en una cohorte.**

*Población Diana:*

Mujeres embarazadas sanas a partir de las 12 SDG, embarazo único, sin factores de riesgo para preeclampsia excepto nuliparidad, preeclampsia en embarazo previo y obesidad o sobrepeso

*Población Accesible:*

Mujeres embarazadas sanas a partir de las 12 SDG, sin factores de riesgo para preeclampsia excepto nuliparidad, preeclampsia en embarazo previo y obesidad o sobrepeso, atendidas en la unidad de estudio.

*Muestra:*

Mujeres embarazadas sanas a partir de las 12 SDG, sin factores de riesgo para preeclampsia excepto nuliparidad, preeclampsia en embarazo previo y obesidad o sobrepeso, consecutivas (muestreo no aleatorio), esto es, se tomaron a todas las gestantes consecutivas de la población accesible que cumplieron los criterios de inclusión durante el periodo comprendido del 1º agosto de 2013 al 30 de diciembre 2014.

*Grupo de estudio:*

A partir de la inclusión de las pacientes y a su seguimiento a intervalos de 4 semanas (es decir; 12,16, 20, 24, 28, 32 y 36 SDG) o hasta la interrupción del embarazo se identificaron a dos grupos, uno con desarrollo de preeclampsia (*Casos*) y otro sin desarrollo de preeclampsia (*Controles*).

**Criterios de selección:**

*Criterios de inclusión para la muestra.*

1. Mujeres embarazadas sanas a partir de las 12 SDG sin factores de riesgo para preeclampsia excepto nuliparidad, preeclampsia en embarazo previo y obesidad o sobrepeso.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

2. Aceptar colaborar en el estudio.

*Criterios de no inclusión para la muestra.*

1. Mujeres con embarazos múltiples
2. Con diagnóstico de cualquier enfermedad crónica antes del embarazo considerados factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia (diabetes Mellitus tipo 1 y 2, hipertensión arterial crónica, enfermedades autoinmunes, trombofilias, nefropatía, cardiopatías, etc.) o que se presenten o diagnostiquen durante el embarazo.

c) Criterios de eliminación.

1. No haberse obtenido en forma completa la información clínica o los resultados de laboratorio.
2. Pérdida al seguimiento

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Definición de las Variables**

### **Estudio transversal analítico.**

#### **Variable Independiente**

*Concentración sérica de Ang II Medida por Bioensayo in vitro*

**Definición conceptual.** Concentración...Relativo o perteneciente a una sustancia cualquiera que tiene un efecto en el tejido vivo o causa una reacción en él, de manera dosis dependiente". Ang II Hormona peptídica, formada por 8 aminoácidos, que forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona y que actúa a través de 2 tipos de receptores (AT1R y AT2R) considerado el péptido efector principal de este sistema. (38, 103,104)

**Definición operativa.** Se determinará mediante un bioensayo *in vitro* que utiliza un ensayo transcripcional de células HEK-293 establemente transfectadas con el gen que codifica para el receptor humano AT1R y un gen reportero de luciferasa (NFTA-luciferasa). Anexo 6-8

**Escala de medición:** Variable cuantitativa continua

**Categoría de las variables:** ng/ml

#### **Variable Dependiente o de clasificación**

*Severidad de la preeclampsia*

##### **Embarazo normal (sin preeclampsia)**

**Definición conceptual.** Es el estado fisiológico de la mujer que se inicia con la fecundación y termina con el parto y el nacimiento del feto a término. (91)

**Definición operativa.** Pacientes que cursen con un embarazo normal, es decir; que no presenten ninguna complicación obstétrica materna o fetal desde las 12 semanas y hasta el término del embarazo ( $\geq 38$  SDG). Para lo cual se seguirán hasta la culminación del embarazo y confirmar que no desarrollo preeclampsia.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Embarazo complicado con preeclampsia leve**

**Definición Conceptual.** El diagnóstico de preeclampsia se basará en los criterios del American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG) Se considera que una paciente tiene preeclampsia leve cuando se presentan 2 o más tomas de TAS de  $\geq 140$  mmHg o TAD  $\geq 90$  mmHg o mayores pero menores de 160/110 mmHg con 6 horas de diferencia, proteinuria corroborada con  $\geq 300$  mg en la recolección de orina de 24 horas o una relación proteína/creatinina urinaria  $\geq 0.3$ , en mujeres previamente normotensas y embarazo  $\geq 20$  semanas de gestación.(1)

**Pacientes con embarazo complicado con preeclampsia severa**

**Definición conceptual.** Se define como la presencia de uno o más de los siguientes síntomas o signos en un embarazo mayor de 20 semanas de gestación: 2 tomas con 4 horas de diferencia y con reposo en cama de una TAS  $\geq 160$  mmHg o TAD  $\geq 110$  mmHg, o trombocitopenia menor de 100,000/ $\mu$ l, daño hepático manifestado por elevación de enzimas hepáticas (doble de la concentración normal) o dolor abdominal en el cuadrante superior derecho o epigastrio persistente, insuficiencia renal progresiva (Cr sérica  $>1.1$  mg/dl o el doble del valor de Concentración de Cr sérica basal en ausencia de otra enfermedad renal) edema pulmonar o cianosis, trastornos visuales o cerebrales de nueva aparición. (1)

**Definición Operativa.** Pacientes que cursen con embarazo  $\geq 20$  semanas de gestación y criterios para clasificación de preeclampsia leve o severa de acuerdo al ACOG<sup>1</sup> o bien cumplan requisitos para embarazo normal (sin preeclampsia)

**Escala de medición.** Variable compleja, Cualitativa, Ordinal, Politómica.

**Categoría de las variables.** 0. Embarazo Normal (sin preeclampsia)

1. Preeclampsia Leve
2. Preeclampsia Severa

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Estudio Casos y Controles anidado en una cohorte.**

**Variable dependiente**

*Desarrollo de preeclampsia*

**Embarazo Normal (sin preeclampsia)**

**Definición conceptual.** Es el estado fisiológico de la mujer que se inicia con la fecundación y termina con el parto y el nacimiento del feto a término. (90)

**Definición operativa.** Pacientes que cursen con un embarazo normal, es decir; que no presenten ninguna complicación obstétrica materna o fetal desde las 20 semanas y hasta el término del embarazo ( $\geq 38$  SDG) o seguimiento.

**Embarazo complicado con preeclampsia.**

**Definición Conceptual.** El diagnóstico de preeclampsia se basará en los criterios del American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG) <sup>1</sup> utilizando la mismos criterios que la definición conceptual del estudio transversal (1)

**Definición operativa.** Pacientes que desarrollen preeclampsia independientemente de su severidad cumpliendo los criterios del ACOG citados en el apartado anterior o cumplan criterios para embarazo normal (sin preeclampsia).

**Escala de medición:** Variable Cualitativa ordinal dicotómica

**Categoría de las variables:** 0. Embarazo Normal sin preeclampsia

1. Preeclampsia

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

**Variable independiente**

*Concentración sérica de Ang II medida por bioensayo in vitro*

**Definición conceptual.** Véase definición conceptual de Variable independiente de estudio transversal. (38, 103,104)

**Definición operativa.** Véase definición operativa de Variable independiente de estudio transversal. (Anexo 6-8).

**Escala de medición:** Variable cuantitativa continua

**Categoría de las variables:** ng/ml

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**VARIABLES DE CONFUSIÓN**

*1. Edad materna*

**Definición conceptual.** Es el tiempo transcurrido entre el día, mes y año de nacimiento y el día, mes y año en que ocurrió y/o se registró el hecho vital. (92)

**Definición operativa.** La evaluación de la edad se determinará de acuerdo al momento en que se incluya en el estudio y se medirá en años.

**Escala de medición:** Variable cuantitativa Continua.

**Categoría de las variables:** expresada en años

*2. Índice de masa corporal pregestacional.*

**Definición conceptual.** Se define como el cociente entre el peso en kg y la talla en metros al cuadrado. ( 93)

**Definición operativa.** Se calcula dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros ( $IMC = \text{peso [kg]} / \text{estatura [m}^2\text{]}$ ) y de acuerdo al resultado se expresará como bajo peso ( $<18.5$ ), peso normal ( $18.5-25$ ) sobrepeso ( $>25$ ) y obesidad en todos sus grados ( $\geq 30$ ). Grado I (IMC 31-34.9) Grado II (IMC 35-39.6) Grado III ( $\geq 40$ ). Para este estudio se tomó el peso pregestacional y la talla referidos en la nota de CPN de 1ra vez de su UMF, o bien fueron tomados en la primera visita de inclusión al estudio.

**Escala de medición.** Variable Cualitativa, ordinal, politómica

**Categoría de las variables.** 0 Peso Normal

1 Sobrepeso

2 Obesidad Grado I-II

3 Obesidad Grado III

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

*3. Antecedente de Tabaquismo Durante el embarazo*

**Definición conceptual.** Es la adicción al tabaco, provocada principalmente por uno de sus componentes activos, la nicotina; la acción de dicha sustancia acaba condicionando el abuso de su consumo. Dicha adicción produce enfermedades nocivas para la salud del consumidor. (94)

**Definición operativa.** Se considerará tabaquismo positivo cuando la paciente tenga el antecedente de adicción al tabaco activa previo y durante al menos 3 meses de la gestación actual.

**Escala de medición.** Cualitativa, Nominal, Dicotómica

**Categoría de las variables:** **0** Sin antecedente.

**1** Con antecedente

*4. Antecedente de Preeclampsia en Embarazo anterior*

**Definición conceptual.** El diagnóstico de preeclampsia se basará en los criterios del American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG) <sup>1</sup>

**Definición operativa.** Se considerará positivo cuando la paciente tenga el antecedente de preeclampsia documentada en una gestación anterior, independientemente de la severidad de la enfermedad y la edad gestacional de presentación.

**Escala de medición.** Cualitativa, Nominal, Dicotómica

**Categoría de las variables:** **0** Sin antecedente.

**1** Con antecedente

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Variables descriptoras**

*1. Número de orden de la gestación (Gesta)*

**Definición conceptual.** Es el número de orden de sucesión del embarazo que está siendo registrado, con relación a todos los embarazos anteriores de la madre. (90)

**Definición operativa.** Se define como el número de embarazos total que la paciente haya cursado, incluyendo el actual y las pérdidas gestacionales.

**Escala de medición.** Variable cualitativa, nominal dicotómica

**Categoría de las variables. 0.** Primípara (Corresponde al primer embarazo de la mujer)

1. Multípara (Mujer con embarazo y nacimiento de al menos un hijo de más de 24 SDG)

*2. Número de orden del parto (Para)*

**Definición conceptual.** Es el número de orden de sucesión del nacimiento que está siendo registrado, con relación a todos los partos anteriores de la madre. (90)

**Definición operativa.** Se define como el número de embarazos cuya vía de interrupción haya sido vaginal, incluyendo eutócico y distócico (uso de Fórceps) y que su edad gestacional haya sido mayor a 20 semanas.

**Escala de medición.** Variable cuantitativa Discreta

**Categoría de las variables.** Número de partos

*3. Antecedente de Aborto.*

**Definición Conceptual.** Es la terminación espontánea o provocada de la gestación antes de la vigésima semana, contando desde la fecha última de menstruación normal, o expulsión del producto de la gestación con peso menor a 500 gramos. (95)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Definición operativa.** Se define como el número de embarazos anteriores con pérdida gestacional cuya duración haya sido igual o menor de 20 semanas de gestación con un peso menor a 500 gr.

**Escala de medición.** Variable cuantitativa Discreta

**Categoría de las variables.** Número de abortos

*4. Antecedente de Cesárea.*

**Definición Conceptual.** Es un procedimiento quirúrgico que tiene por objeto extraer al feto, vivo o muerto, a través de laparotomía e incisión uterina, después de que el embarazo ha llegado a la viabilidad fetal. (96)

**Definición operativa.** Se define como el número de embarazos cuya vía de interrupción haya sido abdominal y que su edad gestacional haya sido mayor a 20 semanas.

**Escala de medición.** Variable cuantitativa Discreta

**Categoría de las variables.** Número de Cesáreas

*5. Muerte Perinatal (Muerte Fetal -Óbito)*

**Definición conceptual.** La mortalidad perinatal o defunciones perinatales normalmente incluyen las defunciones de fetos de 28 semanas o más de gestación (también conocido como mortinato u óbito fetal) y defunciones de nacidos vivos dentro de los primeros 7 días de vida. (97)

**Definición Operativa.** Se define como la muerte fetal después de las 20 semanas de gestación y antes del nacimiento

**Escala de medición.** Variable cualitativa, Nominal, dicotómica

**Categoría de las variables.** 0. Ausente

1. Presente

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

*6. Edad gestacional por semanas*

**Definición conceptual.** Tiempo transcurrido entre el primer día del último período menstrual de la madre y la fecha de ocurrencia de la extracción o expulsión del feto o producto; se expresa en días o semanas cumplidas. (90)

**Definición operativa.** La evaluación de las semanas de gestación se determinará en base a la fecha de última menstruación si esta se considera confiable, de no ser confiable se realizara por medio de ultrasonografía.

**Escala de medición.** Variable cuantitativa Continua.

**Categoría de las variables.** Número de semanas

*7. Vía de Resolución de la gestación.*

**Definición conceptual.** Es el proceso mediante el cual se expulsan o extraen el feto, la placenta y las membranas fetales del útero. Este proceso puede ser por vía vaginal, o bien a través de una incisión uterina, después de que el embarazo haya alcanzado la viabilidad fetal. (90,94)

**Definición Operacional.** Se define como la vía por la cual es interrumpida la gestación, ya sea Vaginal eutócico o distócico (aplicación de fórceps) o bien por vía abdominal (Cesárea)

**Escala de medición.** Variable cualitativa, nominal, dicotómica

**Categoría de la Variable.** 0. Parto

1. Cesárea

*8. Recién Nacido pequeño para edad gestacional.*

**Definición conceptual.** Un recién nacido pequeño para la edad gestacional es aquel cuyo peso se encuentra por arriba de la percentila 3 y menor a la percentila 10, no constituye una entidad específica, sino que corresponde a una manifestación de una alteración materna, fetal o placentaria. (98, 99)

**Definición Operacional.** Se define como aquel recién nacido que se encuentra por debajo de la percentila 10 o 5 para el peso esperado por edad gestacional al nacimiento.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Escala de medición.** Variable cualitativa, nominal dicotómica

**Categoría de la variable.** 0. Presente

1. Ausente

*9. Recién Nacido Prematuro (Prematurez)*

**Definición conceptual.** Un recién nacido prematuro es aquel que nace antes de completar la semana 37 de gestación (259 días a partir del primer día del último período menstrual de la madre, o 245 días después de la fecundación). Siendo la gestación una variable fisiológica fijada en 280 días, más menos 15 días. Los recién nacidos muy pretérmino son aquellos cuya edad gestacional es inferior a 34 SDG. (100, 101)

**Definición Operacional.** Se define como aquel recién nacido que haya nacido antes de las 37 o 34 semanas de gestación.

**Escala de medición.** Variable cualitativa, nominal politómica

**Categoría de la variable.** 0. RN Término ( $\geq 37$  SDG)

1. Pretérmino ( $< 37$  SDG)

2. Muy Pretérmino ( $< 34$  SDG)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Descripción y Consideraciones Generales del Estudio.**

### **Estudio transversal analítico.**

Una vez corroborado el diagnóstico se invitó a la paciente a participar en el estudio, se solicitó firma de consentimiento informado, posteriormente se recabó la información clínica de las variables a estudiar mediante entrevista directa con la realización de historia clínica en el servicio de enfermedades hipertensivas del embarazo o en alguno de los consultorios de control prenatal de la unidad de estudio y en forma conjunta toma de muestra de sangre por punción venosa periférica (5 ml). La muestra de sangre fue tomada en un tubo sin anticoagulante etiquetado con la clave alfanumérica correspondiente otorgada a cada paciente, (se traslada la muestra en una gradilla hasta la unidad de investigación) se dejó reposar por 15 minutos para formar coágulo e inmediatamente después se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 minutos a 4° C, Una vez separado el suero se colocaron en tubo de alícuota de 1.5 ml etiquetado con la misma clave alfanumérica, conteniendo pepstatina A (inhibidor de proteasas) y captopril (inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina) para evitar su degradación a ang III y la formación de ang II a partir de ang I, y se almacenó en ultracongelador donde se mantuvieron a -80°C y una vez completada la muestra con 30 pacientes con embarazo normal (quienes culminaron el embarazo sin complicaciones y tras alcanzar el término de la gestación), 30 mujeres que se complicaron con preeclampsia leve y 30 con preeclampsia severa, se analizaron las 90 muestras en un mismo momento y por la mañana para evitar sesgo por cambio de temperatura ambiental,. Todas las variables de interés se recopilaron en papel en su correspondiente hoja de recolección de datos, se vaciaron a una libreta de control y también en una base de datos electrónica.

### **Estudio de casos y controles anidado en una cohorte**

En el servicio de consulta externa de control prenatal o enfermera materno-infantil del HGO número 4 se invitaron a pacientes que cursaran con un embarazo normal a partir de las 12 semanas y sin factores de riesgo para preeclampsia excepto nuliparidad, antecedente de preeclampsia en embarazo previo y obesidad o sobrepeso a participar en el estudio (cabe

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

mencionar que en el hospital de estudio se atiende a toda la población obstétrica sana del HGZ número 8 ya que este último carece de dicho servicio, para lo cual se cuenta con servicios de consulta externa de control prenatal, enfermera materno infantil y puerperio de bajo riesgo para la atención de pacientes sanas). Se hizo la invitación y una vez que la paciente aceptó y firmó consentimiento informado, se recabó la información clínica de las variables a estudiar por entrevista directa y en forma conjunta se tomó muestra de sangre por punción venosa periférica (5 ml) la cual se trasladó en una gradilla a la unidad de investigación en medicina reproductiva localizada en el sexto piso del mismo hospital. La paciente fue citada a intervalos de 4 semanas a la UIMMR, donde se tomaron las variables de interés (peso/talla para IMC) y se tomó muestra de sangre por venopunción en cada cita (5 ml). Todas las muestras y las variables de interés fueron sometidas al mismo proceso descrito para el estudio transversal. Una vez completada la muestra (30 casos y 30 controles) se analizaron por bloques de 15 casos o 15 controles en un mismo momento y por las mañanas para evitar sesgo por cambio de temperatura ambiental. Una vez hecho el análisis estadístico descriptivo, los resultados obtenidos como variable continua de concentración de Ang II se dividieron en cuartiles, quedando cada grupo dividido en 2 subgrupos Q1 y Q2-4.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Análisis Estadístico.**

Una vez obtenida la información clínica y resultados de laboratorio completos para ambos estudios, se procedió a la etapa de análisis, la cual se llevó al cabo en las siguientes etapas:

**Análisis exploratorio.**

Una vez realizada la captura electrónica y la configuración de la base de datos, se procedió a la limpieza de dicha base en búsqueda de valores extremos, datos perdidos y no plausibles.

**Análisis Descriptivo.**

Descripción y comparación de las diferentes variables consideradas en el estudio, utilizando para ello las medidas de resumen y de dispersión apropiadas para cada tipo de variable. Las variables aleatorias continuas se analizaron mediante media, mediana, varianza, desviación estándar y las variables aleatorias discretas mediante frecuencias, porcentajes y proporciones.

La consistencia en la medición de los ensayos se llevó a cabo mediante el coeficiente de variación.

**Análisis inferencial y magnitud de la asociación.**

Las diferencias entre variables continuas fueron determinadas por la prueba de t de student no pareada o con la prueba de U de Mann-Whitney para variables sin distribución normal (de acuerdo a la prueba de Shapiro Wilk). Las diferencias entre variables categóricas fueron determinadas por la prueba de  $\chi^2$  con corrección de continuidad de Yates o la prueba de Mantel-Haenszel de tendencia lineal para variables con más de 2 categorías. Diferencias entre  $\geq 3$  variables continuas fueron determinadas por la prueba de ANOVA de 1-vía seguidas por pruebas a posteriori (prueba de Scheffe) o por la prueba de Kruskal-Wallis de 1 vía, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney para la comparación entre pares para variables sin distribución normal.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

La asociación entre las concentraciones séricas de Ang II y el subsecuente riesgo de preeclampsia (estudio de casos y controles anidado en una cohorte) fue analizada en una manera transversal a cada intervalo de edad gestacional estudiada. Sobre la base de la distribución exhibida en las muestras de las pacientes con un embarazo normal, las concentraciones séricas de Ang II a cada edad gestacional fueron divididas en cuartiles, y la RM fue calculada y usada para evaluar la asociación entre cuartiles y el riesgo de preeclampsia. Para fines del estudio, los tres cuartiles más altos fueron usados como categoría de referencia. El análisis de regresión logística fue usado para ajustar la RM de la variable antecedente de preeclampsia, ya que el resto fue controlado por diseño al emparejamiento de las participantes.

El nivel de significancia estadística en todos los casos fue un valor de  $p < 0.05$  bimarginal para una hipótesis nula.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Tamaño de la Muestra.**

### **Estudio transversal analítico.**

Para determinar diferencias en la concentración sérica de Ang II entre mujeres con embarazo normal y pacientes con preeclampsia leve y preeclampsia severa.

Prueba de ANOVA para más de 2 grupos. En donde:

d= diferencia entre la media mayor y la media menor

ET= Efecto de Tamaño= DS/d

K= Número de grupos

DS=**9** (Bruno Langer and cols)<sup>88</sup> Media mayor= **23.2** Media menor= **3.6**. Restamos  
**23.2-3.6=19.6**

ET= **9/19.6 = 0.46**

Buscamos en la Tabla **0.46** para 3 grupos y corresponde a: 21 por grupo, ajustado por pérdidas 20%= 25 pacientes, sin embargo se decide cerrar el grupo con **30 participantes por grupo**.

### **Estudio Casos y controles anidado en una cohorte.**

Debido a que se desconocen los niveles de concentración de Ang II en embarazo normal y preeclampsia, se espera al menos una diferencia del 40% aproximadamente entre aquellas con niveles bajos (Q1) y normales de Ang II (Q2-4).

Es así que un 20% de las mujeres con embarazo normal (controles) corresponderán al Q1 y el 80% en Q2-4, en cambio las pacientes con embarazo complicado con preeclampsia (casos) esperamos que estén al menos un 60% Q1 y 40% en Q2-4. Tomando en cuenta este supuesto se calculó el tamaño de la muestra con el Software *Epi Info*<sup>TM</sup> 7, con una relación caso-control (1:1), un valor alfa de 0.5, un poder del estudio 80% y una beta del 20%, dando como resultado 28 por grupo, sin embargo se decidió cerrar en 30 participantes por

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI grupo, no se tomaron en cuenta pérdidas ya que las participantes son parte de la cohorte en seguimiento desde las 12 semanas.

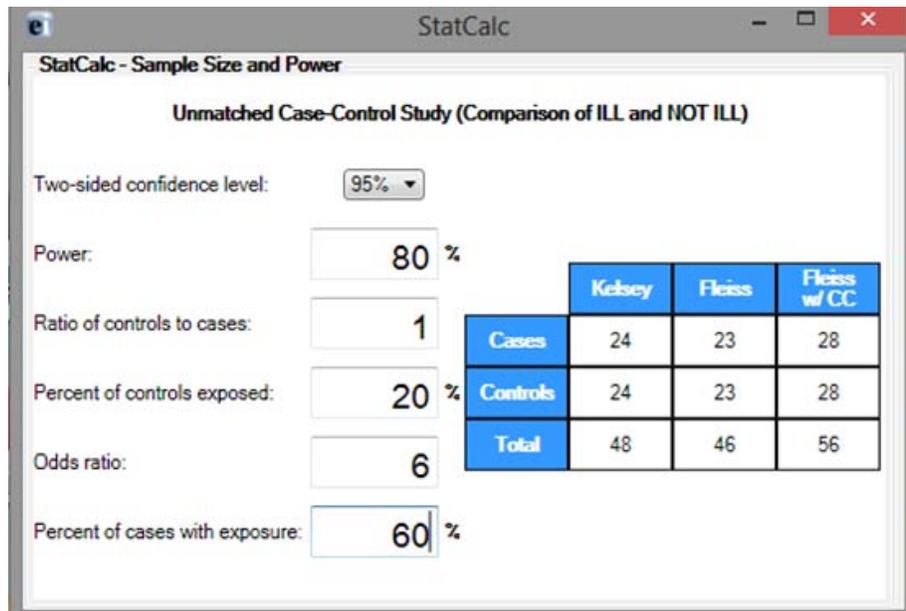


FIGURA 5. CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA PARA ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES ANIDADO EN UNA COHORTE.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Aspectos Éticos**

El presente protocolo utilizó muestras biológicas (sangre) provenientes de mujeres embarazadas sanas y complicadas con preeclampsia. Todas las pacientes fueron atendidas en la UMAE Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala del IMSS.

### **Riesgo del estudio.**

De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, el riesgo de este proyecto corresponde a un estudio de: **riesgo Mínimo**. Se trata de un estudio que emplea procedimientos comunes en exámenes de diagnóstico rutinarios que en este caso particular son la toma de muestra de sangre como métodos para la predicción de desarrollo de preeclampsia, esta muestra de 5 ml se tomó una sola vez (para el estudio transversal) y un máximo de 6 muestras para el estudio de casos y controles, en total máximo 30 ml. Asimismo, ya que esta investigación se realizó en mujeres embarazadas y corresponde a población vulnerable, se tomaron en cuenta todos los aspectos reglamentarios incluidos en el capítulo IV a cerca de la investigación en mujeres en edad fértil, embarazadas, puerperio, lactancia, neonatos etc.

### **Apego a las normas éticas.**

En todos los casos las muestras fueron colectadas de acuerdo con los lineamientos Institucionales del Hospital y en estricto apego a la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial y acuerdo a la última enmienda realizada en la 64° asamblea llevada a cabo en Fortaleza Brasil en octubre de 2013 y al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación vigentes.

### **Consentimiento informado.**

Todas las mujeres embarazadas incluidas en el protocolo firmaron una carta de consentimiento informado (adjunta a este protocolo), el cual corresponde exactamente al documento que fue entregado y solicitado a cada una de las participantes y a su cónyuge o pareja. En dicha carta, se emplea un lenguaje sencillo y accesible para las participantes,

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

poniendo de manifiesto su libre decisión de participar o permanecer en el estudio, dejando claro también que esto no afecta o demerita la atención que reciben en el Instituto.

**Contribuciones y beneficio a los participantes.**

La participación de las mujeres embarazadas en este estudio, **NO** generó ningún beneficio económico para las participantes y como la intención del protocolo es saber si las pruebas que aquí se propusieron son útiles en la predicción de preeclampsia, por lo que **NO** tuvo una utilidad inmediata para el diagnóstico o manejo médico de la paciente. Sin embargo, se ha manifestado que la participación en el estudio será de gran utilidad en el avance del conocimiento científico y contribuirá de esta manera a que a mediano plazo se puedan utilizar como métodos de predicción para establecer mejores planes en el manejo médico de dichas las pacientes.

**Balance riesgo/beneficio.**

Es importante señalar que la obtención de las muestras para este estudio **NO** representó riesgo alguno para la salud de las participantes, ya que las tomas de muestra de sangre son procedimientos que se hacen rutinariamente para apoyar el diagnóstico o la toma de decisiones en el manejo de la mujer embarazada sana y con preeclampsia. El beneficio de participar en este estudio es importante ya que podrá contribuir en la posibilidad de predecir complicaciones en el embarazo, especialmente en mujeres con preeclampsia.

**Confidencialidad.**

Los datos de las mujeres embarazadas que aceptaron participar en el estudio fueron y serán mantenidos en total confidencialidad. A cada participante se le asignó un código único y específico con el cual se identificó cada muestra. Los datos completos como el código alfanumérico sólo fueron y serán accesibles exclusivamente para los investigadores responsables del protocolo, quienes tienen la obligación de no revelar la identidad de los participantes.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Obtención del consentimiento informado.**

La carta de consentimiento informado de todas las mujeres participantes fue obtenida por parte de los investigadores participantes (el Dr. Leños y la Dra. Berumen). La CCI se obtuvo antes de la toma de muestra de sangre en la que los médicos explicaron los objetivos del protocolo a cada una de las posibles participantes.

**Selección de participantes.**

Las participantes al estudio fueron identificadas por los médicos tratantes y reclutadas por los médicos participantes en el estudio, es importante hacer mención que tanto la estudiante de maestría como el tutor no tuvieron ninguna implicación en el manejo o diagnóstico de la paciente, sin embargo solo se incluyeron aquellas que cumplieron los requisitos de acuerdo a los criterios de inclusión y en el caso de pacientes con preeclampsia siempre y cuando cumplieran con los criterios diagnósticos especificados en el documento (Criterios para hipertensión y embarazo ACOG).<sup>1</sup> Las participantes fueron tomadas de los servicios de hospitalización específicamente del servicio de complicaciones hipertensivas asociadas al embarazo y de la consulta externa del Hospital. En todos los casos la selección de las mujeres embarazadas fue imparcial, sin sesgo social, racial, preferencia sexual y cultural, respetando en cada momento la libertad y confidencialidad de los participantes.

**Beneficios al final del estudio.**

Los beneficios de este estudio tienen un carácter estrictamente científico y en ningún momento se persiguen beneficios lucrativos para ninguno de los participantes

El protocolo fue sometido ante el comité local de Investigación y Ética con dictamen de autorizado con fecha del 06.06.13 y número de registro: R-2013-3606-18.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Factibilidad.**

El tutor es experto en investigación básica aplicada a la medicina con amplia experiencia en inmunología y con una línea de investigación sólida en el estudio de preeclampsia y en el estudio de biomarcadores, por lo tanto el grupo cuenta con la experiencia en todos los aspectos de esta propuesta y en la Unidad participante se cuenta con la población suficiente para realizar el estudio (1600 pacientes aproximadamente por año son atendidas en la unidad con los criterios de inclusión), además se contó con el apoyo financiero por parte del FIS del IMSS, siendo suficiente para llevarse a cabo el proyecto.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Resultados**

### **Expresión estable y especificidad de la respuesta del receptor de angiotensina II tipo 1 humano (AT1R) y del factor nuclear de células T activadas (NFAT) en la línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK-293).**

Para este estudio, empleamos una la línea celular establemente co-transfectada con el cDNA del AT1R humano clonado en el vector de expresión pcDNA3 (el cual también codifica el gen para la resistencia a la geneticina) y el constructo de un gen reportero de luciferasa inducido por NFAT, conteniendo cuatro copias del elemento de unión NFAT en células HEK-293, generada previamente en nuestro laboratorio, referida como hAT1R-NFAT-Luc HEK-293. Esta línea celular clonal fue elegida de entre 48 clones diferentes por su capacidad de inducir más de 100 veces la actividad de luciferasa al ser expuesta por 20 horas a la Ang II [ $1 \mu\text{mol/L}$ ] (63). En adición, también fue demostrado que las células parentales HEK-293 intactas (no transfectadas) o transfectadas transitoriamente con el AT1R humano sólo o con el gen reportero NFAT-luciferasa sólo, son incapaces de inducir la actividad de luciferasa a valores mayores de sus valores basales al ser estimuladas con concentraciones crecientes de Ang II, indicando la escasa o nula expresión natural del AT1 humano por estas células y que las células hAT1R-NFAT-Luc HEK-293 son específicamente estimuladas por Ang II.

Como se muestra en la Figura 6, la adición de cantidades incrementadas de Ang II a las células hAT1R-NFAT-Luc HEK-293 produjo un incremento dosis-dependiente en la actividad de luciferasa, indicando que los AT1R humano expresados fueron funcionalmente activos. La actividad máxima y mínima fue obtenida a la dosis de 1,000 ng/ml ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) y 4 ng/ml ( $0.004 \mu\text{g/ml}$ ) de ang II, respectivamente y los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 7.6 y 8.9%, respectivamente.

La inhibición específica de los efectos de la Ang II fue obtenida por la adición de los antagonistas no peptídicos (telmisartán, losartán, valsartán y candesartán) del AT1R humano. Los efectos antagonistas del telmisartán, losartán, valsartán y candesartán sobre la inducción de la actividad de luciferasa por la Ang II a la concentración de  $1 \mu\text{mol/L}$  se

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

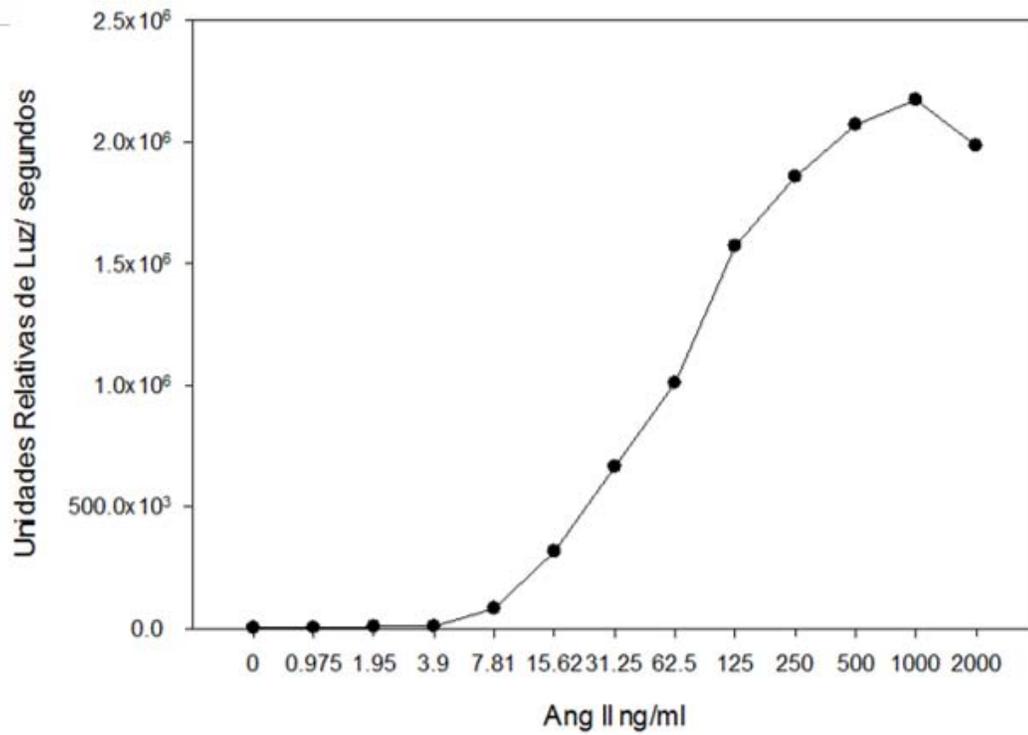
UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

muestran en la Figura 7. La actividad de luciferasa inducida por Ang II fue inhibida por todos los antagonistas probados de una manera dosis-dependiente, con una inhibición completa a la concentración de 1  $\mu\text{mol/L}$  de cada uno de los antagonistas del receptor AT1 humano probado. Estos resultados indican que el bioensayo es capaz de detectar la activación de los receptores AT1R humano estimulados por Ang II. En experimentos ulteriores, sólo fue usado el telmisartán como antagonista del receptor AT1 humano debido a su efecto similar a otros antagonistas y por su costo. (Figura 7.1)

La especificidad a la Ang II por las células hAT1-NFAT-Luc HEK-293 también fue probada al comparar su respuesta en la actividad de luciferasa por dos péptidos relacionados a la Ang II, por su decapeptido precursor, la Ang I y por otro derivado de su degradación, la Ang 1-7. La Figura 8, muestra que la Ang II induce de una manera dosis-respuesta un incremento pronunciado en la actividad de luciferasa. En contraste, cuando la Ang I o la Ang 1-7 fueron adicionados en cantidades incrementadas a las células, fallaron en inducir la actividad de luciferasa a valores superiores a las basales. En conjunto, todos los datos anteriores muestran que las células hAT1-NFAT-Luc HEK-293 son específicamente estimuladas por Ang II. (Figura 8)

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

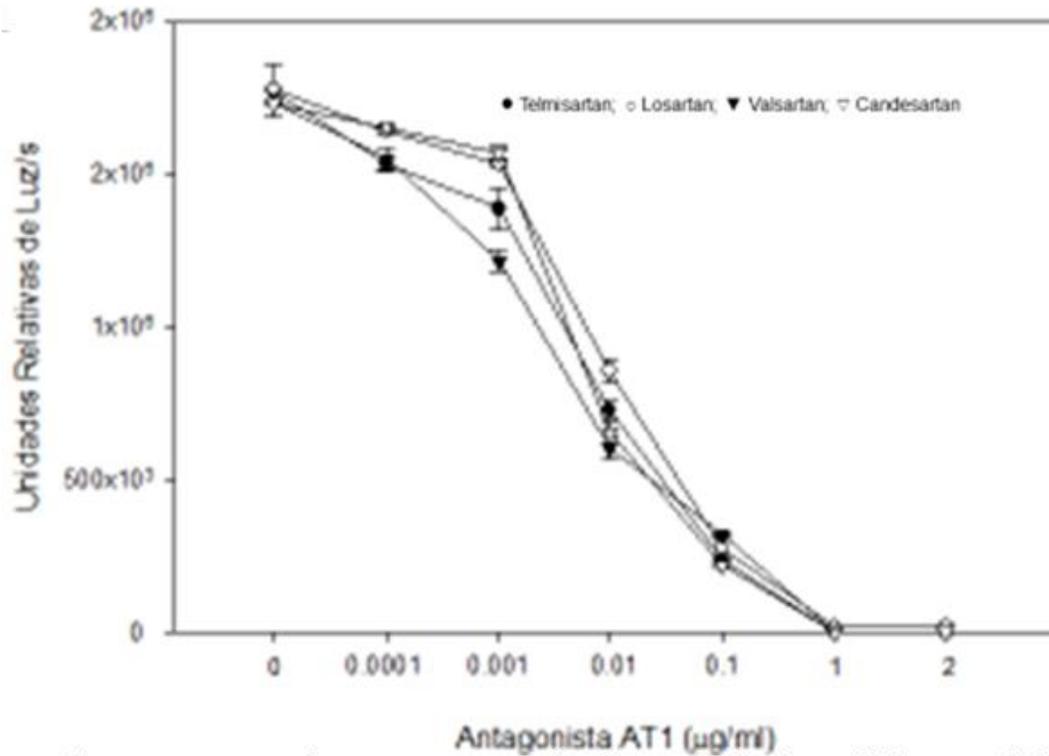


Gráfica representativa de 6 experimentos realizados por triplicado con dosis Ascendente de Ang II pura. La actividad máxima y mínima fue obtenida a la dosis de 1,000 ng/ml (1 µg/ml) y 4 ng/ml (0.004 µg/ml) de ang II

**FIGURA 6. RESPUESTA DE LUCIFERASA EN CÉLULAS EXPUESTAS A DOSIS INCREMENTADA DE ANG II.**

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

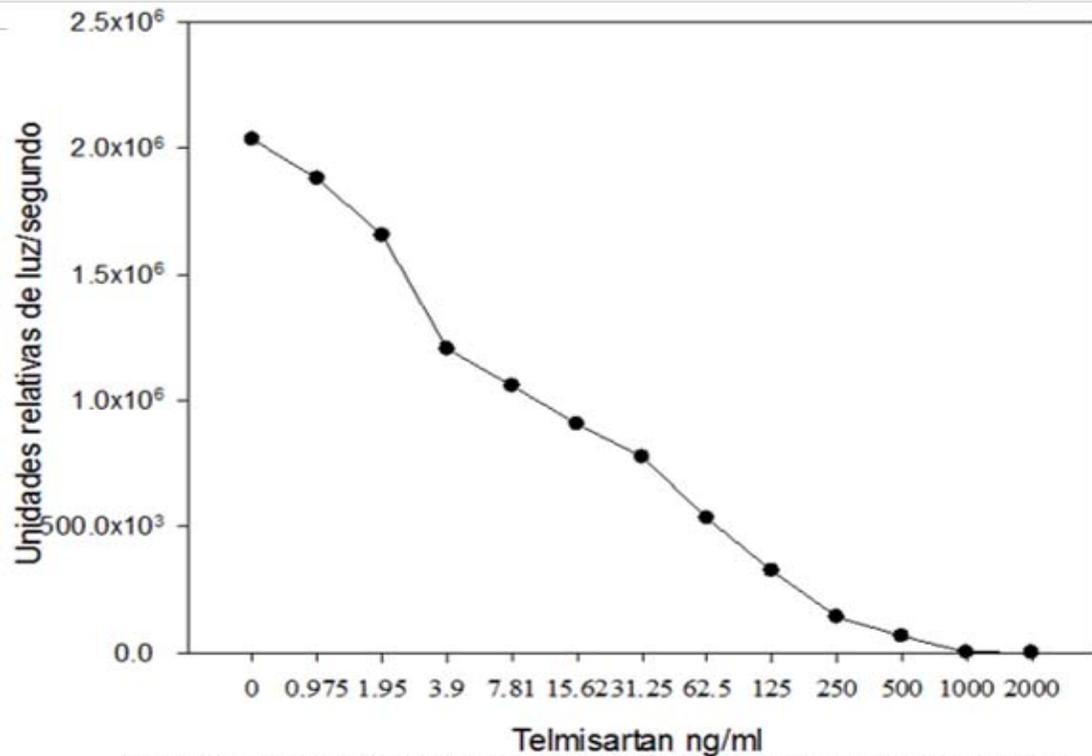


Gráfica representativa de 3 experimentos realizados por duplicado en células estimuladas con dosis constante de 2 µg/ml de Ang II pura (2000 ng/ml).

FIGURA 7. EFECTO INHIBITORIO EN LA RESPUESTA DE LUCIFERASA POR ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR AT1 DE ANG II (AT1R)

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

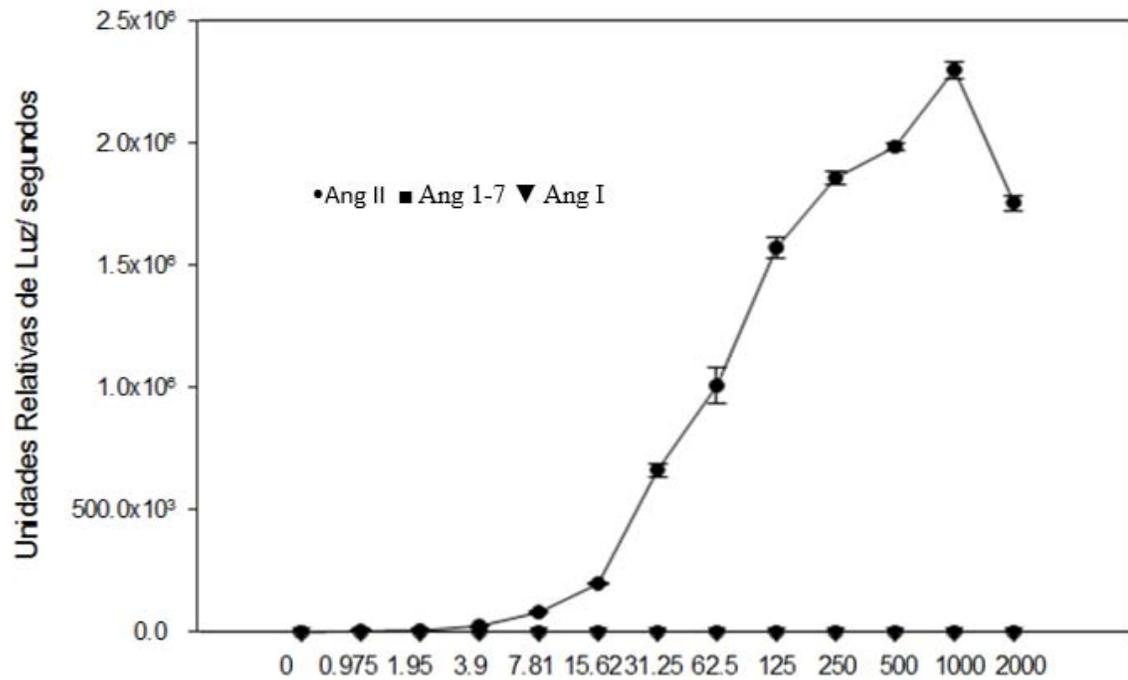


Gráfica representativa de 3 experimentos realizados por duplicado en células estimuladas con dosis constante de Ang II pura 2000 ng/ml.

FIGURA 7.1 EFECTO INHIBITORIO DE TELMISARTAN (ANTAGONISTA DEL AT1R DE ANG II) EN LA RESPUESTA DE LUCIFERASA

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI



Gráfica representativa de 6 experimentos diferentes realizados por duplicado con una dosis máxima 2000 ng/ml de Ang II Ang I y Ang 1-7 pura.

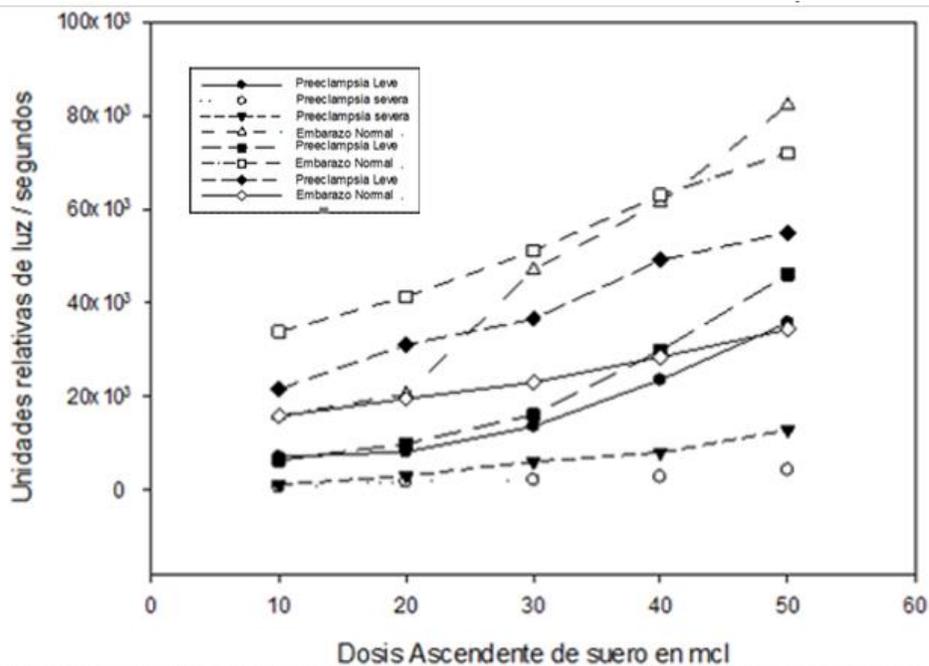
FIGURA 8. RESPUESTA DE LUCIFERASA EN CÉLULAS EXPUESTAS A DOSIS INCREMENTADA DE ANGIOTENSINA II, ANGIOTENSINA I Y ANGIOTENSINA 1

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Bioensayo en células hAT1-NFAT-Luc HEK-293 de la Ang II en suero**

La adición de volúmenes ascendentes de suero (5–25% v/v [10–50 µl/pozo]) a las células hAT1-NFAT-Luc HEK-293 estimularon la actividad de luciferasa de una manera dependiente de la concentración. A las diferentes concentraciones, todas las muestras séricas probadas exhibieron un incremento en la actividad de luciferasa, obteniéndose un paralelismo con la curva estándar de Ang II (Figura 9). A concentraciones mayores del 25% de suero, aunque hubo un incremento de la actividad de luciferasa, no se conservó paralelismo con la curva estándar de Ang II (Figura 10). Por consiguiente, cada muestra sérica fue usada a la concentración del 25% para mantener el paralelismo con la curva estándar de Ang II y para determinar más exactamente la concentración de ang II sérica por el bioensayo en las células hAT1-NFAT-Luc HEK-293.

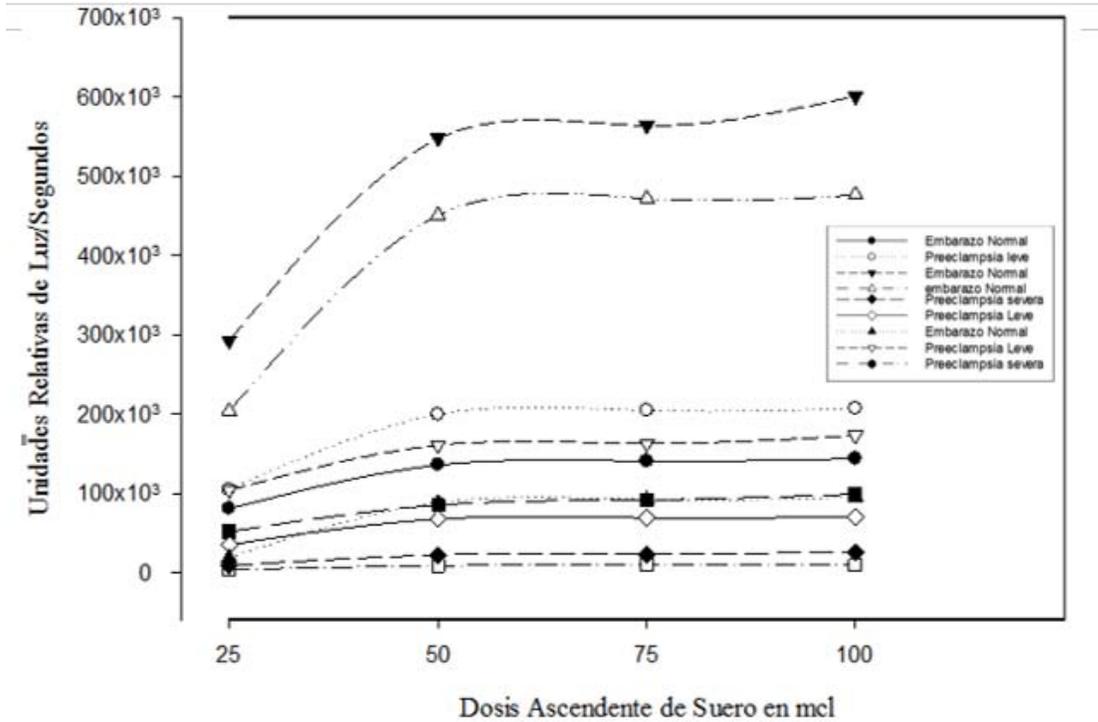


Gráfica representativa de 2 experimentos realizados por duplicado con dosis ascendente de suero. Muestra representativa de 40 sujetos que correspondieron a 3 embarazos normales, 3 casos de preeclampsia leve y 2 con preeclampsia severa.

**FIGURA 9. RESPUESTA DE LUCIFERASA EN CÉLULAS EXPUESTAS A DOSIS ASCENDENTE DE SUERO (10, 20, 30, 40 Y 50 µL.)**

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI



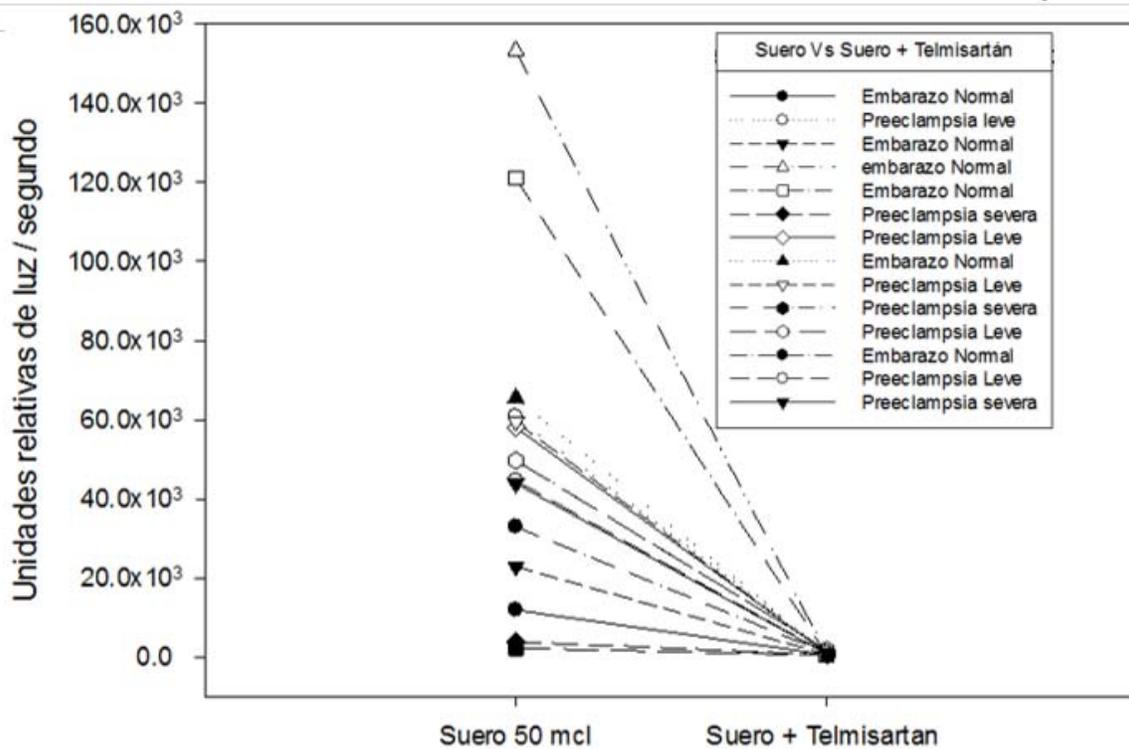
Gráfica representativa de 2 experimentos realizados por duplicado con dosis ascendente de suero. Muestra representativa de 40 pacientes que correspondieron a 4 embarazos normales, 3 casos de preeclampsia leve y 2 preeclampsia severa.

Figura 10. RESPUESTA DE LUCIFERASA EN CÉLULAS EXPUESTAS A DOSIS ASCENDENTE DE SUERO (25, 50, 75 y 100 µL)

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Los efectos del antagonista del receptor de AT1, telmisartán a una concentración de 1000 ng/ml (1 µg/ml) en la inducción de la actividad de luciferasa por los sueros se muestra en la Figura 11. Cuando el antagonista fue añadido al cultivo celular, la actividad de luciferasa fue completamente inhibida. Estos datos indican que la Ang II presente en los sueros es la responsable de la respuesta biológica en las células hAT1-NFAT-Luc HEK-293.

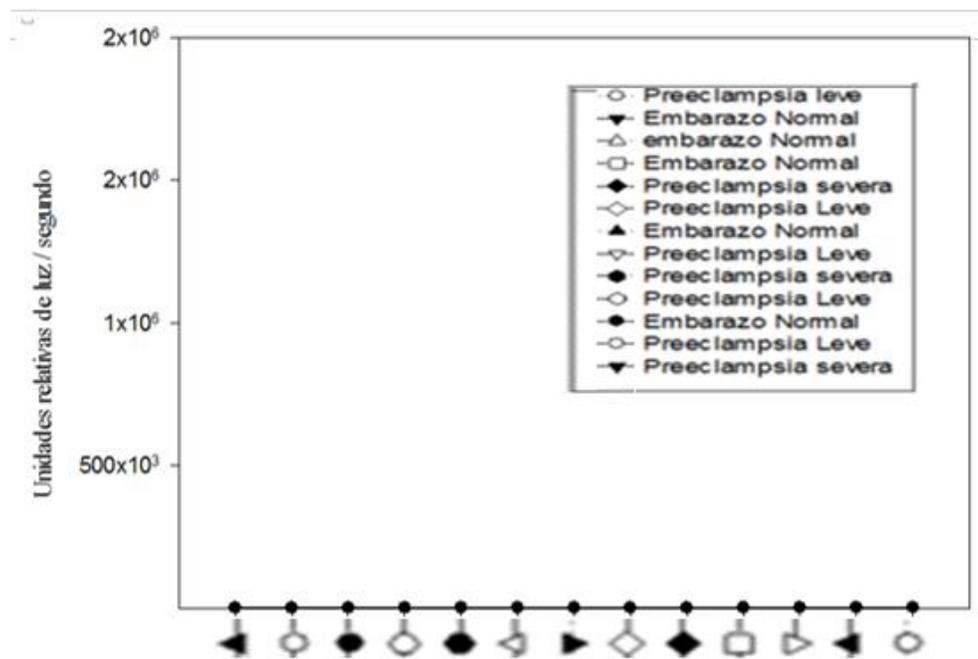


**FIGURA 11. EFECTO ANTAGONISTA DE TELMISARTÁN EN LA RESPUESTA DE LUCIFERASA EN CÉLULAS EXPUESTAS A DOSIS CONSTANTE DE 50 MCL DE SUERO Y 50 MCL DE SUERO + 1000 NG/ML DE TELMISARTÁN EN EMBARAZO NORMAL, PREECLAMPSIA LEVE Y PREECLAMPSIA SEVERA**

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Las fracciones purificadas de IgG séricas de todas las pacientes con preeclampsia y de los controles con un embarazo normal fueron incapaces de inducir la actividad de luciferasa a valores por encima de los basales (Figura 12). Además, la respuesta en la actividad de la luciferasa inducida a una dosis constante de 100 ng/ml (0.1 µg/ml) de Ang II no fue modificada en presencia de las fracciones purificadas de IgG a los cultivos, indicando que los anticuerpos anti-receptor AT1 (AA-AT1R), ya sea estimulantes o bloqueadores no estaban presentes. (Figura 12).



Muestra representativa de experimento realizado por duplicado en células estimuladas con las fracciones purificadas de IgG sérica de las 150 pacientes con embarazo Normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa que participaron en el estudio.

FIGURA 12. RESPUESTA DE LUCIFERASA EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS FRACCIONES PURIFICADAS DE INMUNOGLOBULINA G SÉRICAS DE LAS PARTICIPANTES

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Estudio transversal analítico.**

**Descripción general de la población.** Se estudiaron a un total de 90 mujeres divididas en tres grupos, 30 con embarazo normal (obtenidas de la cohorte para el segundo estudio), 30 con preeclampsia leve y 30 con preeclampsia severa. Las características clínicas y demográficas de las participantes se muestran en la tabla 3. Las pacientes con preeclampsia leve tuvieron una edad materna significativamente menor que las mujeres sanas ( $p=0.02$ ), pero sin diferencia entre las pacientes con preeclampsia severa, como tampoco entre las mujeres sanas comparadas con las pacientes con preeclampsia severa. En comparación a las mujeres sanas, las pacientes con preeclampsia severa tuvieron significativamente una frecuencia mayor de primiparidad y una frecuencia menor de tabaquismo ( $p\leq 0.04$ ). No hubo diferencia significativa en cuanto a IMC y antecedente de preeclampsia. La vía de interrupción de la gestación por operación cesárea fue del 96.7% en las pacientes con preeclampsia leve y severa, mientras que en las mujeres sanas fue del 60% ( $p<0.001$ ).

En comparación con las mujeres sin preeclampsia, las pacientes con preeclampsia tuvieron menor edad gestacional a la terminación del embarazo, un peso menor de sus infantes y una mayor proporción de complicaciones perinatales ( $p\leq 0.04$ ), independientemente de la severidad de la preeclampsia. Estos cursos adversos fueron más pronunciados en las pacientes con preeclampsia severa en comparación a las pacientes con preeclampsia leve. En el grupo de pacientes con preeclampsia severa, hubo dos con síndrome de HELLP y ocurrieron dos muertes perinatales.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Tabla 3.** Características clínicas y demográficas de las mujeres con embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa.

Variable	Embarazo	Preeclampsia	Preeclampsia
	Normal (n=30)	Leve (n=30)	Severa (n=30)
Edad materna, años	31.7 ± 4.6	27.4 ± 6.0 <sup>a</sup>	29.5 ± 6.4
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	28.1 ± 6.2	26.7 ± 5.6	26.2 ± 4.3
Primiparidad, n (%)	8 (26.7)	12 (40.0)	17 (56.7) <sup>a</sup>
Antecedente de preeclampsia, n (%)	7 (23.3)	7 (23.3)	8 (26.7)
Tabaquismo, n (%)	8 (26.7)	4 (13.3)	1 (3.3) <sup>a</sup>
Cesárea, n (%)	18 (60.0)	29 (96.7) <sup>b</sup>	29 (96.7) <sup>b</sup>
Edad gestacional a la toma de muestra	36.0 ± 0.0	36.1 ± 2.3	33.5 ± 3.3 <sup>b,c</sup>
Edad gestacional al parto (semanas)	38.4 ± 0.6	36.2 ± 2.1 <sup>b</sup>	33.6 ± 3.2 <sup>b,c</sup>
Peso RN gramos	3,053 ± 219	2,537 ± 587 <sup>b</sup>	1,726 ± 621 <sup>b,c</sup>
FPEG <p10, n (%)	0	7 (23.3) <sup>a</sup>	8 (26.7) <sup>d</sup>
FPEG <p5, n (%)	0	0	8 (26.7) <sup>e</sup>
Complicaciones Perinatales, n (%)	0	14 (46.7) <sup>b</sup>	20 (66.7) <sup>b</sup>
FPEG	0	7 (23.3) <sup>a</sup>	16 (53.3) <sup>d,f</sup>
Prematurez <37 SDG	0	5 (16.7)	8 (26.7) <sup>d</sup>
Prematurez <34 SDG	0	2 (6.7)	4 (13.3)
Muerte perinatal	0	0	2 (6.7)
Síndrome HELLP	0	0	2 (6.7)

<sup>a</sup> p<0.04 vs. Normal.

<sup>b</sup> p<0.001 vs. Normal.

<sup>c</sup> p<0.001 vs. PEL

<sup>d</sup> p<0.004 vs. Normal

<sup>e</sup> p=0.005 vs. Normal y PEL

<sup>f</sup> p=0.03 vs. PEL

después de aplicar pruebas estadísticas apropiadas

Los datos están reportados como media ± ES, Mediana (p25-75) o como Frecuencia (%), un valor de p<0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Nota en el grupo de preeclampsia severa las complicaciones perinatales, la suma es >20 debido a que 10 recién nacidos tuvieron ≥ 2 complicaciones, los 2 casos de muerte perinatal cursaron preeclampsia temprana con un peso <800 gramos.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Concentración sérica de Angiotensina II en embarazo normal, preeclampsia leve y preeclampsia severa.**

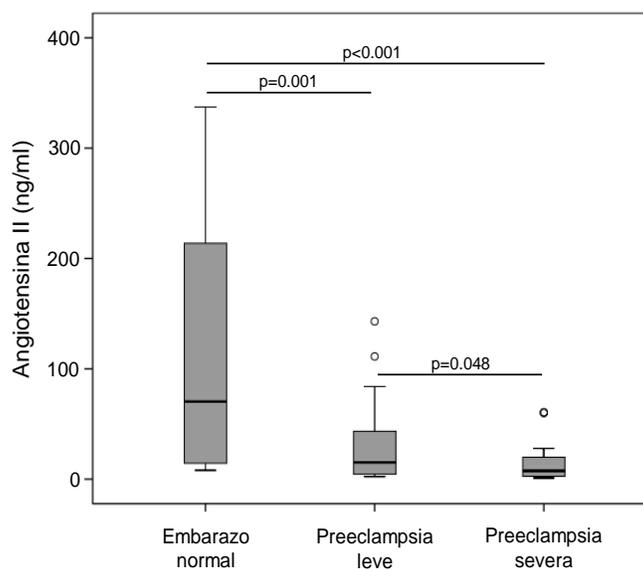
La Tabla 4 y Figura 13 muestran las concentraciones séricas de Ang II en las mujeres con embarazo normal y en aquellas con preeclampsia leve y severa. Las concentraciones séricas de Ang II fueron significativamente más altas en las mujeres con embarazo normal que en las mujeres con preeclampsia leve y severa ( $p \leq 0.001$ ) y en las pacientes con preeclampsia leve que en aquellas con preeclampsia severa ( $p=0.048$ ).

**Tabla 4.** Concentraciones séricas de angiotensina II mediante el bioensayo *in vitro* en mujeres con embarazo normal y en mujeres con preeclampsia leve y severa.

	<b>Embarazo normal (n=30)</b>	<b>Preeclampsia leve (n=30)</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Preeclampsia severa (n=30)</b>	<b>Valor de p</b>
Ang II (ng/ml)	70.4 (14.4–213.8)	15.2 (4.5–43.4)	0.001 <sup>a</sup>	7.6 (2.5–19.9)	<0.001 <sup>a</sup> 0.048 <sup>b</sup>

Los datos son expresados en mediana (rango intercuartílico).

s



**FIGURA 13.** GRÁFICA DE CAJA Y BIGOTES COMPARANDO LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ANGIOTENSINA II EN MUJERES CON EMBARAZO NORMAL Y CON PREECLAMPSIA LEVE Y SEVERA. LAS CAJAS REPRESENTAN LOS RANGOS INTERCUARTÍLICOS EN LAS CUALES LA LÍNEA HORIZONTAL REPRESENTA LA MEDIANA; LA LÍNEA HORIZONTAL SUPERIOR E INFERIOR SON LAS PERCENTILAS 75 Y 25 DE LOS DATOS DE CADA GRUPO Y EL BIGOTE SUPERIOR E INFERIOR SON LAS PERCENTILAS 90 Y 10. LOS CÍRCULOS ABIERTOS REPRESENTAN LOS VALORES EXTREMOS.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Debido a que las concentraciones séricas de Ang II no permanecen estables durante el embarazo, es decir, sufren cambios a través del mismo (véase posteriormente los datos derivados del estudio de casos y controles) y que los grupos de estudio no son comparables en cuanto a edad gestacional; se hizo un subanálisis estratificado por edad gestacional. Para este fin, sólo se incluyeron en el análisis a las pacientes con preeclampsia cuya muestra sérica fue tomada a la edad gestacional  $\geq 36$  semanas y a todas las mujeres con embarazo normal debido a que en todas ellas la muestra sérica fue tomada a las 36 SDG. Esta estrategia de análisis por edad gestacional fue imposible a edades gestacionales menores, debido a que ninguna paciente con preeclampsia leve se presentó antes de las 34 SDG. Este subanálisis se muestra en la Tabla 5. Las concentraciones de Ang II fueron significativamente más elevadas en las mujeres con embarazo normal que en las mujeres con preeclampsia leve y severa ( $p \leq 0.006$ ) y mayores en las pacientes con preeclampsia leve en comparación a las pacientes con preeclampsia severa ( $p = 0.008$ )

**Tabla 5.** Concentraciones séricas de angiotensina II mediante el bioensayo *in vitro* en mujeres con embarazo normal y en mujeres con preeclampsia leve y severa tomada a las 36 o más semanas de edad gestacional.

	<b>Embarazo normal (n=30)</b>	<b>Preeclampsia leve (n=19)</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Preeclampsia severa (n=10)</b>	<b>Valor de p</b>
Ang II (ng/ml)	70.4 (14.4–213.8)	17.6 (7.8 – 53.3)	0.006 <sup>a</sup>	3.0 (1.7 – 18.0)	<0.001 <sup>a</sup> 0.008 <sup>b</sup>

Los datos son expresados en mediana (rango intercuartílico).

<sup>a</sup> vs. embarazo normal, <sup>b</sup> vs. preeclampsia leve, después de aplicar pruebas estadísticas apropiadas.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Estudio Casos y controles anidado en una cohorte.**

**Descripción general de la población.** A partir de la cohorte conformada por 412 pacientes en seguimiento desde las 12 semanas de gestación, se incluyeron para este estudio a todas las pacientes que desarrollaron preeclampsia (n = 30, 7.3%) al seguimiento (casos) y se eligieron a 31 participantes, pareadas por edad materna, IMC, primiparidad y tabaquismo que cursaron con embarazo normal (sin preeclampsia, controles).

Las características demográficas y clínicas se muestran en la Tabla 6. Como era de esperarse, no hubo diferencia en la edad materna, IMC, primiparidad y tabaquismo. De entre las 30 pacientes que desarrollaron preeclampsia, 6 tuvieron preeclampsia leve, y 24 preeclampsia severa (de las cuales 2 presentaron síndrome HELLP, 1 Eclampsia y 1 histerectomía Obstétrica por acretismo placentario y hubo 2 casos de muerte perinatal, no se presentó ningún caso de muerte materna).

El antecedente de preeclampsia fue mayor en el grupo de preeclampsia (53.3%) vs embarazo normal (23.3%), con un valor de p 0.01.

En comparación a las mujeres embarazadas sanas, las pacientes con preeclampsia tuvieron una edad gestacional a la interrupción del embarazo menor ( $p < 0.001$ ), sus infantes tuvieron un peso menor al nacer ( $p < 0.001$ ), tuvieron una mayor proporción de infantes pequeños para la edad gestacional ( $p = 0.002$ ) y mayor proporción de cesáreas aunque esta última sin diferencia significativa ( $p = 0.30$ ). Otros eventos adversos o complicaciones perinatales solo ocurrieron en el grupo de pacientes con preeclampsia.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Tabla 6.** Características clínicas y demográficas de las mujeres que cursaron con embarazo normal y mujeres que desarrollaron preeclampsia.

<b>Variable</b>	<b>Embarazo Normal (n=31)</b>	<b>Con Preeclampsia (n=30)</b>	<b>Valor de p</b>
Edad materna, años	31.4 ±4	32.5± 5	0.41
Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	26.6 ± 5.5	28.05 ±6.1	0.36
Primiparidad, n (%)	9 (29.0)	8 (26.7)	0.81
Antecedente de preeclampsia, n (%)	7 (22.6)	16 (53.3)	<b>0.01</b>
Tabaquismo, n (%)	8 (25.8)	6 (20.0)	0.15
Cesárea, n (%)	18 (58.1)	27 (90.0)	0.30
Edad gestacional por semanas	38 (38-39)	35 (32-37)	<b>&lt;0.001</b>
Peso RN gramos	3003 (2920-3200)	1920 (1175-2480)	<b>&lt; 0.001</b>
FPEG <p10, n (%)	0	6 (20.0)	<b>0.002</b>
FPEG <p5, n (%)	0	5 (16.7)	<b>0.002</b>
Complicaciones Perinatales, n (%)	0	25 (83.3)	<b>&lt;0.0001</b>
FPEG	0	13 (43.3)	<b>0.017</b>
Prematurez <37 SDG	0	11 (36.7)	<b>0.03</b>
Prematurez <34 SDG	0	9 (30.0)	<b>0.04</b>
Muerte perinatal	0	2 (6.7)	0.49
Síndrome HELLP	0	2 (6.7)	0.49

Los datos están reportados como media ± DS, mediana (p25-p75), Frecuencia (%), Un valor p <0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. T student, U Mann Whitney, X<sup>2</sup>. FPEG (Feto pequeño para edad gestacional).

Nota en el grupo de preeclampsia las complicaciones perinatales la suma es >25 debido a que 12 recién nacidos tuvieron ≥ 2 complicaciones, los 2 casos de muerte perinatal cursaron preeclampsia temprana con un peso <800 gramos.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Cambios gestacionales en las concentraciones séricas de Angiotensina II medidas por bioensayo in vitro.**

La Tabla 7 y Figura 14 muestran las concentraciones séricas de Ang II a través de la gestación en las mujeres con un embarazo normal y en aquellas destinadas a desarrollar preeclampsia. Para evaluar los cambios en las concentraciones de Ang II a través de la gestación se realizó un análisis transversal a intervalos de 4 semanas de gestación. En las mujeres embarazadas sanas, las concentraciones séricas de Ang II progresivamente se incrementaron de la semana 12 a la semana 24, disminuyendo posteriormente hasta el final del muestreo (a la semana 36). A cada edad gestacional estudiada, las pacientes destinadas a desarrollar preeclampsia exhibieron menores concentraciones de Ang II desde la semana 12 en adelante que las observadas en las mujeres con un embarazo normal ( $p \leq 0.01$ ), excepto a las 20 SDG ( $p=0.10$ ).

**Tabla 7.** Concentraciones séricas de Ang II medida por Bioensayo in vitro en embarazo normal y preeclampsia

Variable	Embarazo Normal (n=31)	Preeclampsia (n=30)	Valor de p
<b>Ang II (ng/ml)</b>			
12 SDG	42.2 (21.9 – 196.1)	18.8 (8.4 – 34.4)	0.03
16 SDG	61.95 (43.8-188.3)	42.30 (28.4 – 120.3)	0.04
20 SDG	98.5 (58.2 – 263.6)	78.2 (25.7 – 128.1)	0.10
24 SDG	233.2 (75.6 – 361.6)	125.1 (60.9-206.2 )	0.001
28 SDG	186.7 (55.2 – 261.4)	102.01 (22.1–188.4 )	0.03
		n=27	
32 SDG	112.5 (36.9-126.3)	29.3 (19.2 -75.5)	0.02
		n=24	
36 SDG	78.9 (54.9-158.4)	15.6 (7.9 – 52.2)	0.01
	n=27	n=13	

Los datos están reportados como medianas (p25-p75). U Mann Whitney  
SDG, semanas de gestación; Ang II (Angiotensina II)

“Aplicación de un bioensayo *in vitro* para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

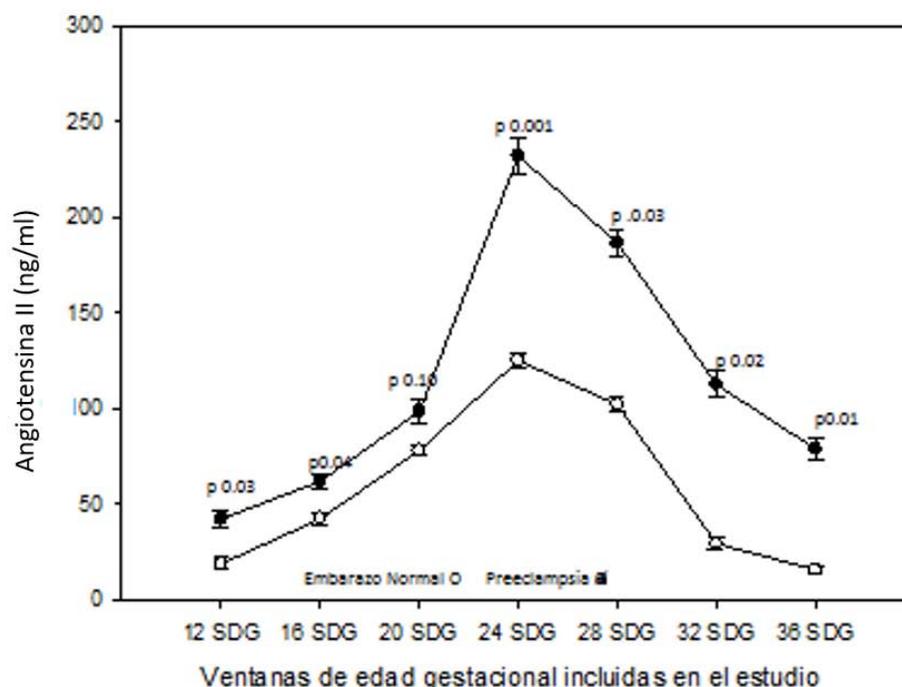


FIGURA 14. MEDIANA DE ANG II MEDIDA MEDIANTE BIOENSAYO *IN VITRO* EN EMBARAZO NORMAL Y PREECLAMPSIA, EN LAS DIFERENTES VENTANAS DE EDAD GESTACIONAL INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

**Concentración sérica de Angiotensina II medida por bioensayo *in vitro* y riesgo de desarrollar preeclampsia.**

La distribución de la concentración sérica de Ang II en percentiles en las mujeres con un embarazo normal se muestra en la Tabla 8. El efecto de los cambios en las concentraciones séricas de Ang II con la asociación del desarrollo de preeclampsia fue investigado por agrupar las concentraciones séricas de Ang II en cuartiles en base a la distribución de la Ang II entre las mujeres con un embarazo normal. Como medida de riesgo, las RM y los IC 95% fueron calculados a cada edad gestacional estudiada. Las RM para las concentraciones

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

séricas de Ang II en el cuartil más bajo (Q1) fueron comparadas con los tres cuartiles más altos (Q2-4), los cuales fueron considerados como la categoría de referencia.

**Tabla 8.** Distribución en percentiles de las concentraciones séricas de Ang II medida por bioensayo *in vitro* en las 31 mujeres que cursaron embarazo normal a cada intervalo de edad gestacional estudiada.

	<b>P 5</b>	<b>P 25</b>	<b>P 50</b>	<b>P 75</b>	<b>P 95</b>
<b>Ang II (ng/ml)</b>					
12 semanas de gestación	9.21	21.91	42.26	196.12	292.97
16 semanas de gestación	26.02	43.83	61.95	188.35	318.16
20 semanas de gestación	20.71	58.29	98.55	263.62	355.76
24 semanas de gestación	29.39	75.64	233.27	360.58	426.07
28 semanas de gestación	23.67	55.26	186.72	261.41	365.38
32 semanas de gestación	9.12	36.97	112.50	126.30	181.42
36 semanas de gestación	28.65	54.97	78.96	158.45	263.40

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

La Tabla 9 muestra que las RM para desarrollar preeclampsia progresivamente se incrementa entre las mujeres en el cuartil más bajo de las concentraciones séricas de Ang II de la distribución de las mujeres control (embarazadas sanas). A cada edad gestacional estudiada, hubo una clara asociación entre las concentraciones de Ang II en el cuartil más bajo y un incremento en el riesgo de desarrollar preeclampsia ( $RM \geq 3.8$ ). Debido a que el antecedente de preeclampsia mostro diferencias significativas en el análisis bivariado, las RM fueron ajustadas para esta variable, las RM ajustadas por el antecedente de preeclampsia se muestran en la Tabla 10. Similar al análisis no ajustado, se mantuvo una clara asociación entre el cuartil más bajo de las concentraciones séricas de la Ang II y un incremento en el riesgo de desarrollar preeclampsia a cada edad gestacional estudiada ( $RM \geq 3.1$ ).

Finalmente, se realizó un análisis de acuerdo a la presentación de la preeclampsia en temprana ( $<34$  SDG,  $n=9$ ) o tardía ( $\geq 34$  SDG,  $n=21$ ) Tabla 11. Las mujeres en el cuartil más bajo de la concentración sérica de Ang II desde la semana 12 a la 36 de gestación, exhibieron un riesgo elevado para desarrollar preeclampsia tardía. En contraste, en las mujeres que desarrollaron preeclampsia temprana, aunque las RM entre las mujeres que se encontraban en el cuartil más bajo de las concentraciones séricas de la Ang II fueron  $\geq 3.6$  a partir de la semana 16 de gestación no fueron estadísticamente significativas ( $p \geq 0.14$ ), esto debido probablemente al reducido número de pacientes que desarrollaron preeclampsia temprana e el grupo de estudio, excepto a la semana 28 de la gestación ( $RM 7.2$ , IC 95% 1.2–44.6) y un valor de  $p 0.03$ .

**“Aplicación de un bioensayo *in vitro* para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Tabla 9.** Asociación (razón de momios) entre los cuartiles de las concentraciones séricas de Ang II medida por bioensayo *in vitro* y el desarrollo de preeclampsia.

	Embarazos Normales n=31	Con Preeclampsia n=30		
	Controles	Casos	RM (IC 95%)	p
<b>Ang II (ng/ml)</b>				
12 SDG				
Q1: ≤ 21.91	8	17	3.8 (1.3-11.1)	<b>0.02</b>
Q2-4: >21.91	23	13	1.0	
16 SDG				
Q1: ≤ 43.83	8	17	3.8 (1.3-11.1)	<b>0.02</b>
Q2-4: >43.83	23	13	1.0	
20 SDG				
Q1: ≤ 58.29	8	17	3.8 (1.3-11.1)	<b>0.02</b>
Q2-4: > 58.29	23	13	1.0	
24 SDG				
Q1: ≤ 75.64	8	18	4.3 (1.5-12.8)	<b>0.008</b>
Q2-4: > 75.64	23	12	1.0	
28 SDG				
Q1: ≤ 55.26	8	16	4.2 (1.4-12.7)	<b>0.01</b>
Q2-4: > 55.26	23	11	1.0	
32 SDG				
Q1: ≤ 54.97	8	15	4.8 (1.5-15.2)	<b>0.02</b>
Q2-4: > 54.97	23	9	1.0	
36 SDG				
Q1: ≤ 36.97	8	9	6.5 (1.6-26.9)	<b>0.01</b>
Q2-4: > 36.97	23	4	1.0	

Los cuartiles (Q) fueron determinados en la base a la distribución de las concentraciones de Ang II entre las mujeres con embarazo normal (controles). Para la razón de momios mostrada, la categoría de referencia fueron los cuartiles 2-4, RM razón de momios; IC intervalo de confianza, Ang II Angiotensina II, SDG semanas de gestación.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Tabla 10.** Asociación (razón de momios) ajustada por antecedente de preeclampsia entre los cuartiles de las concentraciones séricas de Ang II medida por bioensayo *in vitro* y el desarrollo de preeclampsia.

	Embarazos Normales		Con Preeclampsia		
	n=31		n=30		
	Controles	Casos	RM (IC 95%)	p	
<b>Ang II (ng/ml)</b>					
12 SDG					
Q1: ≤ 21.91	8	17	4.7(1.4-15.7)	<b>0.01</b>	
Q2-4: >21.91	23	13	1.0		
16 SDG					
Q1: ≤ 43.83	8	17	4.7(1.4-15.7)	<b>0.01</b>	
Q2-4: >43.83	23	13	1.0		
20 SDG					
Q1: ≤ 58.29	8	17	4.7(1.4-15.7)	<b>0.01</b>	
Q2-4: > 58.29	23	13	1.0		
24 SDG					
Q1: ≤ 75.64	8	18	5.6(1.59-40.3)	<b>0.004</b>	
Q2-4: > 75.64	23	12	1.0		
28 SDG					
Q1: ≤ 55.26	8	16	4.4(1.7-50.8)	<b>0.004</b>	
Q2-4: > 55.26	23	11	1.0		
32 SDG					
Q1: ≤ 54.97	8	15	3.9(1.2-12.5)	<b>0.01</b>	
Q2-4: > 54.97	23	9	1.0		
36 SDG					
Q1: ≤ 36.97	8	9	9.8(1.6-55.6)	<b>0.007</b>	
Q2-4: > 36.97	23	4	1.0		

Los cuartiles (Q) fueron determinados en la base a la distribución de las concentraciones de Ang II entre las mujeres con embarazo normal (controles). Para la razón de momios mostrada, la categoría de referencia fueron los cuartiles 2-4, RM razón de momios ajustada por antecedente de preeclampsia; IC intervalo de confianza, Ang II Angiotensina II, SDG semanas de gestación.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Tabla 11.** Asociación (razón de momios) entre los cuartiles de las concentraciones séricas de Ang II medida por bioensayo *in vitro* y el desarrollo de preeclampsia temprana y tardía.

	Embarazo Normal	Preeclampsia Temprana			Preeclampsia Tardía		
	n (31)	(<34 SDG) n=9			(>=34 SDG) n=21		
		RM (IC95%)	p		RM (IC 95%)	p	
<b>Ang II (ng/ml)</b>							
12 SDG							
Q1: ≤ 21.91	8	2	1.12 (0.06-5.7)	0.81	15	7.2 (2.1-24.8)	<b>0.002</b>
Q2-4: >21.91	23	7	1.0		6	<b>1.0</b>	
16 SDG							
Q1: ≤ 43.83	8	5	3.6 (0.6-22.4)	0.14	12	3.8 (1.2-12.5)	<b>0.03</b>
Q2-4: >43.83	23	4	1.0		9	<b>1.0</b>	
20 SDG							
Q1: ≤ 58.29	8	5	3.6 (0.6-22.4)	0.14	12	3.8 (1.2-12.5)	<b>0.03</b>
Q2-4: > 58.29	23	4	1.0		9	<b>1.0</b>	
24 SDG							
Q1: ≤ 75.64	8	5	3.6 (0.6-22.4)	0.14	12	3.8 (1.2-12.5)	<b>0.03</b>
Q2-4: > 75.64	23	4	1.0		9		
28 SDG							
Q1: ≤ 55.26	8	5	7.2 (1.2-44.6)	<b>0.03</b>	12	3.8 (1.2-12.5)	<b>0.03</b>
Q2-4: > 55.26	23	2	1.0		9	<b>1.0</b>	
32 SDG							
Q1: ≤ 54.97	8	2	5.8 (0.5-72.3)	0.18	13	4.7 (1.4-15.4)	<b>0.01</b>
Q2-4: > 54.97	23	1	1.0		8	<b>1.0</b>	
36 SDG							
Q1: ≤ 36.97					9	6.5 (1.6-26.9)	<b>0.01</b>
Q2-4: > 36.97					4	1.0	

Los cuartiles (Q) fueron determinados en la base a la distribución de las concentraciones de Ang II entre las mujeres con embarazo normal (controles). Para la RM mostrada, la categoría de referencia fueron los cuartiles 2-4, RM razón de momios; IC intervalo de confianza, Ang II Angiotensina II, SDG semanas de gestación.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Discusión.**

Aunque la causa de la preeclampsia es aún incierta, varias evidencias sugieren que las alteraciones en los componentes del SRAA participan en la fisiopatología de la preeclampsia. La potente actividad fisiológica del SRAA es mediada principalmente por la Ang II, que es uno de los vasoconstrictores más potentes y desempeña un papel en el control de la sal y el balance hídrico. Para determinar la concentración circulante de Ang II y su significancia clínica en la preeclampsia, desarrollamos una línea celular HEK-293 establemente transfectada expresando el AT1R humano y un gen reportero de luciferasa de respuesta al 4XNFAT. Esta línea celular mostró un incremento dosis-dependiente específico en la expresión de luciferasa a la exposición de Ang II, la cual fue bloqueada en la presencia de varios antagonistas del AT1R (telmisartán, valsartán, entre otros), respuesta nula a otros péptidos precursores o derivados de la Ang II, como la Ang I y Ang 1-7 y su alta precisión evaluada por los bajos coeficientes de variación inter- e intra-ensayo (7.6 – 8.9 % respectivamente). En adición, este bioensayo es de bajo costo y fácil de realizar dado que no requiere procesos previos de separación de péptidos, lo cual lo hace adecuado para investigación y con potencial de uso clínico. En contraste, previos estudios han medido las concentraciones circulantes de Ang II empleando ensayos inmunométricos que requieren procesos previos de extracción de péptidos haciéndolos laboriosos, complejos y caros, así como con la desventaja de la pérdida potencial de los péptidos en los procesos intermedios. En el presente estudio empleando un bioensayo específico para medir las concentraciones circulantes de Ang II en mujeres embarazadas, encontramos que las concentraciones séricas de Ang II fueron significativamente menores en pacientes al momento del diagnóstico de preeclampsia en comparación a las mujeres embarazadas sanas. Aún más, fuimos capaces de encontrar que las diferencias en las concentraciones séricas de Ang II fueron más pronunciadas conforme la severidad de la preeclampsia se incrementa, independientemente de la edad gestacional de acuerdo al análisis estratificado realizado por esta variable, sugiriendo que los cambios en las concentraciones séricas de Ang II efectivamente reflejan las alteraciones en los componentes del SRAA y probablemente su intensidad.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Aunque en los últimos 50 años, varios estudios han dirigido la pregunta de si las concentraciones circulantes de la Ang II difieren entre mujeres con un embarazo normoevolutivo y con enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo, existe un consenso unánime en que muchos de los componentes circulantes del SRAA están incrementados en las mujeres con un embarazo normoevolutivo, en comparación con las mujeres con preeclampsia (73). En relación con la Ang II, tres estudios previos han encontrado que las concentraciones circulantes en mujeres con preeclampsia aunque fueron menores en comparación con las mujeres embarazadas sanas, no fueron significativamente diferentes (Gordon 1973, Furuhashi 1991 y Velloso 2007), sin embargo en estos estudios la población incluida de mujeres con preeclampsia fue pequeña (Gordon n=6, Velloso n=20) y mal definida, incluso Velloso et al. (74) Analizó la concentración de Ang II de acuerdo al polimorfismo del gen de la ACE (1 para el genotipo II, 7 para el genotipo ID y 12 para el genotipo DD, encontrando en este último genotipo una diferencia importante entre embarazadas con preeclampsia y embarazadas sanas [ $42.8 \pm 5.4$  pg/ml vs.  $51.3 \pm 5.9$  pg/ml, respectivamente], pero sin significancia estadística [ $p=0.32$ ] por su reducido número de pacientes y por lo tanto bajo poder del estudio). Aunque Furuhashi et al. (87) estudió a 35 mujeres con preeclampsia, su definición de preeclampsia fue vaga y no acorde a las guías actuales para la clasificación y diagnóstico de Hipertensión y embarazo. (ACOG 1)

En adición, todos los estudios previos emplearon un RIA (Radioinmunoensayo) para determinar las concentraciones de Ang II, usando anticuerpos con reacción cruzada a péptidos menores.

Nuestros resultados confirman y extienden previas observaciones usando métodos inmunométricos más específicos para las mediciones de Ang II, ya sea solos o en combinación con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), demostrando claramente en poblaciones bien definidas que las concentraciones circulantes de Ang II están significativamente reducidas en las pacientes con preeclampsia en comparación a las mujeres con un embarazo normal. (80, 84, 86, 88) Además nuestro hallazgo de que las concentraciones circulantes de Ang II están más reducidas en las formas severas de la preeclampsia es acorde con un estudio previo con resultados similares (86). A diferencia de las mujeres embarazadas sanas en donde hay un incremento de todos los componentes del

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

SRAA, incluyendo la Ang II, la disminución de Ang II en las mujeres con preeclampsia obedece a la desregulación de este sistema con bajas concentraciones de renina y angiotensinogéno (79), aunque el mecanismo exacto de esta desregulación no es clara.

Interesantemente, a pesar del incremento en las concentraciones de Ang II en las mujeres embarazadas sanas, éstas presentan una resistencia a la infusión de Ang II (casi dos veces) para incrementar la presión arterial diastólica 20 mmHg en comparación a mujeres no embarazadas, mientras que las pacientes con preeclampsia no muestran esta resistencia a la infusión de Ang II, incluso esta resistencia está presente antes de que desarrollen clínicamente la enfermedad (77) y hasta 8 meses después del embarazo (78,102). Las posibles explicaciones para el incremento de esta sensibilidad pueden obedecer a: 1) en las mujeres con preeclampsia existe un incremento en la expresión de los AT1 en el tejido adiposo, por lo que su expresión puede también aumentar en otros tejidos como la placenta según reporta Yamaleyeva (), 2) la preeclampsia está caracterizada por un incremento en la heterodimerización del AT1R con el receptor de la bradisinina tipo 2, impidiendo la internalización del AT1R permitiendo a la Ang II seguir uniéndose a el AT1R (103), 3) un incremento en la infiltración de neutrófilos, resultando en un aumento en la producción de radicales libre de oxígeno, promoviendo la hiperreactividad vascular (104), 4) un incremento en el factor anti-angiogénico sFlt-1, el cual antecede al desarrollo de preeclampsia y es capaz de deteriorar la fosforilación de la sintasa de óxido nítrico (105), y 5) la presencia de anticuerpos agonistas anti-AT1R (106). Con respecto a la presencia de AAT1R, su participación en la preeclampsia es controversial, aunque se han involucrado en varios mecanismos fisiopatológicos de la preeclampsia, su presencia no es relevante en ciertos grupos de poblaciones como ha sido en población mestiza mexicana, en donde fue demostrado que la presencia de estos autoanticuerpos es virtualmente nula (63). Los resultados del presente estudio vuelven a confirmar la ausencia de dichos anticuerpos y excluyen definitivamente algún efecto o interferencia en nuestro bioensayo en las mediciones de Ang II, al menos en nuestra población de pacientes estudiadas. Además, un estudio reciente en 351 mujeres embarazadas, mostró que los AA-AT1R no son marcadores sensibles para predecir la enfermedad y por lo tanto cuestiona la utilidad de ellos como biomarcadores en la preeclampsia (107).

Una vez demostrado que las concentraciones de Ang II fueron significativamente diferentes al momento del diagnóstico de la preeclampsia en comparación a las mujeres embarazadas sanas, el siguiente objetivo fue determinar si estos cambios ocurrían sólo al momento de las

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

manifestaciones clínicas de la enfermedad o si precedían a ella y su potencial en determinar el riesgo de desarrollar preeclampsia. Para tal fin, se diseñó un estudio de casos y controles anidado en una cohorte. Encontramos que las concentraciones séricas de Ang II en las mujeres que eventualmente desarrollaron preeclampsia se comportan distintamente durante el embarazo complicado con preeclampsia que en las embarazadas sanas. En mujeres con un embarazo sano, las concentraciones de Ang II se elevan paulatinamente desde la semana 12 de gestación a la semana 20 de gestación, siendo su pico máximo a las 24 SDG para posteriormente disminuir paulatinamente hasta las 36 SDG, en contraste, las mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia, los cambios dinámicos de las concentraciones de Ang II siguieron el mismo comportamiento que en las mujeres con un embarazo normal, pero sus concentraciones fueron significativamente menores en cada ventada de edad gestacional estudiada. Estos datos son consistentes con dos estudios previos que mostraron que las concentraciones de Ang II son diferentes entre trimestres en mujeres embarazadas sanas, siendo los niveles más bajos en el primer trimestre, intermedios en el segundo trimestre y mayores en el tercer trimestre (88,84). A la fecha, las mediciones seriadas de Ang II a través del embarazo sólo han sido hechas en mujeres con un embarazo normal. En este sentido y a nuestro conocimiento, el presente reporte representa el primero que prospectivamente ha determinado las concentraciones séricas de Ang II en pacientes embarazadas que eventualmente desarrollaron preeclampsia. Interesantemente, el estudio clásico de Gant y cols. (77), encontró que la dosis de Ang II requerida para aumentar la presión arterial en mujeres con un embarazo normal fue mayor que en las mujeres no embarazadas ( $7.35 \pm 0.67$  ng/Kg/min). En las mujeres con un embarazo normal, la dosis requerida se incrementa alrededor de las 28 SDG y después de las 30 SDG la dosis requerida disminuye ( $8.6 \pm 0.76$  ng/Kg/min entre las 7–10 SDG,  $14.9 \pm 1.1$  ng/Kg/min a las 28 SDG, y a  $10.7 \pm 0.71$  ng/Kg/min a las 38 SDG). En contraste, las mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia (n=72), exhibieron una resistencia a la respuesta presora entre las 15–18 SDG ( $12.9 \pm 1.1$  ng/Kg/min), para posteriormente disminuir progresivamente esta resistencia. Entre las 23–26 SDG, hubo una clara diferencia en la respuesta presora entre las mujeres con un embarazo normal y las mujeres que

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

desarrollaron preeclampsia ( $13.86 \pm 0.81$  vs.  $10.44 \pm 0.73$ , respectivamente), y el incremento en la sensibilidad a la Ang II se mantuvo desde las 23 a las 36 SDG. Interesantemente, nuestros resultados de los cambios dinámicos en las concentraciones de Ang II en las mujeres que desarrollan preeclampsia guardan una estrecha relación, en donde las diferencias en las concentraciones de Ang II no son tan marcadas entre las mujeres sanas y quienes desarrollaron preeclampsia entre las 12 a 20 SDG en donde la sensibilidad a la Ang II es semejante. A partir de las 24 SDG y en adelante, las diferencias en las concentraciones de Ang II entre las mujeres sanas y quienes desarrollan preeclampsia son muy marcadas y es donde se hace aparente el incremento de la sensibilidad a la Ang II en las pacientes que desarrollaron preeclampsia. Colectivamente, estos datos aportan por primera vez evidencia que las alteraciones en las concentraciones circulantes de Ang II están presentes en mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia y que estos cambios están relacionados con la sensibilidad a la respuesta presora de Ang II, tanto en mujeres con un embarazo sano, como en aquellas destinadas a desarrollar preeclampsia. Por otra parte, es importante resaltar que en reportes previos las diferencias encontradas son expresadas en fmol/ml o pg/ml, en contraste nuestros resultados son más altos que los previos y expresados en ng/ml. Sin embargo, pueden ser explicados porque nuestro bioensayo no requiere de procedimientos preparativos de extracción, en contraste a otros estudios en donde sí se requirieron y la verdadera concentración del péptido pudo ser seriamente afectada por su pérdida en esos pasos. En adición, nuestro estudio utilizó un bioensayo para la medición de Ang II y de acuerdo a los estudios para determinar la sensibilidad presora en respuesta a la infusión de Ang II, las dosis empleadas para evocar una respuesta in vivo, sobrepasarían los valores en las unidades previamente reportadas, pero serían más acordes a nuestros resultados.

Finalmente, las mujeres cuyos valores de Ang II cayeron en el cuartil más bajo mostraron un incremento en el riesgo de preeclampsia. Cuando el mismo análisis fue hecho basado en la edad gestacional, se encontró que el riesgo de desarrollar preeclampsia progresivamente se incrementó a través del embarazo, esta asociación se mantuvo independientemente del antecedente de preeclampsia. En adición esta misma tendencia se observó en aquellas

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

pacientes que desarrollaron preeclampsia tardía, pero no para el desarrollo de preeclampsia temprana.

Las fortalezas de nuestro estudio son las siguientes: el primer estudio fue diseñado para determinar diferencias en las concentraciones de Ang II al momento del diagnóstico de la enfermedad y de su severidad en poblaciones bien definidas y controlando por otras variables como la edad gestacional; el segundo estudio fue diseñado para determinar sí, cuándo y cómo las concentraciones circulantes de Ang II cambian en las mujeres embarazadas destinadas a desarrollar preeclampsia; cómo las concentraciones de Ang II cambian dependiendo de la edad gestacional, las mediciones a intervalos de tiempo regulares fueron hechas (cada 4 semanas) en las mismas participantes; y para descartar el efecto de potenciales confusores, los casos y los controles fueron pareados, y otras variables fueron controladas en un análisis de regresión múltiple. No obstante, es importante reconocer que nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Primero, no se incluyeron pacientes con otras condiciones obstétricas que comparten similitudes con la preeclampsia, tales como hipertensión gestacional o embarazos complicados con restricción del crecimiento intrauterino. Segundo, incluye falta de generabilidad para mujeres con alto riesgo para preeclampsia, tales como hipertensión crónica, diabetes pregestacional, enfermedades renales, enfermedades autoinmunes u otras comorbilidades asociadas. Finalmente, aunque las RM fueron mayores en las pacientes que desarrollaron preeclampsia temprana, no nos fue posible detectar diferencias significativas debido al reducido número de mujeres que desarrollaron preeclampsia temprana.

En conclusión, los resultados presentados aquí utilizando un bioensayo homólogo para medir las concentraciones circulantes de Ang II, se encontró que las concentraciones de Ang II fueron significativamente menores en mujeres al momento del diagnóstico de preeclampsia y están estrechamente relacionados a la severidad de la enfermedad y que las concentraciones de Ang II pueden ser usadas como un biomarcador de preeclampsia y de su severidad. Este estudio también confirma que las concentraciones de Ang II en mujeres embarazadas sanas sufren cambios durante el embarazo y que la disminución de las concentraciones de Ang II precede el inicio de las manifestaciones clínicas de la

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

preeclampsia desde las 12 SDG en adelante y se asocia al riesgo de desarrollar preeclampsia. Más estudios longitudinales se requieren para determinar el uso clínico de las mediciones de Ang II en otras poblaciones con alto riesgo de desarrollar preeclampsia, así como también elucidar la causa de la disminución de la Ang II en preeclampsia y determinar su papel último en la patogénesis de la misma y descartar que las alteraciones de las concentraciones de la Ang II sea causal y no un epifenómeno.

**“Aplicación de un bioensayo *in vitro* para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Conclusiones**

En conclusión, los resultados de esta investigación nos muestran que existe diferencia significativa en la concentración sérica de Ang II medida mediante bioensayo *in vitro* entre mujeres con embarazo normal, mujeres con preeclampsia leve o con preeclampsia severa, además; estos hallazgos nos permiten expresar que en presencia de preeclampsia y a mayor severidad de la enfermedad se espera menor cantidad en la concentración sérica de la Ang II.

Por otro lado, el estudio de casos y controles anidado en una cohorte nos muestra por primera vez que el comportamiento en las concentraciones de Ang II en embarazo normal y embarazo que evoluciona a preeclampsia se comportan de manera similar al incrementar progresivamente conforme avanza el embarazo hasta alcanzar las 24 semanas de gestación, para después iniciar un descenso hasta alcanzar los valores de las 12 semanas en la ventana de las 36SDG; sin embargo este patrón de incremento es menos pronunciado en el caso de los embarazos que evolucionan a preeclampsia.

Así mismo, podemos concluir que los cambios en las concentraciones séricas de Ang II medida por un bioensayo *in vitro* preceden al desarrollo de preeclampsia y sus concentraciones bajas están asociadas al riesgo de desarrollar preeclampsia.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Anexo 1. Cronograma de Actividades**

	2013						2014												2015		2016					
	SEMESTRE 2013-2						SEMESTRE 2014-1						SEMESTRE 2014-2						SEMESTRE 2015-1							
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	01-12	
Actualización y revisión del tema de tesis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	XXX
Estandarización de las pruebas de medición			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
Presentación y Aprobación CLEIS			X	X																						
Reclutamiento de pacientes							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Seguimiento de pacientes							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Determinaciones de la variables a estudiar							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de resultados, discusión y conclusiones.																								X	X	XXX
Preparación manuscritos para obtención de Grado																								X	X	XXX

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Anexo 1. Hoja de Recolección de datos

**DATOS GENERALES**

Nombre: \_\_\_\_\_ NSS \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Número Consecutivo: \_\_\_\_\_ Fecha de inclusión: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES.**

Edad: \_\_\_\_\_ Gesta: \_\_\_\_\_ Para: \_\_\_\_\_ Aborto: \_\_\_\_\_ Cesarea: \_\_\_\_\_ SDG: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_

Antecedente de Preeclampsia en embarazo previo: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Antecedente de Pérdida gestacional: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ SDG \_\_\_\_\_

Antecedente de Tabaquismo: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Numero de cigarrillos x día \_\_\_\_\_

**EMBARAZO ACTUAL**

Normal: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Preeclampsia: No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_ Leve \_\_\_\_\_ Severa \_\_\_\_\_ Sx HELLP: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Vía de Interrupción: Cesárea \_\_\_\_\_ Parto \_\_\_\_\_ Histerotomía \_\_\_\_\_

SDG Capurro: \_\_\_\_\_ Ingreso a UCIN: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ Peso en grs \_\_\_\_\_

Muerte Perinatal: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

**CONCENTRACIÓN DE ANGIOTENSINA EN ng/ml (ESTUDIO TRANSVERSAL)**

Semanas de Gestación: \_\_\_\_\_ Concentración Ang II  $\mu$ M/ml \_\_\_\_\_

**CONCENTRACIÓN DE ANGIOTENSINA EN ng/ml (ESTUDIO CASOS Y CONTROLES)**

12 SDG \_\_\_\_\_

16 SDG \_\_\_\_\_

20 SDG \_\_\_\_\_

24 SDG \_\_\_\_\_

28 SDG \_\_\_\_\_

32 SDG \_\_\_\_\_

36 SDG \_\_\_\_\_

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Anexo 2. Carta de consentimiento informado Estudio de Casos y Controles anidado en una cohorte**

Título del estudio de investigación:

**Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad**

*Investigador Principal: Dr. Alfredo Leños Miranda*

*Investigador colaborador: Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga.*

**Lugar y Fecha:** México DF a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014. Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”. IMSS.

**Número de Registro:** R-2013-3606-018 **Estudio con riesgo:** Mínimo

### **1. Propósito del estudio**

La estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, en el Servicio de Enfermedades Hipertensivas del Embarazo y del Servicio de Perinatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

El estudio tiene como propósito evaluar si el uso de algunas pruebas en su sangre para detectar la presencia de una proteína llamada “angiotensina II” (que es una sustancia que sirve para el buen funcionamiento de su riñón y su presión arterial) que puede ayudarnos a saber si una mujer embarazada puede desarrollar preeclampsia que es una enfermedad grave con aumento de la presión arterial y pérdida de proteínas por la orina.

Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque de acuerdo a su historial médico pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Al igual que usted, alrededor de 300 mujeres embarazadas más con embarazo normal hasta este momento (12 semanas) serán invitadas a participar en este estudio y se les citará cada 4 semanas hasta que se haya resuelto su embarazo.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

## **2. Procedimientos**

Si usted acepta participar en el estudio ocurrirá lo siguiente:

a) Evaluación clínica. Consiste en la medición de su peso, estatura y le tomaremos su presión arterial. Además le pediremos que responda un cuestionario en el que le preguntaremos sobre: embarazos previos y de su historial médico. Para todo esto nos tardaremos aproximadamente 15 minutos. Además le tomaremos una muestra de sangre. Será citada cada 4 semanas a la unidad de investigación en medicina reproductiva ubicada en el sexto piso de este mismo hospital. Y el resto de la información que necesitemos la obtendremos a partir del expediente clínico de usted hasta el final de su embarazo y hasta que sea dada de alta del hospital.

b) Toma de muestras biológicas. Para poder realizarle la toma de muestra de sangre no es necesario que este en ayuno. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 5 ml de su sangre (1 cucharadita), para realizarle algunos estudios de laboratorio. Nos tardaremos aproximadamente 5 minutos en tomarle la muestra de sangre y en hacerle algunas preguntas si es necesario.

Los estudios de laboratorio que le realizaremos incluyen: la medición de su nivel en sangre de la sustancia llamada Angiotensina II. El propósito de realizarle este estudio de laboratorio es para saber si los niveles de esta sustancia en su sangre pueden ayudarnos a saber si su embarazo actualmente normal puede convertirse en una enfermedad llamada

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI  
preeclampsia donde hay elevación de su presión de arterial y pérdida de proteínas en la orina.

**3. Posibles riesgos y molestias**

Las molestias o riesgos asociados con los procedimientos de la evaluación clínica (medición de peso, talla y presión arterial) no ocasionan dolor, incomodidad o riesgo alguno.

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia o raramente un moretón que desaparece en menos de una semana.

**4. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio**

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted, ya que sus citas serán el mismo día que acuda a su cita habitual de control prenatal.

No recibirá ningún beneficio al participar en este estudio.

Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la enfermedad, por lo tanto, los resultados de este estudio brindarán información importante para el mejor manejo de personas embarazadas que pudieran complicarse con preeclampsia.

**5. Información sobre resultados y alternativas de tratamiento.**

Como es un estudio en el que queremos saber si la sustancia en la sangre que vamos a estudiar sirve para determinar si puede aparecer una complicación en su embarazo (preeclampsia) los estudios los realizaremos hasta que terminemos de juntar toda la información de las 300 pacientes que vamos a estudiar, por lo que no podremos darle los resultados de estos estudios.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**6. Participación o retiro**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en el IMSS, y se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Esto es, no afectará su relación con el IMSS y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS.

Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio y a lo largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

**7. Privacidad y confidencialidad.**

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla (su nombre y teléfono) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán guardados por separado para mantener la confidencialidad de sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas. Sólo el equipo de investigación conformado por el Dr Alfredo Leños Miranda y La Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga tendrá acceso a su información.

El equipo de investigadores, su médico tratante en el Servicio de Enfermedades Hipertensivas del embarazo y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

toda información que pudiera ser utilizada para identificarla, esta información no estará relacionada con la información que nos proporcione en los cuestionarios y con los resultados de sus estudios de laboratorio ya que le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida cinco años después de concluir el estudio.

**8. En caso de colección de material biológico:**

\_\_\_\_\_ No autorizo que se me tome la muestra.

\_\_\_\_\_ Si autorizo que se me tome la muestra, sólo para este estudio.

\_\_\_\_\_ Si autorizo que se me tome la muestra, para este estudio y estudios futuros.

**9. Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio**

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 08:00 a 15:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Alfredo Leños Miranda, que es el investigador responsable del estudio, al teléfono: 55 50 64 22, extensión 28003, en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva ubicada en el sexto piso del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” o con el Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga al mismo número de teléfono, o bien al teléfono móvil: 044 722 264 13 05.

**10. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación**

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los teléfonos: 56276900-21216, de 9 a 16:00 horas; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.go.mx. La Comisión de ética se encuentra

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI  
ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

**11. Declaración de consentimiento informado**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

---

Nombre de la participante, Firma y Fecha

---

Nombre del esposo, concubino o pareja de la participante, firma y fecha

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado, Firma y Fecha

**Firma de los testigos**

Mi firma como testigo certifica que la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

---

Nombre del Testigo 1, Firma y Fecha

---

Nombre del Testigo 2, Firma y Fecha

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

### **Anexo 3. Carta de consentimiento informado Estudio Transversal analítico. (Embarazo normal sin preeclampsia)**

Título del estudio de investigación:

**Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad**

*Investigador Principal: Dr. Alfredo Leños Miranda*

*Investigador colaborador: Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga.*

**Lugar y Fecha:** México DF a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014. Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”. IMSS.

**Número de Registro:** R-2013-3606-018 **Estudio con riesgo:** Mínimo

#### **1. Propósito del estudio**

La estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, en el Servicio de Enfermedades Hipertensivas del Embarazo y del Servicio de Perinatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

El estudio tiene como propósito evaluar si el uso de algunas pruebas en su sangre sirven para detectar la presencia de una proteína llamada “angiotensina II” (que es una sustancia que sirve para el buen funcionamiento de su riñón y su presión arterial) que puede ayudarnos a saber si los niveles de esta proteína varían entre una mujer embarazada sana (sin preeclampsia) como usted y una mujer embarazada con una enfermedad que se llama preeclampsia que es una enfermedad grave con aumento de la presión arterial y pérdida de proteínas por la orina.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque de acuerdo a su historial médico pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto.

Al igual que usted, alrededor de 29 mujeres embarazadas con embarazo normal como usted de más de 20 semanas de gestación serán invitadas a participar en este estudio, así como a 30 pacientes con preeclampsia leve y 30 pacientes con preeclampsia severa, se le harán una serie de preguntas y se le tomará una muestra de sangre solo en esta ocasión.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

## **2. Procedimientos**

Si usted acepta participar en el estudio ocurrirá lo siguiente:

a) Evaluación clínica. Consiste en la medición de su peso, estatura y le tomaremos su presión arterial. Además le pediremos que responda un cuestionario en el que le preguntaremos sobre: embarazos previos y de su historial médico. Para todo esto nos tardaremos aproximadamente 15 minutos. Además le tomaremos una muestra de sangre. De su expediente clínico obtendremos toda la información clínica de usted hasta este momento.

b) Toma de muestras biológicas. Para poder realizarle la toma de muestra de sangre no es necesario que este en ayuno. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 5 ml de su sangre (1 cucharadita), para realizarle algunos estudios de laboratorio. Nos tardaremos aproximadamente 5 minutos en tomarle la muestra de sangre.

Los estudios de laboratorio que le realizaremos incluyen: la medición de su nivel en sangre de la sustancia llamada Angiotensina II. El propósito de realizarle este estudio de laboratorio es para saber si los niveles de esta sustancia en su sangre varían al compararlos con los niveles de la misma sustancia en la sangre de una mujer que padece preeclampsia.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**3. Posibles riesgos y molestias**

Las molestias o riesgos asociados con los procedimientos de la evaluación clínica (medición de peso, talla y presión arterial) no ocasionan dolor, incomodidad o riesgo alguno.

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia o raramente un moretón que desaparece en menos de una semana.

**4. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio**

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted, ya que solo le haremos una pequeña historia clínica y tomaremos una muestra de sangre por esta única ocasión.

No recibirá ningún beneficio al participar en este estudio.

Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la enfermedad, por lo tanto, los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de personas embarazadas que pudieran complicarse con preeclampsia.

**5. Información sobre resultados y alternativas de tratamiento.**

Como es un estudio en el que queremos saber si la sustancia en la sangre que vamos a estudiar varía entre una paciente sana (sin preeclampsia) como usted y una paciente que padezca preeclampsia. Los estudios los realizaremos hasta que terminemos de juntar toda la información de las 89 pacientes mas que vamos a estudiar, por lo que no podremos darle los resultados de estos estudios.

**6. Participación o retiro**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en el IMSS, y se le

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Esto es, no afectará su relación con el IMSS y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS.

Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

### **7. Privacidad y confidencialidad.**

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla (su nombre y teléfono) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán guardados por separado para mantener la confidencialidad de sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas. Sólo el equipo de investigación del IMSS tendrá acceso a su información.

El equipo de investigadores, su médico tratante en el Servicio de Enfermedades Hipertensivas del embarazo y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla no estará vinculada con la información que nos proporcione en los cuestionarios y con los resultados de sus estudios de laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI  
su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso.  
Toda la información será destruida cinco años después de concluir el estudio.

**8. En caso de colección de material biológico:**

\_\_\_\_\_ No autorizo que se me tome la muestra.

\_\_\_\_\_ Si autorizo que se me tome la muestra, sólo para este estudio.

\_\_\_\_\_ Si autorizo que se me tome la muestra, para este estudio y estudios futuros.

**9. Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio**

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 9:00 a 16:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Alfredo Leños Miranda, que es el investigador responsable del estudio, al teléfono: 55 50 64 22, extensión 28003, en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva ubicada en el sexto piso del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” o con el Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga al mismo número de teléfono.

10. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los teléfonos: 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: [conise@cis.go.mx](mailto:conise@cis.go.mx). La Comisión de ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**11. Declaración de consentimiento informado**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

---

Nombre de la participante, Firma y Fecha

---

Nombre del esposo, concubino o pareja de la participante, firma y fecha

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado, Firma y Fecha

**Firma de los testigos**

Mi firma como testigo certifica que la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

---

Nombre del Testigo 1, Firma y Fecha

---

Nombre del Testigo 2, Firma y Fecha

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Anexo 4. Carta de consentimiento informado Estudio Transversal analítico. (Preeclampsia Leve o severa)**

Título del estudio de investigación:

**Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad**

*Investigador Principal: Dr. Alfredo Leños Miranda*

*Investigador colaborador: Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga.*

**Lugar y Fecha:** México DF a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201( ). Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”. IMSS.

**Número de Registro:** R-2013-3606-018 **Estudio con riesgo:** Mínimo

### **1. Propósito del estudio**

La estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, en el Servicio de Enfermedades Hipertensivas del Embarazo y del Servicio de Perinatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

El estudio tiene como propósito evaluar si el uso de algunas pruebas en su sangre sirven para detectar la presencia de una proteína llamada “angiotensina II” (que es una sustancia que sirve para el buen funcionamiento de su riñón y su presión arterial) que puede ayudarnos a saber si los niveles de esta proteína varían entre una mujer embarazada sana (sin preeclampsia) y una mujer embarazada con preeclampsia (ya sea Leve o Severa) como es su caso.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Como ya se lo habrá informado su médico tratante la preeclampsia es una enfermedad grave con aumento de la presión arterial y pérdida de proteínas por la orina.

Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque de acuerdo a su historial médico pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto.

Al igual que usted, alrededor de 29 mujeres embarazadas más serán invitadas a participar en este estudio, todas con preeclampsia leve o severa, y 30 pacientes sin preeclampsia, se le harán una serie de preguntas y se le tomará una muestra de sangre solo en esta ocasión.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

## **2. Procedimientos**

Si usted acepta participar en el estudio ocurrirá lo siguiente:

a) Evaluación clínica. Consiste en la medición de su peso, estatura y le tomaremos su presión arterial. Además le pediremos que responda un cuestionario en el que le preguntaremos sobre: embarazos previos y de su historial médico. Para todo esto nos tardaremos aproximadamente 15 minutos. Además le tomaremos una muestra de sangre. De su expediente clínico obtendremos toda la información clínica de usted hasta este momento.

b) Toma de muestras biológicas. Para poder realizarle la toma de muestra de sangre no es necesario que este en ayuno. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 5 ml de su sangre (1 cucharadita), para realizarle algunos estudios de laboratorio. Nos tardaremos aproximadamente 5 minutos en tomarle la muestra de sangre.

Los estudios de laboratorio que le realizaremos incluyen: la medición de su nivel en sangre de la sustancia llamada Angiotensina II. El propósito de realizarle este estudio de laboratorio es para saber si los niveles de esta sustancia en su sangre varían al compararlos

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI  
con los niveles de la misma sustancia en la sangre de una mujer que no padece preeclampsia.

**3. Posibles riesgos y molestias**

Las molestias o riesgos asociados con los procedimientos de la evaluación clínica (medición de peso, talla y presión arterial) no ocasionan dolor, incomodidad o riesgo alguno.

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia o raramente un moretón que desaparece en menos de una semana.

**4. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio**

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted, ya que solo le haremos una pequeña historia clínica y tomaremos una muestra sangre por esta única ocasión.

No recibirá ningún beneficio al participar en este estudio.

Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la enfermedad, por lo tanto, los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de personas embarazadas que pudieran complicarse con preeclampsia.

**5. Información sobre resultados y alternativas de tratamiento.**

Como es un estudio en el que queremos saber si la sustancia en la sangre que vamos a estudiar varía entre una paciente con preeclampsia como usted y una paciente que no padezca preeclampsia. Los estudios los realizaremos hasta que terminemos de juntar toda la información de las 89 pacientes más que vamos a estudiar, por lo que no podremos darle los resultados de estos estudios.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **6. Participación o retiro**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en el IMSS, y se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Esto es, no afectará su relación con el IMSS y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS.

Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

## **7. Privacidad y confidencialidad.**

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla (su nombre y teléfono) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán guardados por separado para mantener la confidencialidad de sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas. Sólo el equipo de investigación del IMSS tendrá acceso a su información.

El equipo de investigadores, su médico tratante en el Servicio de Enfermedades Hipertensivas del embarazo y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla no estará vinculada con la

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

información que nos proporcione en los cuestionarios y con los resultados de sus estudios de laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida cinco años después de concluir el estudio.

**8. En caso de colección de material biológico:**

\_\_\_\_\_ No autorizo que se me tome la muestra.

\_\_\_\_\_ Si autorizo que se me tome la muestra, sólo para este estudio.

\_\_\_\_\_ Si autorizo que se me tome la muestra, para este estudio y estudios futuros.

**9. Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio**

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 9:00 a 16:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Alfredo Leños Miranda, que es el investigador responsable del estudio, al teléfono: 55 50 64 22, extensión 28003, en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva ubicada en el sexto piso del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” o con el Dra. María Guadalupe Berumen Lechuga al mismo número de teléfono.

**10. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación**

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los teléfonos: 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.go.mx. La Comisión de ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**11. Declaración de consentimiento informado**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

---

Nombre de la participante, Firma y Fecha

---

Nombre del esposo, concubino o pareja de la participante, firma y fecha

**Encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado, Firma y Fecha

**Firma de los testigos**

Mi firma como testigo certifica que la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

---

Nombre del Testigo 1, Firma y Fecha

---

Nombre del Testigo 2, Firma y Fecha

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Anexo 5. Manual de Procedimientos**

### **1. Unidades participantes.**

El protocolo se llevó a cabo en el IMSS, específicamente en la UMAE HGO No.4 Luis Castelazo Ayala, localizada en: Dirección: Río Magdalena #289. Colonia Tizapan San Ángel. CP 01090. Delegación Álvaro Obregón. México, D.F. Teléfono 55 50 64 22.

En la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva. Localizada dentro de la misma unidad en el Sexto piso Sur. Extensión 28003. Esta unidad es exclusiva para investigación, por lo tanto; en esta unidad no se lleva a cabo la atención médica habitual de pacientes de ninguna manera, exclusivamente en el caso de que alguna este participando activamente en algún proyecto de investigación se cita en la misma para la recolección de las variables de interés.

### **Colaboración:**

- Departamento Clínico de Complicaciones Hipertensivas Asociadas al Embarazo. Quinto piso Sur. Extensión 28017. Jefe de departamento clínico Dr. Juan Fernando Romero Arauz.
- Departamento de Consulta externa de CPN y EMI y cuarto piso complicaciones de la segunda mitad del embarazo.
- Departamento de Laboratorio Clínico.
- Departamento de Perinatología.

### **2. Reclutamiento de los sujetos de investigación.**

Los sujetos de investigación fueron reclutados de la siguiente forma:

Los sujetos de investigación fueron detectados por los médicos tratantes o residentes en el departamento Clínico de las Complicaciones Hipertensivas asociadas al embarazo, complicaciones de la segunda mitad del embarazo o consulta externa durante su atención medica habitual, quienes notificaron personalmente o por vía telefónica a los investigadores o bien, durante el pase de visita por parte del tutor y/o la alumna de maestría, Una vez

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

identificados se hizo la invitación a participar en el estudio, en el caso de que se encontrara hospitalizada en su misma cama, caso contrario en un consultorio ex profeso inmediatamente antes o después de su atención médica de control prenatal.

En caso de aceptar participar en el estudio se leyó y firmó la carta de consentimiento informado adecuadamente, se procedió a la realización de interrogatorio directo para la obtención de las variables de interés y se tomó la muestra de sangre por única ocasión en caso de corresponder al estudio transversal.

Si se trató del estudio de casos y controles anidado en una cohorte se obtuvieron de la consulta externa de Control Prenatal o bien; de consultorio de Enfermera materno-Infantil. Es importante resaltar que dado que junto al HGO núm. 4 se encuentra el HGZ núm. 8 el cual carece del servicio de obstetricia toda la población obstétrica adscrita a esa unidad es atendida en la unidad de estudio, si cumplieron criterios de inclusión (12 SDG sin FR para preeclampsia excepto nuliparidad, preeclampsia en embarazo previo y obesidad o sobrepeso) se invitaron a participar en el estudio, una vez aceptada su participación, se llenó y se firmó el consentimiento informado. Por medio de interrogatorio directo se obtuvieron las variables de estudio y se tomó la primera muestra de sangre (la cual fue transportada en una gradilla al sexto piso para su manejo habitual) o bien se cita directamente al alcanzar las 12 SDG al sexto piso, laboratorio G (si por horario no se podía tomar la muestra y ya contaba con 12 SDG acudió al día siguiente en el horario 8-9 am) y se le explicó que las citas subsecuentes serían otorgadas en la unidad de investigación ubicada en el sexto piso sur laboratorio G, se le entrega un carnet especial que contiene la ubicación de la unidad de investigación, teléfonos y responsables de la investigación, al cual se incluyen su nombre, su clave alfanumérica, las fechas de las citas (las cuáles en lo posible coincidieron con su cita a CPN) y se explicó que en cada cita se tomaría somatometría y una nueva toma de muestra sangre (5 ml) para cada cita subsecuente (16,20,24,28, 32 36 SDG o hasta la interrupción de la gestación).

**3. Elegibilidad:**

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

- Solo fueron reclutados aquellos sujetos de investigación que cumplieron todos los requisitos de inclusión especificados en el apartado correspondiente.
- Se estudiaron los expedientes para determinar si cumplían los criterios de selección de acuerdo a los criterios por la ACOG en los casos de preeclampsia leve y severa. Independiente del diagnóstico asentado en el expediente clínico. (es decir, puede contar con diagnóstico de Preeclampsia severa y si de acuerdo a los criterios de la ACOG no corresponde no se incluye al protocolo, lo mismo para preeclampsia leve, o bien para ser consideradas como pacientes sin preeclampsia)

**4. Diseño del muestreo:**

- Se hizo la invitación a todos los sujetos captados consecutivamente en los servicios antes mencionados (muestreo no aleatorio)

**5. Visitas clínicas.**

- **Manejo habitual pacientes con diagnóstico de preeclampsia.**
  - Las pacientes acuden enviadas a C/E de complicaciones hipertensivas del embarazo enviadas de la C/E de CPN de la misma unidad o bien de otras unidades de la delegación DF sur, Querétaro, Morelos, Guerrero y Chiapas.
  - En la consulta de primera vez con duración de 20 minutos se realiza historia clínica, exploración física y obstétrica, se solicitan pruebas de laboratorio incluyendo: BH, QS; PFH, EGO y depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 horas, así como USG obstétrico. Se brindan indicaciones de alarma obstétrica y se da cita libre a urgencias, con cita subsecuente en 2 semanas.
  - En la consulta subsecuente con duración de 15 minutos, se realiza exploración física y obstétrica, se revisan los exámenes de laboratorio y USG y si cuenta con criterios para preeclampsia leve o severa se acenta que

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

continúa manejo y seguimiento en dicho servicio, en caso contrario se envía a servicio de consulta externa de control prenatal habitual.

- Si se concluye preeclampsia leve continua control prenatal externo con seguimiento cada 3-4 semanas hasta las 38 semanas de gestación en cada cita se solicitan: BH, QS; PFH, EGO y depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 horas, en este caso USG obstétrico cada 2 citas, se brindan indicaciones de alarma y cita libre a urgencias. Una vez alcanzadas las 37-38 semanas dependiendo del criterio del obstetra, está indicado la interrupción de la gestación, por lo que se envían al servicio de admisión continua para su internamiento.
  - Si se concluye preeclampsia severa se envía inmediatamente a admisión para su internamiento y hospitalización, control hemodinámico con uso de antihipertensivos y de acuerdo a la edad gestacional(28-33 semanas) para aplicación de esquema de maduración pulmonar fetal, pruebas de bienestar fetal (USG doppler hemodinámico de arteria cerebral media y umbilical, prueba sin estrés). Si una vez realizado todo esto la paciente se encuentra estable puede ser egresada con seguimiento semanal o quincenal por consulta externa. Bajo indicaciones explícitas de alarma obstétrica y cita libre a urgencias en caso de presentar alguna de ellas.
  - Si la paciente continúa inestable hemodinámicamente, hay pruebas de riesgo de pérdida de bienestar fetal, si ya se concluyó el esquema de maduración pulmonar fetal y latencia, o bien; se alcanzan las 34 semanas está indicado la interrupción de la gestación.
- **Visitas en relación al protocolo de investigación.**
    - Si las pacientes pertenecen al estudio transversal no requieren de citas ni visitas de seguimiento, ya sea en su cama o en un consultorio ex profeso es

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

donde se firma el consentimiento informado por ella y su pareja, se realiza el interrogatorio directo y se toma la muestra de sangre.

- Si las pacientes pertenecen al estudio de casos y controles anidado en una cohorte, la primera consulta para su invitación a participar se otorgó en la consulta externa en un consultorio ex profeso.
- Las siguientes consultas fueron mensualmente y coincidieron idealmente con sus citas de control prenatal, su cita no fue mayor a 10 minutos donde se tomó somatometría y muestra de sangre por venopunción a las 16,20, 24, 28, 32 y 36 semanas de gestación, si cursa embarazo normal y las alcanza o hasta la interrupción de la gestación en caso de desarrollar preeclampsia.
- Todo lo anterior realizado por la alumna de maestría o bien, por el tutor.

**6.- Medición de Concentración sérica de Angiotensina II.**

- Durante la primera hora después de tomada la muestra de sangre (en un tubo sin anticoagulante) etiquetado con la clave alfanumérica correspondiente otorgada a cada paciente, se dejó que formará el coagulo por al menos 15 minutos e inmediatamente se centrifugó a 3,000 rpm por 10 minutos a 4° C, después se separará el suero y se colocaran en tubos conteniendo pepstatina A (inhibidor de proteasas) y captopril (inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina) para , vitar su degradación a ang III y la formación de ang II a partir de ang I, una vez realizado esto se colocaron a -80°C para su almacenamiento hasta su análisis, el cual se lleva a cabo una vez completado la muestra (30 pacientes con embarazo normal, 30 con preeclampsia leve y 30 con preeclampsia severa) para el estudio transversal y 60 para el estudio de casos y controles anidado en una cohorte [30 pacientes sanas (sin preeclampsia) y 30 pacientes con preeclampsia].
- En el caso del estudio transversal se analizaron las 90 muestras en un mismo momento y por las mañanas para evitar sesgo por cambio de temperatura ambiental, etc. Cabe mencionar que todas las variables de interés además de guardarse en papel

**“Aplicación de un bioensayo *in vitro* para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

en su correspondiente hoja de recolección de datos se vacían a una libreta de control y el mismo día también se introducen las variables a la base de datos electrónica, la cual no fue modificada, hasta contar con los resultados de la concentración de la ang II medida en ng/ml.

- Para el estudio de casos y controles anidado en una cohorte se analizarán por bloques de 15 casos y 15 controles en un mismo momento y por las mañanas para evitar sesgo por cambio de temperatura ambiental. Cabe mencionar que todas las variables de interés obtenidas por interrogatorio o por exploración física (peso/talla=IMC, TA) además de la hoja de recolección de datos se archivan en un expediente individual correspondiente a cada paciente con su clave alfanumérica, se vacían a una libreta de seguimiento y el mismo día se introducen las variables de interés a la base de datos electrónica, la cual fue analizada hasta contar con los resultados del bioensayo con los niveles de concentración de ang II en ng/ml y se hubieran vaciado en la base de datos. Una vez hecho el análisis estadístico descriptivo se dividieron de acuerdo a los cuartiles a que pertenezcan los valores de concentración de Ang II aquellos que se encuentren entre los cuartiles 2-4 (Q2-4) serán considerados como valores normales y aquellos que se encuentran en el primer cuartil (Q1) se clasificarán como valor bajos.

Cualquier duda sobre el método utilizado pasar la determinación de la concentración de Ang II y del bioensayo *in vitro* utilizado favor de pasar a los anexos siguientes (6-8 descripción del bioensayo, clasificación y tipos de bioensayos y técnica del bioensayo) .

### **7. Control de calidad:**

Para controlar la calidad de las mediciones de la concentración sérica de la Ang II se realizaron pruebas preliminares para la identificación de los coeficientes de variación intra e interensayo, hasta alcanzar valores menores al 10%.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

**UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI**

Las muestras biológicas fueron almacenadas en la red fría en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  localizado en la unidad de investigación la cual se monitorea hasta cada 8 horas y cuenta con un sistema especial de alarma la cual reporta vía electrónica cualquier falla al tutor, quien cuenta hasta con 48 horas siempre y cuando no se abra, sin modificarse la temperatura, en 5 años no ha habido ninguna falla en caso de que la haya se cuenta con otros 2 ultracongeladores que pueden suplir su función.

Para el control de calidad de la variable severidad de la preeclampsia y presencia de preeclampsia los criterios se basaron exclusivamente en los criterios establecidos por la ACOG<sup>1</sup> tanto para preeclampsia leve como preeclampsia severa o con criterios de severidad.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

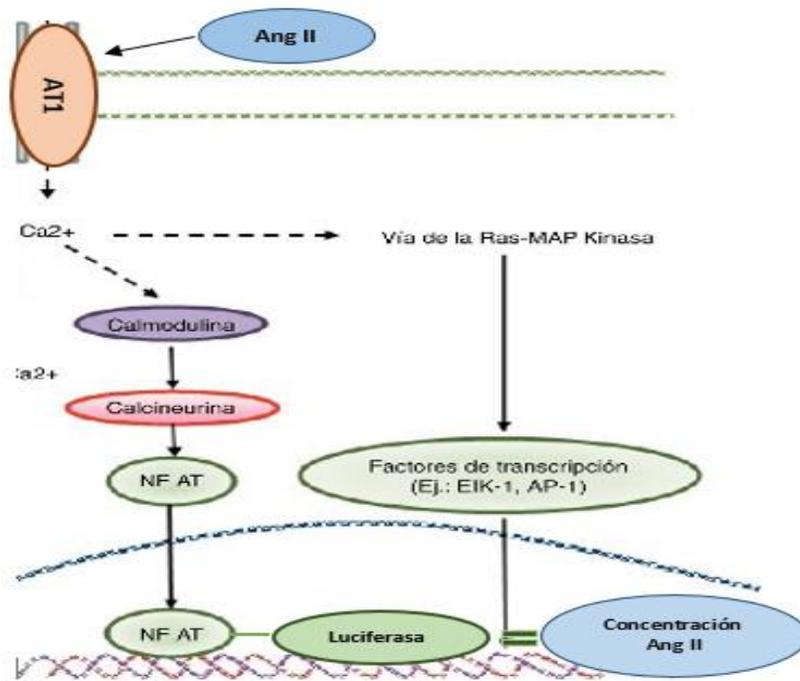
**Anexo 6. Descripción del Bioensayo utilizado en esta investigación.**

El bioensayo de nuestro estudio se llevó a cabo con línea celular hAT1R-NFAT-Luc HEK-293 (human embryonic kidney-293 cells) establemente transfectadas (es decir, que el gen transfectado permanece en el genoma de la célula y su progenie) con el receptor humano AT1 de Ang II (AT1R) y el gen reportero formado por el constructo: NFAT-luciferasa. Esta línea celular responde específicamente y de una manera dosis-dependiente a la Ang II, la cual una vez unida a su receptor AT1R (Acoplado a proteína G), incrementa las concentraciones de Calcio intracitoplasmático y activa la vía de señalización de la calmodulina-calcineurina con activación final del (NFAT) factor nuclear de linfocitos T activado. ( 108 ) quien está ligado al gen de la luciferasa (segundo gen reportero transfectado), una vez activado el constructo NFAT-Luciferasa, se producirá una emisión corta de luz (*luciferasa*) que corresponde al producto final que mediremos como indicador de la unión de ang II al receptor AT1, y que se traduce como concentración (Figura 5).

“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Figura 5. Esquema del Bioensayo in vitro Luciferasa gen-Reportero.



- Imagen tomada y modificada de Oh-hora M y Rao A (100)

**Figura 5.** Modelo del Bioensayo. Células HEK-293 transfectadas con el receptor humano tipo 1 de angiotensina II (AT1) y un gen reportero (NFAT-Luciferasa). El receptor AT1 (acoplado a proteína G) se produce y se expresa constantemente en la superficie celular, en donde se une específicamente a la angiotensina II (Ang II). Tras su unión se libera  $Ca^{++}$  el cual inicia la vía de señalización de la calmodulina-calcineurina, la cual activa al NFAT (factor nuclear de células T activada) y se une al constructo NFAT-Luciferasa, que emitirá un flash de luz y que será medida en unidades relativas de luz y corresponde a la concentración de Ang II.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Anexo 7. Clasificación y tipos de Bioensayos**

La NCBO ( National center of Biomedical Ontology) clasifica los bioensayos de acuerdo al diseño en 8 categorías (metodología para reportar la acción del gen y como esta es convertida en una señal detectable) y a la tecnología de detección usada en el ensayo en 5 categorías.

Por diseño o metodología las siguientes 8 categorías: 1) Reporteros de unión, 2) Reporteros enzimáticos, 3) Reporteros inducibles, 4) Reporteros de morfología, 5) Reporteros viabilidad, 6) Reporteros de redistribución, 7) Reporteros de conformación y 8) Reporteros membrana potencial.

De acuerdo a la tecnología de detección usada los clasifica en 5 categorías: 1) Espectrofotometría, 2) Fluorescencia, 3) Luminiscencia, 4) Tecnología etiqueta libre y 5) microscopía. Otras especificaciones de diseño del ensayo y la tecnología de detección pueden incluir el kit de ensayo o longitud de onda detectada.

De acuerdo a esta clasificación el bioensayo que se utiliza en este proyecto corresponde a un ensayo Reportero de Unión por el diseño y de Luminiscencia por la tecnología de detección. (109) Específicamente los ensayos en luciferasa los clasificaron en cinco sub-categorías: gen reportero, de viabilidad, acoplados a la ATP, luciferina-acoplada, y ensayos de actividad de la enzima luciferasa, este estudio corresponde a técnica luciferasa gen-reportero. (110)

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Anexo 8. Técnica del Bioensayo *in vitro***

### **Medio de Cultivo de Crecimiento**

#### **100 ml DMEM suplementado**

- Suero Bovino fetal 10% = 10 ml
- Penicilina-Estreptomicina = 1 ml
- Gentamicina = 100 mcl
- Fungizona = 200 mcl

Suma = 11.3 ml

Se completan 100 ml (88.7 ml) con DMEM rico en glucosa, marca Sigma-Aldrich. (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose)

**Medio de Cultivo de crecimiento Suplementado con Geneticina** (antibiótico aminoglucósido al cual las células Hek 293 son resistentes)

24 horas después se agrega Geneticina (se encuentra a una concentración 50 mg/ml)

Se requieren 250 mcg/1 ml = 25mg/100 ml = 500 mcg que corresponde a 0.5 ml

### **Descongelamiento y siembra de células hek-293**

Las células hAT1R-NFAT-Luc HEK-293 se encontraban en 4 viales distintos bajo congelación en Nitrógeno Líquido a -170°C (Se toman 2 viales), se retiran del Nitrógeno Líquido y se permite descongelamiento a temperatura ambiente.

Una vez descongelado el vial, en campana estéril se vacía la alícuota de células descongeladas y se pasa al frasco de cultivo de capacidad para 50 ml, se agrega medio de cultivo suplementado con Geneticina aproximadamente 15 ml. (éste proceso corresponde a la primera siembra)

Se coloca el frasco de cultivo en la incubadora a 37°C para su crecimiento en monocapa y se observa diariamente su tasa de crecimiento. Al cuarto día se observó un crecimiento exponencial.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

Cuando se alcanzó una confluencia de aproximadamente un 70-80% (es decir; que la superficie del frasco de cultivo se observa ocupada por las células), se realizó la resiembra o pase celular. Para lo cual se procedió a la disgregación celular o tripsinización.

**Disgregación celular o tripsinización. (campana estéril)**

- Se retira el medio de cultivo de crecimiento (MC)
- Se lava con PBS para eliminar el exceso del MC
- Se agrega tripsina aproximadamente 1ml, se mueve el frasco para que esté en contacto con toda la superficie donde están pegadas las células.
- Se deja reposar aprox. 5 minutos a 37°C en la incubadora
- Ya que están despegadas las células se vacía el contenido en un tubo de 15 o 50 ml (dependiendo de la cantidad de células que se van a resembrar)
- Se lava con medio de crecimiento (sin suplementar con geneticina), con aproximadamente 2 ml, los cuales se añaden al tubo de 15 o 50 ml para su centrifugación
- Se completan entre 10 y 20 ml con MC sin suplementar con geneticina
- Se centrifuga a 1000 RPM por 5-10 min a 25°C
- Se tira el exceso de Medio de crecimiento
- Se agregan 2 ml de medio de crecimiento suplementado y se homogeniza la muestra.

**Conteo Celular**

- De la muestra anterior se toman 10 mcl y se completan 200 mcl con de medio de crecimiento sin suplementar y libre de suero bovino), se homogeniza la muestra y se pone una gota en la cámara de Neubauer.
- Se cuentan las células por cuadrante y se suman, se saca un promedio y se multiplica por 10,000.
- Se multiplica por el factor de dilución en este caso el factor de dilución fue 20 (10-200)
- El resultado corresponde al total de células / 1 ml.
- El resultado se multiplica x 2 para que sea el total de células por muestra (2 ml).

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

**Resiembr o Pase celular**

Para resembrar, del total de células por muestra que se encuentran en 2ml de medio de cultivo, se agrega el equivalente a  $5 \times 10^6$  y se completan 25 a 30 ml con medio de crecimiento suplementado con geneticina, al frasco de cultivo, el cual se cambia aproximadamente cada 3 días.

**Medio de Cultivo para Bioensayo 100 ml**

- 1.- Suero de caballo al 10% (10 ml)
- 2.- Penicilina-Estreptomicina 1 ml
- 3.- Gentamicina 100 mcl
- 4.- Fungizona 200 mcl
- 5.- Se completan 100 ml con DMEM solo (88.7ml)

Nota: medio libre de Geneticina

**Placa de Bioensayo**

De las células tripsinizadas y homogenizadas con medio de cultivo de bioensayo (con suero de caballo), se toma la muestra de acuerdo a la cantidad de células por ml, se saca el equivalente a  $1 \times 10^4$  (10,000) células por pozo x 100 (redondea aunque la placa es de 96 pozos) = 1 millón. Se agregan a un frasco de 100 ml y/o en la caja de la placa para utilizar la pipeta multicanal y se completan 10 ml con medio de cultivo de bioensayo. Y Se agregan 100 mcl por pozo, es decir:

Se siembren  $1 \times 10^4$  células en 10 mcl de medio de bioensayo por pozo por triplicado para establecer coeficiente de variación.

Se dejan a 37°C por 18-24 horas

**Medio de cultivo (depletado de suero) 200 ml**

- 1.- Penicilina-estreptomicina 2 ml

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

2.- Gentamicina 200 mcl

3.-Fungisona 400 mcl

4.- se completan 200 ml con DMEM solo (197.4 ml)

5.- Se separan aprox. 10 ml del mismo en un tubo de 15 y el resto se guarda.

**Muestras Para Agonismo. (Ang II pura 1 mcg/10 mcl)**

1.- Se toman 7 tubos de 1.5 ml y se rotulan con la concentración y que corresponde a Ang II :

Tubo	Concentración	Ang II Pura mcl	DMEM Plain	Vol
1	0	0	100 mcl	100
2	2 mcg/ml	2 mcg AII (20 mcl)	480 mcl	500
3	1 mcg/ml	250 mcl sol previa	250 mcl	500
4	0.1 mcg/ml	30 mcl sol previa	270 mcl	300
5	0.01 mcg/ml	30 mcl sol previa	270 mcl	300
6	0.001 mcg/ml	30 mcl sol previa	270 mcl	300
7	0.0001 mcg/ml	30 mcl sol previa	270 mcl	300

- Mezclar en vortex antes de cada dilución.

**Preparar Stock Ang II de 2 ml a 2 mcg/ml**

Para 2 mcg de Ang II en 2 ml (20 mcl ang II pura + 1980 mcl de DMEM plain)...concentración final por pozo será 1 mcg/ml, porque se diluye en los otros 100 mcl de la placa quedando un volumen final de 200 mcl por pozo.

**Muestras para Antagonismo (telmisartán 1 mcg/3 mcl)**

1.- Se toman 7 tubos de 1.5 ml y se rotulan con la concentración y que corresponde a Telmisartán:

Tubo	Concentración	Telmisartán	Stock Ang II	Volumen
------	---------------	-------------	--------------	---------

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

1	0	0	100 mcl Ang II	100
2	2 mcg/ml + Ang II 1 mcg/ml (*)	2 µg Telmisartán (6 mcl)	494 mcl	500
3	1 mcg/ml + (*)	250 mcl sol previa	250 mcl	500
4	0.1 mcg/ml+(*)	30 mcl sol previa	270 mcl	300
5	0.01 mcg/ml+(*)	30 mcl sol previa	270 mcl	300
6	0.001 mcg/ml+(*)	30 mcl sol previa	270 mcl	300
7	0.0001 mcg/ml+(*)	30 mcl sol previa	270 mcl	300

1.- Se agregan 100 mcl de DMEM plain en los primeros 2 pozos que corresponde a 0 de ang II para llevar a 200 mcl final por pozo (tubo 1).

2.- Se ponen 100 mcl de cada tubo de Ang II por pozo en duplicado para establecer coeficiente de variación de la curva de Agonismo. En total 12 muestras + el cero corresponden a 14 muestras.

3.- En los siguientes 2 pozos se agregan 100 mcl del Stock de Ang II 2 mcg/ml para quedar a una concentración fija de 1mcg/ml de ang II que corresponderá al 0 de Telmisartán.

4.- Se ponen 100 mcl de cada tubo de Telmisartán por pozo en pares para establecer coeficiente de variación de la curva de Antagonismo. En total 12 muestras + el cero corresponden a 14 muestras.

5.- En los siguientes pozos se agregarán las muestras en total de 4 pozos por muestra: que serán también por pares, en los 2 primeros pozos se agregan 50 mcl de DMEM plain + 50 mcl de muestra (200 mcl), en los siguientes 2 pozos se agregan 50 mcl de Telmisartán + 50 mcl de la misma muestra (200 mcl)... Con el fin de observar la cantidad de ang II que contiene la muestra y que efectivamente se antagoniza con la acción del telmisartán.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

6. Se deja incubar la placa a 37°C por 18-24 hrs.

**Preparar Stock Telmisartán de 1.5 ml a 4 mcg/ml**

1. Se toman 18 mcl de Telmisartán (1 mcg/3mcl) + 1484 mcl de DMEM Plain en 1 tubo de 1.5 mcl. Quedando finalmente 6mcg/1.5 ml. De este stock se toman los 50 mcl para antagonizar las muestras.

\*Todos los procesos previamente descritos se realizan en campana estéril.

**Para la Lectura final...**

1. En el laboratorio, sin necesidad de campana estéril
2. Se aspira el medio de cultivo gentilmente de cada pozo
3. Se lisan las células con 25 mcl de PBL por pozo durante 15 minutos y se coloca en el rotador.
4. Se rotulan la cantidad de tubos necesarios de acuerdo a las placas realizadas
5. Se agregan 20 mcl de la muestra de lisado celular a cada tubo
6. Se agregan 10 mcl del sustrato de Luciferasa a cada muestra
7. Inmediatamente se realiza la lectura en el luminómetro.
8. Los resultados obtenidos son expresados en unidades relativas de luz (URL).

**Determinación de concentración de Ang II.**

1. Se hace una curva de estándares con un valor conocido de concentración de Ang II en mcg/ml en cada experimento.
2. Cada valor conocido tendrá una cantidad de luciferasa expresada en URL, posteriormente se hace una conversión en los valores conocidos de mcg/ml a ng/ml y a partir de estos estándares y de acuerdo a la cantidad de URL en los desconocidos se determinó la concentración de Ang II en ng/ml.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

## **Referencias Bibliográficas.**

---

1 Hypertension in pregnancy. The American College of obstetricians and Gynecologist. 2013;1:1-99. <http://www.acog.org/goto/AnnouncementHypertensiveDisorders> última visita 21.01.2015.

2 Leños-Miranda A, Márquez-Acosta J, Romero-Arauz F, Cárdenas- Mondragón MG, Rivera-Leños R, Isordia-Salas I, et al. Protein:creatinine ratio in random urine samples is a reliable marker of increased 24-h protein excretion in hospitalized women with hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Chem* 2007; 53:1623–1628.

3 Leños-Miranda, Campos-Galicia I, Isordia-Salas I, Rivera-Leños R, Romero-Arauz JF, Ayala-Méndez JA, Ulloa-Aguirre A. Changes in circulating concentrations of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor measured by automated electrochemiluminescence immunoassays methods are predictors of preeclampsia. *J Hypertens* 2012; 30:2173–2181.

4 Gilbert JS, Ryan MJ, La Marca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294: H541–H550.

5 Estibalitz Laresgoiti-Servitje and Nardhy Gomez-Lopez. The Pathophysiology of Preeclampsia involves Altered Levels of Angiogenic Factors Promoted by Hypoxia and Autoantibody-Mediated Mechanisms. *Biol reprod* 2012; 87(2):36, 1–7.

6 Ileki JV, Reddy UM, Roberts JM. Preeclampsia: a pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Reprod Sci* 2007; 14:508–523.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

7 Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systemic review. *Lancet* 2006;367:1066–1074.

8 Ru Iacute Z-Rosas RA, Cruz-Cruz P. [Causes of maternal mortality in the Instituto Mexicano del Seguro Social, period 2009-2012]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014 Jul-Aug;52(4):388-96.

9 Velasco-Murillo V. Mortalidad materna por preeclampsia-eclampsia en el Instituto Mexicano del Seguro Social 1987-1996. *Rev Med IMSS* 1997;35:451-56.

10 Velasco-Murillo V, Navarrete-Hernández E. Mortalidad materna en el IMSS: un análisis desde la perspectiva de la morbilidad y la letalidad. *Cir Ciruj* 2006;74:21-26.

11 <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/madre0.pdf>.

12 Instituto Mexicano del Seguro Social. UMAE Hospital Luis Castelazo Ayala. [Online]; 2013 [cited 2013 11 12. Available from: <http://edumed.imss.gob.mx/gineco4>.

13 Elena Scazzocchio and Francesc Figueras. Contemporary prediction of Preeclampsia, *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011;23:65–71.

14 Sophie Grand’Maison, MD, Nadine Sauve’, MD, Weber F, Dagenais M, Durand M, Mahone M. Hepatic Rupture in Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets Syndrome. *Obstet Gynecol* 2012;119:617–25.

15 Baja M. Sibai. Diagnosis, Controversies, and Management of the Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count. *ACOG* 2004;103:981-91.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

16 Camille E. Powe, AB; Richard J. Levine, MD, MPH; S. Ananth Karumanchi, MD. Preeclampsia, a Disease of the Maternal Endothelium. The Role of Antiangiogenic Factors and Implications for Later Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2011;123:2856-2869.

17 Werner EF, Lockwood ChJ. Thrombophilias and stillbirth. *Clin ob gyn* 2010;53: 617-27.

18 Johannes Dietl. Maternal Obesity and complication during pregnancy. *J. Perinat. Med.* 2005;33:100–105.

19 P de Graaf J, Steeger E A.P., Bonsel G J. Inequalities in perinatal and maternal health. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013;25:98–108.

20 Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, and cols. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British J Haematol*, 2005;132: 171–196.

21 Sykes SD, Pringle KG, Zhou A. Fetal sex and the circulating renin-angiotensin system during early gestation in women who later develop preeclampsia or gestational hypertension. *J Hum Hypertens*. 2013 Jun 20. doi: 10.1038/jhh.2013.51.

22 Sykes SD, Pringle KG, Zhou A. The balance between human maternal plasma angiotensin II and angiotensin 1-7 levels in early gestation pregnancy is influenced by fetal sex. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2013 Feb 25.

23 Susan R Khan, Nisha D, Almeida ND, McNamara H, Koren G, Genest J Jr, Dahhou M, Platt RW, Kramer MS. Smoking in preeclamptic women is associated with higher birthweight for gestational age and lower soluble fms-like tyrosine kinase-1 levels: a nested case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2011;11:91-101.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

24 Shinjo A, Ventura W, Koide K, Hori K, Yotsumoto J, Matsuoka R, Ichizuka K, Sekizawa A, Maternal Smoking and Placental Expression of a Panel of Genes Related to Angiogenesis and Oxidative Stress in Early Pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2014;35:289-295

25 Jin Hee Kanga, Haengseok Songb and cols. Preeclampsia leads to dysregulation of various signaling pathways in placenta. *J Hypertens* 2011;29:928–936.

26 Camille E.P, Richard J.L, Karumanchi SA. Preeclampsia, a Disease of the Maternal Endothelium. The Role of Antiangiogenic Factors and Implications for Later Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2011;123:2856-2869.

27 Dahlia Raymond, Erika Peterson. A Critical Review of Early-Onset and Late-Onset Preeclampsia. *Ob gyn survey* 2011;66:497-506.

28 Chaiworapongsa, Romero R, Korzeniewski SJ, Cortez JM, Pappas A, Tarca AL, and cols. “Plasma Concentrations of Angiogenic/Anti-Angiogenic Factors Have Prognostic Value in Women Presenting With Suspected Preeclampsia to the Obstetrical Triage Area: A Prospective Study.” *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Jan;27(2):132-44

29 Álvarez-Fernández I, Prieto B, New biomarkers in diagnosis of early onset preeclampsia and imminent delivery prognosis. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Aug;52(8):1159-68.

30 Hertig A, Berkane N, Lefevre G, Toumi K, Marti HP, Capeau J, et al. Maternal serum Sflt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin Chem*. 2004;50:1702-3.

31 Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, et al. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Aug;10(8):466-80.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

32 Sahay AS, Patil VV, Sundrani DP<sup>1</sup>, Joshi AA<sup>1</sup> A longitudinal study of circulating angiogenic and antiangiogenic factors and AT1-AA levels in preeclampsia. *Hypertens Res.* 2014 Aug;37(8):753-8.

33 Kar M. Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 2014;8(4):BE01-BE04.

34 Yang J, Shang J, Zhang S, Li H, Liu H. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia: genetic polymorphisms and microRNA. *J Mol Endocrinol.* 2013 Mar 18;50(2):R53-66.

35 Kenny LC, Black MA, Poston L, Taylor R, Myers JE. Early Pregnancy Prediction of Preeclampsia in Nulliparous Women, Combining Clinical Risk and Biomarkers: The Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) International Cohort Study. *Hypertension.* 2014 Sep;64(3):644-52.

36 Poon LC, Nicolaides KH. Early prediction of preeclampsia. *Obstet Gynecol Int.* 2014;2014:297397. doi: 10.1155/2014/297397. Epub 2014 Jul 17.

37 Cooper, A.C., Robinson, G., Vinson, G.P., Cheung, W.T. and Broughton-Pipkin, F. The localization and expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 1998; 20: 467-474.

38 Oparil S, Weber AM. Hipertensión «El Riñón, de Brenner y Rector». Ed: McGraw-Hill Interamericana año 2004;1-4:77-94

39 Johnston CI. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs* 1990; 39: 21-31.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

40 Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium diverse signals and effects. *Hypertension* 2005; 45: 163-169.

41 Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Research*. 2001; 11: 165–180.

42 Anton L, Merrill DC, Neves LA. The uterine placental bed Renin-Angiotensin System in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrinology* 2009 sep; 150(9):4316-25.

43 Anton L, Merrill DC, Neves LA. Activation of local chorionic villi angiotensin II level but not angiotensin (1-7) in preeclampsia. *Hypertension* 2008 Apr; 51(4):1066-72.

44 Jiangming Luo, Nan Pan, Dart R, Tewksbury D. Expression of the Renin-Angiotensin System in a Human Placental Cell Line. *Clin med res* 2013;11(1): 1-6.

45 Mistry HD, Kurlak LO, Broughton pipkin F. The placental renin-angiotensin system and oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 2013;34(2):182-6.

46 Anton Lauren and K. Bridget Brosnihan. Systemic and uteroplacental renin–angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Therap Adv in Card Dis* 2008;2: 349–362.

47 Baker, P.N., Pipkin, F.B. and Symonds, E.M. Platelet angiotensin II binding and plasma renin concentration, plasma renin substrate and plasma angiotensin II in human pregnancy. *Clin Sci* 1990;79:403–408.

48 Brown, M.A., Wang, J. and Whitworth, J.A. The renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens* 1997;19:713–726.

49 Salustiano EM, Correia DP J, Provost K, Ruano N, Zugaib M. Maternal Serum Hormonal Factors in the Pathogenesis of Preeclampsia. *ob gyn survey* 2013;68:141-150.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

50 Mahendru AA, Everett TR, Wilkinson IB, Liss CC, McEniery CM. Maternal cardiovascular changes from pre-pregnancy to very early pregnancy. *J hypertension* 2012;30:2168-72.

51 La Marca B, Gilbert J, Granger JP. Recent Progress Toward the Understanding of the Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia. *Hypertension*. 2008;51:982-988.

52 La Marca B, Parrish MR, Wallace K. Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type I Receptor Cause Pathophysiologic Characteristics of Preeclampsia. *Gend Med*. 2012;9:139–146.

53 LaMarca B, Wallace K, Granger J. Role of angiotensin ii type i receptor agonistic autoantibodies (at1-aa) in preeclampsia. *Current opinion in pharmacology*. 11:175–179.

54 Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Müller DN, Krause M, Dudenhausen J, Haller H, Luft FC. Agonistic antibodies directed at the angiotensin II, AT1 receptor in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*. 2006 Feb;13(2):79-86.

55 Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2003; 10:82–93.

56 Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nature medicine*. 2008; 14:855–862.

57 Herse Florian et al. Dysregulation of the Circulating and Tissue-Based Renin-Angiotensin System in preeclampsia. *Hypertension*. 2007;49:604-611

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

58 Dragun D, Catar R, Kusch A, Heidecke H, Philippe A. Non-hla-antibodies targeting angiotensin type 1 receptor and antibody mediated rejection. *Human immunology*. 2012; 73:1282–1286.

59 Riemekasten G, Philippe A, Nather M, Slowinski T, Muller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirjak L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70:530–536.

60 Walther T1, Wallukat G, Jank A, Bartel S, Schultheiss HP, Faber R, Stepan H. Angiotensin II type 1 receptor agonistic antibodies reflect fundamental alterations in the uteroplacental vasculature. *Hypertension*. 2005 Dec;46(6):1275-9.

61 Huber Carl A et al. Agonistic Angiotensin II Type 1 Receptor Autoantibodies in Postpartum Women With a History of Preeclampsia. *Hypertension*. 2007;49:612-617

62 H. Stepan, R. Faber, N. Wessel, G. Wallukat, H.-P. Schultheiss, and T. Walther. Relation between Circulating Angiotensin II Type 1 Receptor Agonistic Autoantibodies and Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 in the Pathogenesis of Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91: 2424–2427.

63 Leños-Miranda A, Campos-Galicia I, Alvarez-Jiménez G, Isordia-Salas I, Rivera-Leños R, Ulloa-Aguirre A. Stimulating autoantibodies against the angiotensin II type 1 receptor are not associated with preeclampsia in Mexican–Mestizo women. *J Hypertens* 2010;28:834–841.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

64 Herse F, Verlohren S, Wenzel K, Pape J, Muller DN, Modrow S, et al. Prevalence of agonistic autoantibodies against the angiotensin II type 1 receptor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 in a gestational age-matched case study. *Hypertension* 2009; 53:393–398.

65 Sahay AS, Patil VV, Sundrani DP, Joshi AA, Wagh GN, Gupte SA, Joshi SR. A longitudinal study of circulating angiogenic and antiangiogenic factors and AT1-AA levels in preeclampsia. *Hypertens Res.* 2014 Aug;37(8):753-8.

66 Kobayashi Y, Yamamoto T, Chishima F, Takahashi H, Suzuki M. Autoantibodies isolated from patients with preeclampsia induce soluble endoglin production from trophoblast cells via interactions with angiotensin II type 1 receptor. *Am J Reprod Immunol.* 2015 Apr; 73(4):285-91. Epub 2014 Nov 7.

67 Koabayshi Y Sr, Yamamoto T Sr, Chishima F Sr, Murase T Sr, Azuma H Sr, Nakamura A Sr, Takahashi H Sr. [26-OR]: The effect of IgG (AT1-AA) from preeclampsia sera on the production of sEng and various kinds of cytokines from human primary trophoblast cells. *Pregnancy Hypertens.* 2015 Jan;5(1):13. doi: 10.1016/j.preghy.2014.10.030. Epub 2015 Feb 23.

68 Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G.. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol Rev* 2009;89:1177–1215.

69 Yamaleyeva LM, Merrill DC, Ebert TJ, Smith TL, Mertz HL, Brosnihan KB. Hemodynamic responses to angiotensin-(1-7) in women in their third trimester of pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 2014 Nov; 33(4):375-88.

70 Chaszczewska-Markowska M, Sagan M, Bogunia-Kubik K. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) - physiology and molecular mechanisms of functioning. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016 Sep 13;70(0):917-927.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

71 Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol.* 2013 Jan 18;216(2):R1-R17.

72 Yamaleyeva LM, Neves LA, Coveleskie K, Diz DI, Gallagher PE, Brosnihan KB. AT1, AT2, and AT (1-7) receptor expression in the uteroplacental unit of normotensive and hypertensive rats during early and late pregnancy. *Placenta.* 2013 Jun; 34(6):497-502.

73 Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306:R91–R101

74 Velloso EP<sup>1</sup>, Vieira R, Cabral AC, Kalapothakis E, Santos RA.. Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin converting enzyme deletion/deletion genotype. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(4) :583-590.

75 Brown MA, Zammit VC, Mitar DA, Whitworth JA. Renin-aldosterone relationships in pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1992; 5:366–371.

76 Symonds EM, Broughton Pipkin F, Craven DJ. Changes in the renin-angiotensin system in primigravidae with hypertensive disease of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82:643–650.

77 Gant NF, Daley GL, Chand S, et al. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973; 52:2682–268.

78 Hladunewich MA, Kingdom J, Odutayo A, Burns K, Lai V, O'Brien T, Gandhi S, Zimpelmann J, Kiss A, Miller J, Cherney D. Postpartum assessment of the renin angiotensin system in women with previous severe, early-onset preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Nov;96(11):3517-24.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

79 Verdonk K, Visser W2, Van Den Meiracker AH1, Danser AH1. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clin Sci (Lond)*. 2014 Apr;126(8):537-44.

80 Laskowska M, Leszczyńska-Gorzela B, Laskowska K, Oleszczuk J. Evaluation of the renin-angiotensin-aldosterone system in pregnancy complicated by preeclampsia with and without intrauterine growth retardation. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 2004;59:451–456

81 Baker PN, Pipkin FB, Symonds EM. Platelet angiotensin II binding and plasma renin concentration, plasma renin substrate and plasma angiotensin II in human pregnancy. *Clin Sci* 1990;79:403–408.

82 Massani ZM, Sanguinetti R, Gallegos R, Raimondi D. Angiotensin blood levels in normal and toxemic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1967;99:313–317.

83 Gordon RD, Symonds EM, Wilmshurst EG, Pawsey CGK. Plasma renin activity, plasma angiotensin and plasma and urinary electrolytes in normal and toxemic pregnancy, including a prospective study. *Clin Sci Mol Med* 1973;45:115-127.

84 Weir RJ, Fraser R, Lever AF, Morton JJ, Brown JJ, Kraszewski A, et al. Plasma renin, renin substrate, angiotensin II, and aldosterone in hypertensive disease of pregnancy. *Lancet* 1973;I:291–294.

85 Beilin LJ, Deacon J, Michael CA, Vandongen R, Lalor CM, Barden AE, et al. Diurnal rhythms of blood pressure, plasma renin activity, angiotensin II and catecholamines in normotensive and hypertensive pregnancies. *Clin Exp Hypertens [B]* 1983;B2:271–293.

86 Hanssens M, Keirse MJNC, Spitz B, Van Assche FA. Angiotensin II levels in hypertensive and normotensive pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:155–161.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II  
como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

87 Furuhashi N, Tsujiei M, Kimura H, Yajima A, Nagae H, Kimura C. Maternal and fetal atrial natriuretic peptide levels, maternal plasma renin activity, angiotensin II, prostacyclin and thromboxane A2 levels in normal and preeclamptic pregnancies. *Tohoku J Exp Med.* 1991 Oct;165(2):79-86.

88 Langer B, Grima M, Coquard C, Bader AM, Schlaeder G, Imbs JL. Plasma Active Renin, Angiotensin I, and Angiotensin II During Pregnancy and in Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998;91:196 –202.

89 Irani Roxana and Xia Yang. Renin Angiotensin Signaling in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011;31:47-58.

90 Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine.* 2002 Aug;18(3):239-45.

91 Guía de práctica clínica para el control prenatal con enfoque de riesgo. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-028-08.

92 Glosario de términos de demografía y estadísticas vitales. ING Chile 2010.

93 [www.imss.gob.mx/salud-en-linea/calculaimc](http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/calculaimc)

94 Drogas. Secretaría General de Sanidad y Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo. Gobierno de España. 2008.

95 Diagnóstico y tratamiento del aborto espontáneo y manejo inicial de aborto recurrente. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-088-08.

96 Realización de operación Cesárea. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-088-08.

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

- 97 Diagnóstico y tratamiento de la muerte fetal. México, secretaría de Salud. 2010
- 98 Couto Núñez, D., Nápoles Méndez, D., & Montes de Oca Santiago, P. Repercusión del parto pretérmino en la morbilidad y mortalidad perinatales. *Medisan*, 2014; 18(6), 841-847.
- 99 Stirnemann JJ, Benoist G, Salomon LJ, Bernard JP, Ville Y. Optimal risk assessment of small-for-gestational-age fetuses using 31-34-week biometry in a low-risk population. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Mar; 43(3):311-6. doi: 10.1002/uog.13288. Epub 2014 Feb 12.
- 100 Deshpande SN, van Asselt AD, Tomini F, Armstrong N, Allen A, Noake C, Khan K, Severens JL, Kleijnen J, Westwood ME. Rapid fetal fibronectin testing to predict preterm birth in women with symptoms of premature labour: a systematic review and cost analysis. *Health Technol Assess*. 2013 Sep; 17(40):1-138. doi: 10.3310/hta17400.
- 101 S. Rellan Rodríguez, C. Garcia de Ribera y M. Paz Aragón Garcia. El recién nacido prematuro. *Protocolos diagnóstico terapéuticos de la Sociedad española de pediatría* 2008.
- 102 Saxena AR, Karumanchi SA, Brown NJ, Royle CM, McElrath TF, Seely EW. Increased sensitivity to angiotensin II is present postpartum in women with a history of hypertensive pregnancy. *Hypertension* 2010;55:1239–1245
- 103 AbdAlla S, Lother H, el Massiery A, Quitterer U. Increased At1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 2001;7:1003–1009
- 104 Mishra N, Nugent WH, Mahavadi S, Walsh SW. Mechanisms of enhanced vascular reactivity in preeclampsia. *Hypertension* 2011;58:867–873

**“Aplicación de un bioensayo in vitro para determinar la concentración sérica de la angiotensina II como predictor del desarrollo de preeclampsia y su severidad”**

UNAM/Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado/PMDCMOS/Sede IMSS/CMN SXXI

---

105 Burke SD, Zsengellér ZK, Khankin EV, et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia *J Clin Invest* 2016;126:2561–2574

106 Cunningham MW Jr, Williams JM, Amaral L, et al. Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type 1 Receptor Enhance Angiotensin II-Induced Renal Vascular Sensitivity and Reduce Renal Function During Pregnancy. *Hypertension*. 2016;68:1308 – 1313

107 Aggarwal S, Sunderland N, Thornton C, Xu B, Hennessy A, Makris A. A longitudinal analysis of angiotensin II type 1 receptor antibody and angiogenic markers in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2016;S0002-9378:30923-1

108 Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20:250-8.

109 Visser UI, Abeyruwan S, Vempati U, Smith RP, Lemmon V, Schürer SC. BioAssay Ontology (BAO): a semantic description of bioassays and high-throughput screening results. *BMC Bioinformatics*. 2011 Jun 24; 12:257.

110 Schürer SC1, Vempati U, Smith R, Southern M, Lemmon V. BioAssay ontology annotations facilitate cross-analysis of diverse high-throughput screening data sets. *J Biomol Screen*. 2011 Apr;16 (4):415-26.