Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
“Isidro Espinosa de los Reyes”

Asociación de daño al ADN y polimorfismos genéticos relacionados a estrés oxidativo con el riesgo de preeclampsia en población mexicana.

TESIS
Que para obtener el título de:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:
Dra. Linda Edith Sánchez Zelayeta

Dr. Norberto Reyes Paredes
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN GINECOLOGÍA

Dra. Sonia Nava Salazar
DIRECTORA DE TESIS

CIUDAD DE MÉXICO 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorización de Tesis:

Asociación de daño al ADN y polimorfismos genéticos relacionados a estrés oxidativo con el riesgo de preeclampsia en población mexicana.

Dra. Viridiana Górbea Chávez
Directora de Educación en Ciencias de la Salud
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

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

Dra. Sonia Nava Salazar
Director de Tesis y Asesor Metodológico
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

Agradecimientos y dedicatoria

A mis papás, hermana y novio que siempre me apoyan y me aman incondicionalmente.

Le doy las gracias a mi tutora por su tiempo, paciencia y enseñanzas.

“Cada mañana volvemos a nacer… lo que hacemos hoy es lo que realmente importa”
Siddharta Gautama

Tabla de Contenidos

	Página
Portada	1
Autorización de tesis	2
Agradecimientos y dedicatoria	3
Tabla de contenido	4
Resumen	5
Planteamiento del problema	6
Marco teórico • Definición y epidemiología de la preeclampsia • Fisiopatología • Predicción de preeclampsia • Factores genéticos en la preeclampsia • Pruebas de Genotoxicidad: Ensayo cometa y Ensayo de micronúcleos	6
Objetivos • Generales • Específicos	18
Hipótesis	18
Justificación	19
Material y métodos • Características del estudio • Variables dependientes • Variables independientes • Criterios de selección de casos y controles • Universo de la muestra • Clasificación de la enfermedad • Tamaño de la muestra • Procesos técnicos de laboratorio • Análisis estadístico • Aspectos éticos	20
Resultados	24
Conclusiones	28
Referencias bibliográficas	30

Resumen

Introducción. La preeclampsia es una enfermedad cuyos mecanismos de patogenicidad no están del todo definidos y forma parte de las principales causas morbimortalidad perinatal entidades a nivel mundial; se ha dedicado un gran esfuerzo a la identificación de factores demográficos, análisis bioquímicos, análisis genéticos o hallazgos biofísicos con la finalidad de poder predecir en una etapa temprana del embarazo el posterior desarrollo de preeclampsia y poder ofrecer vigilancia y manejo oportuno en aquellas pacientes con un mayor riesgo de desarrollar esta patología. Dentro de la fisiopatología de la enfermedad la isquemia placentaria es un evento característico el cual se ha asociado a un incremento en los procesos de estrés oxidativo y por lo tanto de especies reactivas de oxígeno (EROs). Entre los blancos principales de acción de EROs está el ADN, por lo que el **objetivo** fue evaluar el daño al ADN y su relación con la frecuencia de los polimorfismos de los genes *NOS2A* y *XRCC1* en binomios madres – recién nacidos con embarazo normal y con diagnóstico de preeclampsia. **Métodos.** Se realizó un estudio analítico, observacional de casos y controles. Se genotipificaron los polimorfismos: Arg194Trp, Arg280His y Arg399Gln del gen *XRCC1* y los polimorfirmos G300A y G274T del gen *NOSA* con sondas TaqMan. El daño al ADN se evaluó con la técnica de micronúcleos y ensayo cometa. **Resultados.** Se incluyeron 135 mujeres con embarazo normal y 190 de mujeres con preeclampsia, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de los polimorfismos. Daño al ADN: se evaluaron 24 mujeres sanas, 29 mujeres con preeclampsia, 29 recién nacidos de mujeres mujeres sanas y 32 recién nacidos de mujeres con preeclampsia. Se encontró diferencia significativa en la frecuencia de micronúcleos en los recién nacidos, siendo mayor en los recién nacidos de mujeres con preeclampsia en comparación con los RN de las mujeres sanas (2.94 ± 1.64 y 2.12± 1.28). **Conclusión.** Los polimorfismos analizados no están asociados con el desarrollo de preeclampsia en población mexicana. Los recién nacidos de mujeres con preeclampsia tienen una mayor frecuencia de micronúcleos en comparación con los de mujeres con embarazo normal.

Planteamiento del problema

Los estados hipertensivos del embarazo siguen siendo un problema de salud importante a nivel mundial para las mujeres y sus infantes, forman parte de los tres principales factores causales de morbilidad y mortalidad materna y/o fetal, aunado a sus implicaciones económicas para el sistema de salud como para la familias afectadas.

Los mecanismos de patogénesis de preeclampsia aún persisten no del todo claros y las opciones de tratamiento son muy limitadas. Uno de los grandes retos en la atención de la mujer así como en los avances de la medicina es idear áreas de oportunidad buscando métodos de detección predictivos que apoyen al personal médico a detectar oportunamente mujeres con riesgo de presentar preeclampsia y por ende iniciar estrategias profilácticas o en su defecto detección y tratamiento oportuno de la enfermedad que conlleve a mejorar la toma de decisiones para el momento de la interrupción del embarazo.

La medicina molecular hoy en día tiene un gran auge y aportación para la investigación clínica, principalmente en el área de búsqueda de marcadores de predicción, diagnóstico y pronostico de una enfermedad. En el caso de la preeclampsia la búsqueda de marcadores genéticos, específicamente SNP (por sus siglas en inglés, single nucleotide polymorphism) de genes involucrados a esta patología, ha cobrado gran interés, sin embargo debido a la variabilidad genética de cada población, estos estudios son poco consistente por lo que es importante caracterizar nuestra población.

Marco teórico

Definición y epidemiología de la preeclampsia

Los estados hipertensivos del embarazo son responsables de aproximadamente 60,000 muertes maternas a nivel mundial anualmente. La preeclampsia es un desorden caracterizado por placentación anormal con subsecuente inflamación materna y respuesta vascular y es una de las mayores causas de nacimientos pretérminos iatrógenos.[6] Es uno de los tres principales factores causales de morbilidad y mortalidad materna y fetal, así mismo tiene implicaciones económicas para el sistema de salud como

para las familias afectadas. [3,6] Existe mayor riesgo de morbimortalidad materno-fetal si se presenta tempranamente. [5]

La prevalencia a nivel mundial varía entre el 5 y 10% de los embarazos afectando un total aproximado de 8.5 millones de mujeres alrededor del mundo. [2,5] Se estima cerca del 18% de muertes maternas secundarias a preeclampsia y hasta un 40% de la mortalidad materna. [2,5] En México durante el 2017 la preeclampsia representó la segunda causa de mortalidad con un 65.21%.[4] A pesar de que algunos factores dietéticos, ambientales y genéticos han sido identificados, su mecanismo aun no está completamente elucidado; de ahí que la prevención y el diagnóstico temprano, sigue siendo un gran reto.[14,21]

La preeclampsia es una enfermedad específicamente del embarazo, de acuerdo a la Sociedad Internacional del Estudio de Hipertensión en el Embarazo (por sus siglas en inglés, ISSHP) la preeclampsia se define como hipertensión de novo de que consiste en la presencia de presión arterial sistólica ≥140 mmHg y/o una presión arterial diastólica ≥90 mmHg medida en dos ocasiones al menos con 4 horas de diferencia entre ellas después de las 20 semanas de gestación y la presencia de proteinuria ≥300 mg/24 horas o una relación proteínas urinarias/creatinina urinaria ≥0.3 tomando en cuenta que ésta no es esencial para el diagnóstico, carece de un valor predictivo y no se correlaciona con la severidad de la enfermedad. El Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG) recientemente, ha ampliado la definición de preeclampsia ya que en caso de no presentar proteinuria para diagnóstico de preeclampsia se debe presentar alguno de los siguientes: [1,13]

- Trombocitopenia (<100.000/microlitro plaquetas)
- Falla en la función hepática ya sea por:
  - La elevación anormal de transaminasas (aspartato transaminasa y/o alanina aminotransferasa) dos veces su valor normal
  - Dolor persistente en cuadrante superior derecho y/o epigastralgia que no responde a medicamentos y/o que no corresponde a otros diagnósticos
- Edema pulmonar
- Insuficiencia renal de nueva aparición (creatinina sérica ≥1.1 mg/dl o el doble en ausencia de otra enfermedad renal)
- Alteraciones cerebrales o visuales.

Con base en la presentación de los síntomas y la severidad de las cifras tensionales la preeclampsia se puede clasificar como sin datos de severidad o con datos de severidad. La preeclampsia por sí sola así como una preeclampsia sobreagregada a una hipertensión arterial sistémica crónica presenta riesgos elevados para el binomio. [1,13]

Existe una subclasificación basada en el momento en que se presenta la sintomatología de preeclampsia, antes de las 34 semanas se nombra como de inicio temprano y presenta desenlaces más serios. El posterior a las 34 semanas se considera de inicio tardío. Generalmente la de inicio temprano se asocia a una patología placentaria mientras que la de inicio tardío depende más de factores maternos constitucionales (diabetes, obesidad, alteraciones en la coagulación, enfermedades crónico degenerativas como renales o reumatoideas). [6, 21]

Existe evidencia con respecto al impacto de la enfermedad hipertensiva del embarazo en la futura enfermedad cardiovascular materna e infantil. Hablando de la madre se ha documentado desde un riesgo doble o hasta 8-9 veces más si se presentó antes de las 34 semanas de gestación.[1,23] Comprender la relación entre la enfermedad hipertensiva del embarazo y la enfermedad cardiovascular permitirá una estratificación mejorada de los factores de riesgo, así como la implementación de intervenciones oportunas para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad cardiovascular entre las personas en situación de riesgo. Estas afecciones se asocian comúnmente con el síndrome metabólico, que es un factor de riesgo cardiovascular conocido. Una explicación de los efectos directos del los estado hipertensivos del embarazo sobre el riesgo a largo plazo de enfermedad cardiovascular es que puede estar mediado por una disfunción endotelial prolongada o incluso permanente.[24]

Múltiples estudios han demostrado un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular más adelante en la vida entre lactantes restringidos por crecimiento intrauterino. La hipótesis original de "origen fetal" de Barker establece que la desnutrición fetal durante la gestación media o tardía conduce a la restricción del crecimiento fetal que programa el posterior desarrollo de enfermedad coronaria. Estos individuos son biológicamente diferentes de los bebés más grandes y apropiadamente desarrollados en el momento del nacimiento, con una mayor susceptibilidad a la hipertensión y la diabetes tipo II. Barker especifica que es el pequeño para la edad gestacional y no el prematuro el que está en mayor riesgo de enfermedad de la arteria coronaria, así como para la intolerancia a la glucosa o la

diabetes mellitus. Las personas con antecedentes de restricción del crecimiento intrauterino también tienen un mayor riesgo de desarrollar obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico.[24.25]

Fisiopatología

La preeclampsia se ha nombrado la enfermedad de las teorías y fue descrita hace 3000 años por los antiguos Egipcios.[2] Se caracteriza por placentación anormal con subsecuente inflamación materna y respuesta vascular. Está establecido que en embarazos normales se mantiene un equilibrio entre los procesos de estrés oxidativo y los procesos antioxidantes. El trofoblasto ayuda a regular la remodelación de las arterias espirales y permite la vasculogénesis normal al liberar factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PlGF). La tirosin cinasa soluble similar a fms 1 (sFlt-1) es una variante placentaria derivada del receptor de VEGF el cual se eleva en embarazos complicados con preeclampsia y ha demostrado que antagoniza VEGF y PlGF, compensando sus acciones proangiogénicas. [3.9]

La enfermedad se desarrolla en dos etapas. La primera, durante el primer trimestre, se caracteriza por formación alterada de la placenta debido a una invasión defectuosa de las células del trofoblasto extravelloso en el músculo liso de las arterias espirales y decidua materna dando como resultado una remodelación insuficiente del músculo liso de las paredes de las arterias y consecuentemente una perfusión inadecuada de la placenta debido al flujo útero-placentario disminuido y un estado de isquemia placentaria. Las concentraciones de oxígeno en la interfase materno-fetal fluctúan durante el embarazo como consecuencia de la remodelación vascular dentro del tejido uterino. Los procesos inflamatorio en la remodelación uterina intensa y cambios en la perfusión vascular generan especies reactivas de oxígeno incluyendo O_2, radical hidroxil y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), todos capaces de dañar los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos si los niveles de especies reactivas de oxígeno sobrepasan los mecanismos de defensa intracelulares. [2,6,9]

Los vasos estrechos crean mayor velocidad de flujo en los espacios intervellosos dando lugar a estrés mecánico. El daño placentario es causado por estos estresores, generan la

liberación de desechos dentro de la circulación materna, los cuales causando una inflamación exacerbada y por lo tanto daño endotelial. [6]

Existe evidencia que sugiere que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la patogénesis de la enfermedad ya que agrava aún más la función vascular en la placenta lo que exacerba una perfusión sanguínea insuficiente, inflamación, alteración en la hematopoyesis, apoptosis y daño estructural. Se ha sugerido que las células inflamatorias como las natural killers o células T maternas pueden impedir la invasión de las células del trofoblasto extravelloso si éstas fallan en el reconocimiento de antígenos paternos presentados por las células del trofoblasto extravelloso. [2,6,9]

En la segunda etapa, la falla orgánica se manifiesta clínicamente mediante una gama de síntomas vagos. La hipertensión y proteinuria aparecen a partir de las 20 semanas de gestación. Conforme la enfermedad progresa, los angioespasmos en el cerebro y edema cerebral pueden llegar a causar eclampsia, la cual se caracteriza por la presencia de crisis convulsivas severas. [2,6,9]

Predicción de preeclampsia

Actualmente no existe otro tratamiento que la resolución obstétrica, además la falta de herramientas diagnósticas específicas y predictivas hacen el manejo clínico de la enfermedad un problema global de salud con muchas necesidades clínicas aún no conocidas. La predicción de preeclampsia en el 1er trimestre es de gran importancia ya que incita a que los clínicos se enfoquen a grupos de alto riesgo y se inicie tratamiento médico profiláctico. Tamizar para preeclampsia hasta que exista un método efectivo de intervención disponible podría tratarse de un beneficio económico importante.[6,13]

Realizar una historia clínica detallada para evaluar los factores de riesgo es actualmente la única y mejor medida de tamizaje para abordar la preeclampsia. El Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG) no recomienda realizar pruebas de tamizaje diferentes de un buen interrogatorio dirigido.[1,5]

Algunas características clínicas maternas han sido identificadas como factores de riesgo para desarrollar preeclampsia. Los más importantes son etnicidad, edad, paridad, embarazo múltiple e historia personal y familiar de preeclampsia en embarazos previos. Adicionalmente algunos desórdenes sistémicos pueden también incrementar el riesgo

como es obesidad, diabetes mellitus, hipertensión esencial, trombofilias, síndrome antifosfolípidos y algunas enfermedades inmunes así como tratamientos de fertilización in vitro. Sin embargo, ninguno de éstos ya sea sólo o en combinación predicen suficientemente preeclampsia, se reporta una tasa de predicción combinada cerca del 30-37% para una preeclampsia de inicio temprano (antes de las 34 semanas de gestación) y 29% que para una de inicio tardío (después de las 34 semanas de gestación) con tasas de falsos positivos del 5%.[1,2]

Nicolaides propone un nuevo abordaje para el cuidado de la maternidad llamado la pirámide del control prenatal “al revés” la cual consiste en la realización de un tamizaje dentro de las 11 y 13.6 semanas a todas la embarazadas con la finalidad de identificar grupos con factores de riesgo y por ende iniciar estrategias profilácticas en lugar de ir aumentando el número de consultas antenatales lo que conllevaría tener menos casos de pacientes con preeclampsia y menos consultas innecesarias en pacientes con embarazos de bajo riesgo.[7] (Figura 1)

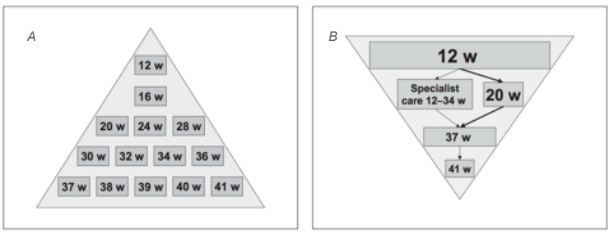


Figura 1. A. Pirámide tradicional del control prenatal establecido en 1929. B. Nueva propuesta de de pirámide para el control prenatal. W= semanas. Nicolaides KH. Turning the pyramid of prenatal care. Fetal Diagn Ther. 2011;29:183-196

Lo anterior, de la mano con el entendimiento progresivo de la fisiopatología ha puesto interés en el potencial del rol de los biomarcadores en modelos pronósticos. Existen factores angiogénicos y antiangiogénicos de los cuales está bien descrito su participación en la preeclampsia junto con componentes inflamatorios. [3,6]

Se ha dedicado un gran esfuerzo a la identificación de factores demográficos, análisis bioquímicos o hallazgos biofísicos ya sea solos o en combinación para predecir en un embarazo temprano el posterior desarrollo de preeclampsia. La utilidad de un test predictivo depende de la prevalencia de la enfermedad. A pesar de que se ha utilizado la sensibilidad y especificidad para evaluar qué tanto un test es capaz de identificar pacientes con una enfermedad, éstos no se enfocan en el significado de un resultado único. La mejor forma de evaluar el valor específico de un resultado de una prueba es mediante el uso de la razón de verosimilitud (en inglés, likelihood ratio, LR). La razón de la verosimilitud es la razón entre la posibilidad de observar un resultado en los pacientes con la enfermedad en cuestión versus la posibilidad de ese resultado en pacientes sin la patología. Debido a que la incidencia de preeclampsia es relativamente baja, los test de

tamizaje con resultados positivos requieren de valores altos de LR (>10) para poder predecir adecuadamente la probabilidad de la enfermedad y pruebas con resultados negativos requieren de bajos valores de LR (< 0.2) para confiablemente excluyan la enfermedad. [1]

En general los modelos que incorporen múltiples factores predictivos han demostrado mejor tasa de detección que aquellos que usan un solo factor. Para que un test predictivo sea útil es necesario una alta sensibilidad y un alto valor predictivo positivo tanto para que la mujer que resulte positiva tenga alto riesgo de desarrollar dicha enfermedad. Adicionalmente, para que un test predictivo sea beneficioso, la detección antes del inicio de la sintomatología deberá mejorar los desenlaces clínicos. [5]

El tamizaje de una mujer embarazada con un marcador diagnóstico efectivo para preeclampsia puede reducir significativamente costos de salud y daños innecesarios. La preeclampsia sigue siendo un problema de salud dominante en países en vías de desarrollo donde en ocasiones es diagnosticada durante un cuadro eclámptico. El marcador bioquímico debe ser detectado antes de que la enfermedad procese a un estadio avanzado y dañino con la finalidad de que un primer nivel de atención pueda referir a la embarazada a un segundo o tercer nivel de atención. Generalmente está aceptado que cuando se determina un modelo de tamizaje el nivel de falsos positivos idóneo es del 5%. [2]

Factores genéticos en la preeclampsia

Durante la última década, metodologías como la genómica, metabolómica y proteómica han sido más accesibles para la investigación clínica. Entre los marcadores mas utilizados se encuentran los polimorfismos genéticos, específicamente los SNPs (del inglés single nucleotide polymorphims), dichas variantes genéticas se han utilizado como marcadores de riesgo y pronostico para diversas enfermedades. Existen más de 60 genes candidatos para el desarrollo de preeclampsia, entre los genes más estudiados se encuentran aquellos que codifican para factores del sistema renina-angiotensina, de trombofilia, sistema endotelina, estrés oxidativo y diversos genes que codifican citocinas. [2,15]

Como se mencionó anteriormente, la isquemia placentaria lleva a un estado de estrés oxidativo, generando un incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) y una

disminución en los niveles de compuestos anti-oxidantes, los cuales se encargan de eliminar a las EROs. [27,28] Las EROs pueden afectar varios componentes celulares, tal es a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La peroxidación lipídica es una de las principales alteraciones que se ha relacionado con el daño endotelial generalizado que presentan las mujeres con preeclampsia y diversos estudios han correlacionado la severidad de la hipertensión con el aumento de los niveles de los productos de la oxidación de estos compuestos, principalmente la del metabolito malondialdehido (MDA). [29] En mujeres con preeclampsia también se ha encontrado una disminución en enzimas y compuestos anti-oxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) y el óxido nítrico (NO). [30]

El NO circulante es un potente vasodilatador, juega un papel importante en la regulación de la función endotelial, en el control de la tensión arterial y la homeostasis cardiovascular. Se ha detectado en mujeres con preeclampsia una disminución en la producción de NO en comparación con mujeres embarazadas sanas. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que modula la circulación placentaria, en modelos murinos se ha observado que la inhibición crónica de la producción de óxido nítrico en ratas embarazadas, causa síndromes similares a la preeclampsia tal es como hipertensión sostenida, proteinuria, trombocitopenia y restricción en el crecimiento intrauterino. La sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es una enzima que sintetiza NO de manera constitutiva a través de la conversión de L-arginina a L-citrulline en el endotelio vascular. Debido a que la disponibilidad del NO es en gran parte regulada por su síntesis por la eNOS, NOS3, el gen que codifica para eNOS, ha sido considerado como un gen candidato para la preeclampsia. [14,16]

Debido a que la secuencia genómica del NOS3 es altamente polimórfica, fue de interés explorar qué variantes en el gen pudieren tener un potencial funcional para afectar la biodisponibilidad del eNOS y así afectar el riesgo de preeclampsia. Existen tres polimorfismos del gen NOS3 que han sido ampliamente estudiados: G894T, T-786C y VNTR 4b/a. El G894T es una sustitución de guanina/timina en la posición 894 del exón 7 dando lugar a un cambio de glutamato a aparato en la posición 298. Se ha sugerido que reduce la expresión del RNAm de eNOS, su actividad y por ende los niveles de NO en pacientes con preeclampsia comparados con controles de pacientes sanas. EL T-786C es una sustitución de timina/citosina en la posición 786 de la región 5' flanqueando la región del promotor, y disminuye la transcripción de eNOS así como la producción de NO, de

este modo incrementado el riesgo de preeclampsia. El VNTR 4b/a es la deleción a del alelo con 27 bp VNTR en el intrón 4. (14)

En el 2013, se publicaron dos meta-análisis de la asociaciones entre estos tres polimorfismos y el riesgo de preeclampsia pero con resultados inconsistentes, desde aquellas publicaciones estudios nuevos han sido publicados. En el 2015 en China, Zeng y colaboradores realizaron una meta-análisis de 41 estudios de casos y controles para evaluar las asociaciones de los tres polimorfismos más estudiados del gen NOS3 con el riesgo de preeclampsia encontrando riesgo significativamente incrementado para preeclampsia con los polimorfismos G894T y T-786C, dentro de un modelo genético recesivo. No se encontraron asociaciones entre VNTR 4b/a y preeclampsia. (14)

Otra revisión sistemática realizada por Qi y colaboradores concluye que el polimorfismo eNOS G894T es asociado significativamente con riesgo de preeclampsia en modelo recesivo, sin embargo no se encontró riesgo significativo ni con eNOS T-786C lo que sugiere que su rol en la etiología de la preeclampsia es incierto y ni el polimorfismo del intrón 4b/a debido a que se localiza en una región intrónica quizá es menos probable que se funcional pero pudiese actuar como marcador ligado al desequilibrio con otras variantes funcionales del gen eNOS. La preeclampsia es una enfermedad multifactorial que resulta de interacciones complejas entre factores ambientales y genéticos. (16)

Bhatnagar y colaboradores encontrarón una asociación entre la presencia de los polimorfismos G300A del exón 8 y G274T del exón 16 del gen de la sintasa de óxido nítrico (NOS) *NOS2A* y el desarrollo de preeclampsia. También encontrarnó que la presencia del homocigoto TT del polimorfismo G274T y la forma heterocigoto de G300A, correlacionaba con una disminución de la concentración de la SOD y del NO; por lo que la presencia de ambos polimorfismos en una mujer embarazada, podría representar un alto riesgo de desarrollar preeclampsia. (22)

El daño al ADN por estrés oxidativo incluye inducción de mutaciones, rearreglos, ruptura y/o pérdida cromosómica. Entre los productos de oxidación del DNA, el 8-hidroxi-2-deoxiguanosina y el 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina se han utilizado como biomarcadores de daño a DNA por este mecanismo. El incremento de estos productos se ha asociado a mujeres con preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino, en comparación con mujeres con embarazos normales. (31,32)

La mayoría de los trabajos se han enfocado a evaluar genes involucrados en los sistemas de defensa antioxidantes en lugar de los sistemas de reparación del ADN. Mientras algunos estudios sugieren la asociación entre polimorfismos de genes involucrados en los sistemas antioxidantes y preeclampsia, otros no han encontrado asociación. A la fecha muy pocos estudios han analizado la posibilidad de una asociación entre los polimorfismos en genes de reparación del ADN y el riesgo de preeclampsia. [9] Saadat y colaboradores, investigaron la asociación entre los polimorfismos genéticos de XRCC1 y XRCC7 y el riesgo de preeclampsia dentro de una población iraní, analizaron a 151 pacientes con preeclampsia y sus resultados sugieren que el alelo 399Gln del gen XRCC1 es un factor de riesgo significativo para desarrollar preeclampsia.[11]

En Durango, México se estudió la relación entre los polimorfismos de APEX1 Asp148Glu, XPD Lys751Gln, XRCC1 Arg399Gln y XRCC3 Thr241Met y su relación con el riesgo de preeclampsia en población mexicana. A pesar de no encontrar asociaciones entre APEX1, Asp148Glu y preeclampsia como se demostró en otros estudios realizados en otra población, los resultados demostraron una tendencia (OR 1.74, IC 95% 0.96-3.14), sugiriendo la necesidad de más estudios con una población más grande para elucidar el papel de este polimorfismo en la preeclampsia; así mismo se ha desrito que es necesario estudiar otras regiones de México debido a un estudio realizado por Silva-Zolezzi y colaboradores que describe diferencias genéticas entre los mestizos mexicanos de diferentes regiones del país. [9,12]

Pruebas de genotoxicidad

Recientemente el daño al ADN en mujeres con preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino se ha evaluado por medio del ensayo de micronúcleos (MN) con bloqueo de la citocinesis.[33] En este estudio se determinó la presencia de los MN en mujeres a mitad de su embarazo (20 semanas de gestación), antes de que presentaran algún síntoma y/o alteraciones bioquímicas relacionadas a una patología del embarazo. Aquellas mujeres que desarrollaron preeclampsia y/o restricción del crecimiento intrauterino, a la edad gestacional estudiada, ya presentaban un incremento en los MN, por lo que este estudio puede proporcionar un nuevo marcador para la detección temprana de mujeres en riego de desarrollar esta patología, en comparación de los metabolitos de oxidación del DNA mencionados anteriormente.

Incluso antes de la descripción de la estructura del ADN, ya era evidente que los agentes químicos, físicos y biológicos podían interactuar con el material genético, dando lugar a mutaciones que se asocian la inestabilidad genómica y el cáncer, desde entonces se empezaron a desarrollar ensayos in vitro e in vivo con la finalidad de detectar el potencial del fármaco para inducir mutaciones genéticas y / o aberraciones cromosómicas. [26]

Entre las pruebas de genotoxicidad disponibles, el ensayo de cometas y el ensayo de micronúcleos son reconocidos debido a su alta sensibilidad, sencillez y poder estadístico para evaluar las rupturas de ADN, que pueden considerarse sellos distintivos de mutagenicidad.

Ensayo cometa [26]

El ensayo cometa (CA), también conocido como electroforesis en gel de células individuales o electroforesis de microgeles , fue introducida por Östling y Johanson para detectar daños en el ADN inducidos por la radiación. Desde su desarrollo, se propusieron varias modificaciones metodológicas, sin embargo, el método alcalino, desarrollado por Singh y colaboradores, que permite la desnaturalización del ADN, así como la detección de sitios de marca alcalina, se convirtió en el más utilizado y recomendado debido a su amplio espectro de detección de daño en el ADN. Esta prueba se ha utilizado en diferentes estudios, tales como: toxicología genética, biomonitorización, eco-genotoxicidad, epidemiología molecular, nutrigenómica, reparación del ADN estudios de sistema, evaluación de la genotoxicidad de los nanomateriales, evaluación de la integridad del ADN en células madre mesenquimales y espermatozoides. También se propuso CA para detectar lisis de células bacterianas mediada por bacteriófagos y empleado en plantas.

Permite analizar la genotoxicidad en tejidos específicos, que están en contacto directo con la sustancia probada o en los que se produce la absorción, distribución, metabolización o excreción, lo que permite detectar la clastogenicidad in situ. La técnica podría estar asociada a la hibridación fluorescente in situ (FISH), trae nuevos posibles de su uso para analizar la inducción del daño del ADN.

El ensayo cometa también permite detectar ruptura en las cadenas de ADN, que se pueden visualizar mediante la migración creciente de segmentos de ADN libres, lo que resulta en imágenes similares a los cometas, lo que justifica el nombre del ensayo. Hay

tres técnicas de CA disponibles: ácido, alcalino y neutro, basadas en el pH del tampón de electroforesis empleado. Al principio, se estableció un paradigma que la técnica neutral permite detectar roturas de doble cadena (DSB), mientras que la técnica alcalina, rupturas de cadena simple (SSB). Sin embargo, la CA indica tanto SSB como DSB, independientemente de la técnica utilizada. Estos SSB y / o DSB están asociados a aberraciones cromosómicas e inestabilidad genómica.

Ensayo de micronúcleos [26]

El ensayo de micronúcleos (MNA) es un importante biomarcador in vivo e in vitro, ampliamente utilizado en la epidemiología molecular y daños en citogenética en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos. El término de micronúcleo (MN), también conocido como cuerpos de Howell-Jolly, se introdujo en 1951 en relación con los fragmentos acéntricos expulsados del núcleo principal en las últimas etapas de la anafase. Las MN se pueden formar a través de dos mecanismos: rupturas cromosómicas (clastogénesis) o alteración del aparato mitótico (aneuogénesis). Por lo tanto, utilizando anticuerpos anti-cinetocoro es posible verificar si un fármaco particular induce la formación de MN a través de la clastogénesis o la aneogénesis. La ausencia de cinetocoro en las MN indica acción clastogénica, mientras que su presencia, acción aneugenica.

Los MN no solo representan pérdidas cromosómicas, sino también el resultado de la amplificación del ADN. La amplificación del ADN se observa comúnmente en el proceso oncogénico, resultando en cromosomas de doble minuto (DM), que se eliminan del núcleo de la célula principal, originando MN. La expulsión de MNs se asocia con la pérdida de la dosis de alelos, lo que contribuye a la carcinogénesis.

Desde 1959, los MN se han propuesto como marcadores de daños citogenéticos. Sin embargo, el análisis de frecuencia de MNs como una prueba de citogenética fue propuesto solamente en 1970 por Boller y Schimid y este último se empleó en eritrocitos policromáticos de médula ósea y linfocitos. El MNA ha sido ampliamente utilizado en estudios de genotoxicidad. MNA se puede aplicar a cualquier célula eucariota, siendo preferible utilizarla en sustitución de la prueba de aberración cromosómica, ya que no requiere análisis de cariotipo.

Objetivos

Objetivos generales

- Evaluar el daño al ADN y su relación con la frecuencia de los polimorfismos de los genes *NOS2A* y *XRCC1* en binomios madres – recién nacidos con embarazo normal y con diagnóstico de preeclampsia.

Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de los polimorfismos G300A y G274T del gen *NOSA* en mujeres con un embarazo normal y mujeres con diagnóstico de preeclampsia.
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos Arg194Trp, Arg280His y Arg399Gln del gen *XRCC1* en mujeres con un embarazo normal y mujeres con diagnostico de preeclampsia.
- Determinar la frecuencia de los micronúcleos en linfocitos de mujeres con preeclampsia y mujeres con embarazo normal, así como en sus respectivos recién nacidos a partir de la sangre del cordón umbilical.
- Evaluar el daño al ADN por medio del ensayo Cometa en mujeres con diagnóstico de preeclampsia y mujeres embarazadas sanas, así como en sus respectivos recién nacidos.
-

Hipótesis

- La presencia de los polimorfismos en los genes *NOSA* y el gen *XRCC1* aumentan el riesgo de presentar preeclampsia.
- Los binomio madre-recién nacido con preeclampsia tendrán mayor daño al ADN en comparación con binomios que cursaron con un embarazo normal.
- La presencia de los polimorfirmos del gen *XRCC1* correlacionará con un mayor daño a ADN.

Justificación

La preeclampsia es una enfermedad cuyos mecanismos de patogenicidad no están del todo definidos y forma parte de las principales causas morbimortalidad perinatal entidades a nivel mundial; así mismo no existen opciones terapéuticas altamente efectivas para contrarrestar sus efectos dando como única solución la terminación del embarazo, muchas veces en etapa pretérmino, agregando morbimortalidad para el neonato. A lo largo del mundo se ha dedicado un gran esfuerzo a la identificación de factores demográficos, análisis bioquímicos, análisis genéticos o hallazgos biofísicos con la finalidad de poder predecir en una etapa temprana del embarazo el posterior desarrollo de preeclampsia y poder ofrecer vigilancia y manejo oportuno en aquellas pacientes con un mayor riesgo de desarrollar esta patología.

Uno de los principales eventos que desencadenan esta patología es la isquemia placentaria. Esta condición de la placenta de mujeres con PE es responsable de la alteración de numerosos factores tales como los factores angiogénicos, citocinas y EROs. El desbalance entre EROs y enzimas anti-oxidantes se ha asociado a procesos de estrés oxidativo que causan un daño endotelial generalizado en mujeres preeclámpticas.

Diversos estudios han encontrado una asociación entre el desarrollo de la preeclampsia, cambios en la concentración de enzimas anti-oxidantes y la presencia de polimorfismos de genes involucrados en procesos de estrés oxidativo, tales como el gen *NOS2A*. También se sabe que las EROs pueden dañar el ADN y recientemente, en mujeres con preeclampsia, se ha evaluado este daño por medio de la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN), aunado a lo anterior existen polimorfismos en genes como *XRCC1* y *XRCC3*, que pueden incrementar esta frecuencia de MN y darle una mayor susceptibilidad a daño al ADN por procesos de estrés oxidativo.

Por otro lado, la mayor parte de los estudios se ha enfocado al análisis de los linfocitos de las madres, sin embargo, en este proyecto se estudiarán a los recién nacidos, ya que se sabe que dependiendo de la severidad de la preeclampsia puede dejar secuelas a largo plazo no solo en la madre, sino también en el recién nacido.[34]

Material y métodos

Características del estudio: Se realizó un estudio analítico, observacional de casos y controles.

Variables dependientes: Polimorfismos de los genes NOS2A y XRCC1, daño al ADN evaluado por medio de micronúcleos y ensayo cometa.

Variable independiente: Preeclampsia.

Criterios de selección de casos y controles:

	Criterios de Inclusión	Criterios de no inclusión	Criterios de exclusión
Casos	Mujeres embarazadas con diagnóstico de preeclampsia. Pacientes que acepten participar en el estudio y firmen la hoja de consentimiento informado.	Pacientes con enfermedad sistémica crónica como lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, glomerulonefritis, epilepsia, diabetes, hipertensión arterial sistémica crónica, púrpura trombocitopenia idiopática, púrpura trombocitopenia trombótica, enfermedades de la colágena, patología renal.	Aquellas pacientes que durante el proceso de estudio no deseen participar. Pérdida de las condiciones de almacenamiento Que se haya realizado el diagnóstico durante el estudio, de alguna de las enfermedades de los criterios de no inclusión. Pacientes cuyo material genético no pudo ser analizado por dificultades técnicas.
Controles	Mujeres embarazadas sin diagnóstico de PE al momento de la resolución obstétrica. Mujeres que acepten participar en el estudio y firmen hoja de consentimiento informado.	Pacientes con enfermedad sistémica crónica como lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, glomerulonefritis, epilepsia, diabetes, hipertensión arterial sistémica crónica, púrpura trombocitopenia idiopática, púrpura trombocitopenia trombótica, enfermedades de la colágena, patología renal.	Aquellas pacientes que durante el proceso de estudio no deseen participar. Perdida de las condiciones de almacenamiento Que se haya realizado diagnóstico, durante el estudio, de alguna de las enfermedades de los criterios de no inclusión. Pacientes cuyo material genético no pudo ser analizado por dificultades técnicas.

Tabla 1. Criterios de selección.

Universo de la muestra: Pacientes del Instituto Nacional de Perinatología con diagnóstico de preeclampsia y mujeres con embarazo normal que acepten participar en el estudio mediante consentimientos informados.

Clasificación de la enfermedad: Hipertensión de novo que consiste en la presencia de presión arterial sistólica ≥140 mmHg y/o una presión arterial diastólica ≥90 mmHg medida en dos ocasiones al menos con 4 horas de diferencia entre ellas, posterior a las 20 semanas de gestación y la presencia de proteinuria ≥300 mg/24 horas o una relación proteínas urinarias/creatinina urinaria ≥0.3. En caso de no presentar proteinuria para diagnóstico de preeclampsia se debe presentar alguno de los siguientes:

- Trombocitopenia (<100.000/microlitro plaquetas)
- Falla en la función hepática ya sea por:
  - La elevación anormal de transaminasas (aspartato transaminasa y/o alanina aminotransferasa) dos veces su valor normal
  - Dolor persistente en cuadrante superior derecho y/o epigastralgia que no responde a medicamentos y/o que no corresponde a otros diagnósticos
- Edema pulmonar
- Insuficiencia renal de nueva aparición (creatinina sérica ≥1.1 mg/dl o el doble en ausencia de otra enfermedad renal)
- Alteraciones cerebrales o visuales.

Tamaño de la muestra: Se calculó el tamaño de la muestra con la calculadora de la Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (España) a través de la página web https://www.fisterra.com/mbe/investiga/muestra_casos/casos_controles.asp#estudios para un estudio de casos y controles. En la siguiente tabla se muestran las frecuencias referencia del grupo control para los polimorfirmos analizados.

Gen	SNP	Frecuencia	Referencia	Tamaño muestral
NOSA	G300A	G 0.86 A 0.14	Bhatnagar S, et al. 2007	6
	G274T	G 0.69 T 0.31		26
XRCC1	Arg399Gln	Arg 0.74 Gln 0.26	Sandoval-Carrillo, et al. 2014	16

Tabla 2. Frecuencias de referencia para el cálculo de tamaño de la muestra.

Para los polimorfirmos Arg194Trp y Arg280His no se ha reportado en la literatura su respectiva frecuencia por lo que nos basamos en las obtenidas para los otros polimorfismos.

Procesos técnicos de laboratorio

Procesamiento de la muestra de sangre venosa materna y sangre de cordón umbilical del recién nacido obtenidas en tubos vacutainer con anticoagulante heparina:

- *Aislamiento de linfocitos de sangre periférica:* los linfocitos se aislaron a partir de sangre periférica en un gradiente de Ficoll-Histopaque 1077 mediante centrifugación.

- Extracción de ADN: el ADN genómico se obtuvo mediante el kit QUIAmp® DNA Blood Mini Kit (250) de Quiagen a partir de 200L de linfocitos humanos previamente aislados. Por este método es posible obtener desde 30ng/µL hasta 1µg/µL de DNA genómico.

- *Cuantificación de ADN:* el ADN genómico obtenido será cuantificado directamente a partir de 2µL de cada una de las muestras mediante espectrofotometría a 260/280nm en un equipo Nanodrop 2000.

- *Genotipificación de los polimorfismos de los genes NOS2A* y *XRCC1:* la identificación de las variantes G300A y G274T del gen *NOS2A*; C26304T (Arg194Trp), G27466A (Arg280His) y G28152A (Arg399Gln) del gen *XRCC1* se realizó en el ADN genómico de los individuos y se determinó en el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), mediante ensayos de discriminación alélica usando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Las sondas TaqMan para cada SNP (polimorfismo de nucleótido único) están marcadas con un fluoroforo distinto (VIC y FAM) en el extremo 3' para cada uno de los alelos. El nucleótido dimórfico (SNP) será ubicado al centro de la sonda y cada una de ellas estará unida a una molécula MGB (Minor Groove Binder) en el extremo 3´. Esta molécula incrementa la Tm del oligonucleótido, lo que permite el uso de sondas cortas que se unirán antes que los primeros a su secuencia blanco en el ADN, asegurando su degradación una vez iniciada la reacción de PCR.

- *Ensayo de micronúcleos (MN): s*e realizaron cultivos de linfocitos estimulados, adicionando citocalasina B al cultivo para inhibir la citocinesis, pero no la cariocinesis, logrando así obtener las células binucleadas para realizar la evaluación de MN. Las células se cosecharon y fijaron con metanol-ácido acético (3:1). Las laminillas se tejieron con azul de metileno más eosina (Tinción de Wright). La frecuencia de micronúcleos se estimó en 1000 células binucleadas. En estas laminillas se evaluó el índice de división nuclear (IDN), contando las células mononucleadas (un solo núcleo),

binucleadas (dos núcleos en la misma célula) y polinucleadas (más de dos núcleos en la misma célula) en un total de 200 células.

- *Evaluación del daño al ADN por el ensayo Cometa (electroforesis unicelular) con reto:* en muestras de sangre completa se indució daño con H_2O_2 (T0) y se evaluó a los 30 y 60 minutos la capacidad de reparación, posteriormente se elaboraron las laminillas correspondientes, embebiendo las células en agarosa, posteriormente, se sumergieron en una solución de lisis con alto contenido de detergentes (1 % de Triton X-100, 10 % de DMSO) y sales (EDTA 100 mM, NaCl 2.5 M, Tris 10 mM). Las laminillas se colocaron en un buffer de fosfatos bajo condiciones alcalinas (pH 10) por espacio de 20 minutos (tiempo de desenrrollamiento de las hebras del ADN). En seguida se realizó la electroforesis bajo las mismas condiciones alcalinas, posteriormente se neutralizaron las células con un buffer (pH 7.5). Las células se fijaron en etanol al 70%. Las lamillas serán teñidas con 25 µl de bromuro de etidio. Las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia (filtro de excitación de 515-560 nm) y con la ayuda de un ocular graduado se evaluó la migración de los fragmentos de ADN de 100 núcleos.

Análisis Estadístico: Los datos experimentales se expresaron como la media ± SEM. Los datos clínicos de los individuos se expresaron como la media ± SD. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante *T* de *Student*, o ANOVA para datos paramétricos y x^2 para valores independientes. La correlación entre los parámetros analizados se realizaron mediante regresión logística. Un valor de p menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. La distribución de los polimorfismos fue evaluada por medio de la prueba de Hardy-Weinberg. Se calcularon las razones de momios ajustadas y sus respectivos intervalos de confianza, considerando como co-variables ciertos factores de riesgo como edad e índice de masa corporal.

Aspectos éticos: Los principios éticos que se siguieron son los establecidos para la investigación médica en seres humanos de acuerdo a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, en los cuales se establecen los principios básicos para toda investigación médica. Las pacientes participantes firmaron hoja de consentimiento y se les explicó las características y objetivos del estudio, así como los procedimientos implicados en el mismo. La participación de las pacientes es voluntaria, con la oportunidad dejar de participar en el estudio en cualquier momento sin perjuicio o pérdida

de la atención médica en ningún hospital. La información obtenida de las pacientes durante el estudio ha sido mantenida confidencialmente. [23]

Resultados

Para el estudio de la frecuencia de polimorfismos se analizaron 135 mujeres con embarazo normal (control) y 190 muestras de pacientes con preeclampsia. En la tabla 3 se muestran las características clínicas de los grupos de estudio.

Parámetro	Controles	Preeclampsia	Valor P
N	135	190	
Edad materna (años)	27.75 ± 6.53	28.67 ± 6.25	NS
Fumadoras antes del embarazo (%)	15.67	26.60	0.0208
Primigesta (%)	35.60	36.59	NS
IMC (kg/m^2)	28.66 ± 4.86	30.86 ± 7.56	0.013
Peso del recién nacido (g)	3019.14 ± 578.40	2226.34 ± 835.16	1.26×10^{-16}
Semanas de gestación (sdg)	38.03 ± 2.37	35.01 ± 3.80	2.5×10^{-14}
PAS (mmHg)	113.8 ± 8.17	151.81 ± 16.06	3.15×10^{-76}
PAD (mmHg)	72.74 ± 6.35	99.07 ± 12.99	5.25×10^{-63}
Proteinuria (mg/24h)	ND	1621.19 ± 1512.98	

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de las pacientes con PE y el grupo control. Valor promedio ± desviación estándar (DE); IMC: índice de masa corporal; SDG: semanas de gestación al momento del parto; PAS: presión arterial sistémica; PAD: presión arterial diastólica; Proteinuria: recolección de orina por 24 horas; ND: no determinado. El valor de p fue calculado entre el grupo control y el de mujeres con preeclampsia. NS: no significativo.

Con base en la tabla antes mostrada se puede observar que no existe diferencia significativa en cuanto a la edad de las pacientes ni el tratarse del primer embarazo, sin embargo, respecto al índice de masa corporal, habito de tabaquismo pregestacional, semanas de gestación y peso del recién nacido, si hubo diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, mismos factores se encuentran bien documentados en la revisión de literatura. Un factor ligado al bajo peso del recién nacido de los casos son las semanas de gestación al momento del nacimiento, sin tomar en cuenta la posibilidad de haber desarrollado restricción del crecimiento intrauterino secundario a la patología de base que también condicionaría la presencia de bajo peso al nacimiento.

En la tabla 4 se muestra la frecuencia encontrada de los polimorfismos G274T y G300A del gen *NOS2A* y en la tabla 5 la frecuencia de los polimorfismos Arg194Trp, Arg280His y Arg399Gln del gen *XRCC1*.

Gen	SNP		Controles N = 135		Preeclampsia N = 190		OR	IC 95%	Valor P
NOSA	G300A	N	A	G	A	G	0.89	0.54 - 1.47	0.648
			71	199	100	280			
			0.96	0.74	0.26	0.74			
	G274T	N	T	G	T	G	1.12	0.67 - 1.86	0.674
			62	208	86	294			
			0.23	0.77	0.23	0.77			

Tabla 4. Frecuencia alélica de los polimorfismos G274T y G300A del gen NOS2A

Gen	SNP		Controles N = 135		Preeclampsia N = 187,187,186		OR	IC 95%	Valor P
XRCC1	Arg194Trp	N	C	T	C	T	1.28	0.74 - 2.23	0.380
			223	47	305	69			
			0.83	0.17	0.82	0.18			
	Arg280His	N	G	A	G	A	0.91	0.48 - 1.72	0.770
			28	242	45	329			
			0.10	0.90	0.12	0.88			
	Arg399Gln	N	A	G	A	G	1.03	0.62 - 1.71	0.924
			59	211	292	80			
			0.22	0.78	0.78	0.22			

Tabla 5. Frecuencia alélica de los polimorfismos Arg194Trp, Arg280His y Arg399Gln del gen XRCC1

De acuerdo a las frecuencias obtenidas en la población de estudio, no se encontró asociación entre la presencia de los polimorfismos estudiados y el desarrollo de la preeclampsia, por lo cual nuestra hipótesis sería negativa. Cabe destacar que en otras poblaciones si se encontró relación significativa respecto a la presencia de los polimorfismos de Arg399Gln del gen *XRCC1*, lo cual corrobora con la variabilidad genética entre las poblaciones.

El daño al ADN se evaluó por medio del ensayo cometa con reto y a través de la determinación de micronúcleos (MN) en linfocito de recién nacidos y sus respectivas

madres con un embarazo normal y con diagnóstico de preeclampsia. En el análisis de MN los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6, donde se puede observar que en las mujeres de los grupos estudiados no existe diferencia significativa respecto a la frecuencia; sin embargo en los recién nacidos de mujeres con preeclampsia hay un incremento significativo en el número de MN con respecto al grupo control lo que traduce que hijos de madres preeclámpticas nacen con un daño al ADN mayor, lo cual podría tener repercusiones en su salud no solo a corto plazo, si no también a largo plazo al incrementar el riesgo de padecer otras enfermedades, entre ellas padecimientos oncológicos, metabólicos, entre otros. Lo anterior abre un área de oportunidad para proponer nuevos protocolos de estudio. Una dificultad técnica del estudio del daño del ADN mediante la técnica de MN es que dicho procedimiento requiere de una muestra fresca para ser procesada, de lo contrario la muestra ya no es utilizable lo que conllevó a disminución de número de muestras para el análisis de las mismas.

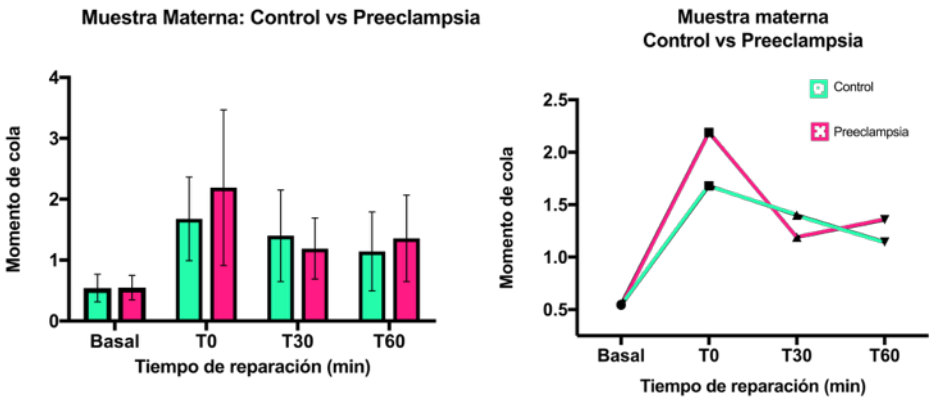
	Controles		Preeclampsia		Valor P
	N	X ± DE	N	X ± DE	
Madre	24	5.67 ± 3.13	35	6.62 ± 3.00	0.239
Recién nacido	29	2.12 ± 1.28	32	2.94 ± 1.64	**0.033**

Tabla 6. Frecuencia de MN en recién nacidos y en mujeres del grupo control y casos. Ajustado por edad e IMC.

En el análisis de daño al ADN mediante el ensayo cometa con reto lo que se busca es saber cómo se encuentran los mecanismos de reparación de daño al ADN justo en el momento en el que se realiza esta prueba, una consideración importantes es que el resultado del estudio puede ser diferente si se miden en otro tiempo, lo que pudiese es un área de oportunidad para estudiar los mecanismos a largo plazo. En las gráficas 1 y 2 se presentan el momento de cola para el grupo control versus grupo de preeclampsia de sangre materna y de sangre de recién nacido, así mismo en las tablas 7 y 8 se complementa dicha información.

De acuerdo a los datos obtenidos en las muestras de sangre materna no hay diferencias significativas entre el grupo control y el de preeclampsia en la población estudiada en cuanto a la reparación del daño al ADN inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sin embargo el grupo de preeclampsia parece tener una mejor capacidad de reparación al tiempo de 30 minutos con respecto al grupo control. También podemos observar que

ninguno de los grupos logra reparar completamente el daño y no regresan a valores basales.

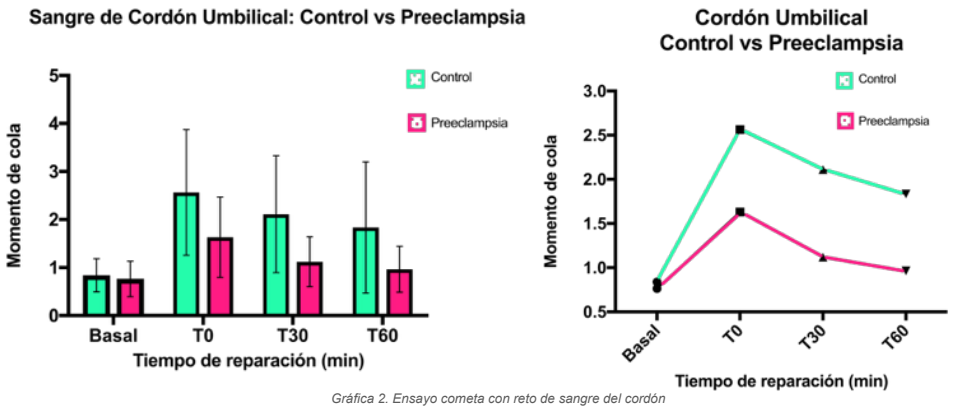


Gráfica 1. Ensayo cometa con reto de sangre materna.

Muestra Materna	Control N=37	Preeclampsia N=23	P
Daño basal	0.710 ± 0.332	0.651 ± 0.306	0.483
T0	2.250 ± 1.287	1.911 ± 1.093	0.286
T30	1.804 ± 1.090	1.204 ± 0.572	**0.008**
T60	1.536 ± 1.154	1.170 ± 0.630	0.124

Tabla 7. Ensayo cometa con reto de sangre materna.

Por otro lado, el análisis de las muestras de sangre de cordón umbilical de los recién nacidos, la tendencia general que se observa es que el grupo control es el que presenta una mayor susceptibilidad al daño al ADN tanto a nivel basal como en presencia de H2O2 en comparación con el grupo de recién nacidos provenientes de mujeres con preeclampsia; lo cual sugiere que los recién nacidos del grupo de preeclampsia que estuvieron expuestos a diversas condiciones de hipoxia, estrés, entre otras situaciones lograron desarrollar sus capacidades de defensa y reparación del ADN logrando acercarse a los valores basales en el minuto 60 incluso con valores significativos. Llama la atención los mecanismos de reparación del grupo control ya que no logra activar los mecanismos de reparación manera eficiente y no regresa a valores basales. En cuanto a los recién nacidos de mujeres con preeclampsia tienen una mejor capacidad de reparación y regresan a valores basales.



Gráfica 2. Ensayo cometa con reto de sangre del cordón

Muestra RN	Control N=21	Preeclampsia N=11	P
Daño basal	0.838 ± 0.346	0.763 ± 0.368	0.580
T0	2.636 ± 1.469	1.631 ± 0.839	**0.020**
T30	2.111 ± 1.219	2.111 ± 0.520	**0.004**
T60	1.835 ± 1.365	0.963 ± 0.478	**0.014**

Tabla 8. Ensayo cometa con reto de sangre del cordón umbilical.

Conclusiones

A pesar de que de que la preeclampsia es causa líder de morbimortalidad perinatal a nivel mundial, los mecanismos de patogenicidad continúan sin ser elucidados y las opciones de tratamiento son limitadas en eficacia y la única cura es la resolución obstétrica. Cada semana que se prolonga el embarazo reduce marcadamente la morbilidad y mortalidad fetal pero a expensas de un riesgo incrementado de morbilidad materna e incluso muerte. La gran meta a lo largo plazo es mejorar el manejo antenatal de la preeclampsia y desarrollar un modelo de predicción preciso que logre identificar mujeres con alto riesgo de enfermedad.

Diversos estudios han encontrado una asociación entre el desarrollo de la preeclampsia, cambios en la concentración de enzimas anti-oxidantes y la presencia de polimorfismos de genes involucrados en procesos de estrés oxidativo, tales como el gen *NOS2A*. También se sabe que las EROs pueden dañar el DNA y recientemente, en mujeres con preeclampsia, se ha evaluado este daño por medio de la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN), aunado a lo anterior existen polimorfismos en genes como *XRCC1*, que pueden incrementar esta frecuencia de MN y darle una mayor susceptibilidad a daño al DNA por procesos de estrés oxidativo.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la asociación de polimorfismos de genes involucrados en procesos de estrés oxidativo (*NOS2A*) y reparación del DNA (*XRCC1*) con el daño genotóxico en el binomio materno-hijo de mujeres con embarazo normal y con diagnóstico de preeclampsia. De acuerdo a los resultados presentados, no se encontró una asociación entre la presencia de los polimorfismos G300A y G274T del gen *NOS2A* y Arg194trp, Arg280his y Arg399Gln del gen *XRCC1* con el desarrollo de la enfermedad en estudio.

Con respecto al daño al ADN si se observó que los recién nacidos de mujeres con diagnóstico de preeclampsia tienen una mayor frecuencia de MN en comparación con el grupo control, lo cual nos estaría indicando que los hijos de mujeres con dicha patología nacen con un daño al ADN mayor lo que podría tener consecuencias en el estado de salud de dichos infantes a largo plazo incrementando susceptibilidad para presentar otras enfermedades. En las madres no se observaron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de MN.

Por medio del ensayo cometa con reto también se observó que ambos grupos de estudios tienen diferencias significativas en la reparación del daño a DNA. Los recién nacidos de mujeres con preeclampsia son menos susceptibles al daño por estrés oxidativo en comparación con el grupo control, a diferencia de las madres en que ambos grupos fueron susceptibles al daño inducido por H_2O_2 de manera similar. Sin embargo se observó que las mujeres con diagnóstico de preeclampsia, reparan más rápido en comparación con las mujeres con un embarazo normal.

De acuerdo a lo anteriormente, se puede concluir que ambos grupos de estudios, tanto la madre como los recién nacidos, presentan diferencias en cuanto a la susceptibilidad y

eficiencia en los mecanismos de reparación del daño inducido por procesos de estrés oxidativo, sin embargo los mecanismos exactos e impacto en el desarrollo de la preeclampsia aún quedan por elucidar.

A nivel mundial existen pocos estudios referentes al tema de los cuales un porcentaje muy bajo ha encontrado asociación entre la presencia de los polimorfismos y el riesgo de la enfermedad, así mismo existe una gran variedad de genes posibles a estudiar sin olvidar que la variabilidad ínter-individual es un factor determinante crucial y cada grupo poblacional estudiado va a obtener distintos resultados con base a las características étnicas.

Referencias Bibliográficas

1. American College of Obstetricians and Gynecologists. Women's Health Physicians. Task Force on Hypertension in Pregnancy. ACOG 2013
2. Anderson UD, Olsson MG, Kristensen KH, et al. Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. Placenta. 2012;26:S42-S47
3. Duhig KE, Shennan AH. Recent advances in the diagnosis and management of preeclampsia. F1000Prime Reports. 2015;7:24
4. Freyermuth G. Informe semanal de Vigilancia Epidemiológica (DGE), 2017. Observatorio de Mortalidad Materna en México (ODM)
5. American College of Obstetricians and Gynecologists. First-trimester Risk Assessment for Early-Onset Preeclampsia. Committee Opinion 638, ACOG 2015
6. Anderson UD, Gram M, Hansson SR, et al. First trimester prediction of preeclampsia. Curr Hypertens Rep. 2015;17:74
7. Nicolaides KH. Turning the pyramid of prenatal care. Fetal Diagn Ther. 2011;29:183-196
8. Diccionario de la Real Academia Española

9. Sandoval-Carrillo A, Méndez-Hernández EM, et al. Polymorphisms in DNA Repair Genes (APEX1, XPD, XRCC1 and XRCC3) and Risk of Preeclampsia in a Mexican Mestizo Population. Int. J. Mol. Sci. 2014;15:4273-4283

10. Tadesse S, Kidane D, Guller S, et al. In vivo and in vitro evidence for placental DNA damage in preeclampsia. PLoS One. 2014;9:e86791.

11. Saadat I, Beyzaei Z, Aghaei F, Kamrani A, Saadat M. Association between polymorphisms in DNA repair genes (XRCC1 y XRCC7) and the risk for preeclampsia. Arch. Gynecol. Obstet. 2012;286:1459-1462.

12. Silva-olezzi I, Hidalgo-Ortiz A, Estrada Gil J, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. Próximo. Natl. Acad. Sci. 2009;106:8611-8616.

13. Tranquilli AK, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. Pregnancy Hypertens. 2014;4(2): 97-104.

14. Zeng F, Zhu S, Wong MC, Yang Z, Tang J, Li K, Su X. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. Sci Rep. 2016;21(6):23407.

15. Seremak-Mrozikiewicz A. Significance of genetic polymorphism investigations in pregnancy complications. Arch Perinat Med. 2013;19(1):7-11

16. Qi HP, Fraser WD, Luo ZC, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Preeclampsia. Am J Perinatol. 2013;30:795-804

17. Wu W, Yang H, Feng Y, et al. Polymorphisms in Inflammatory Mediator Genes and Risk of Preeclampsia in Taiyuan, China. Reprod Sci. 2017; 24(4):539-547.

18. Andraweera PH, Dekker GA, Jayasekara RW, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathways genes and the risk of preeclampsia in Sinhalese women. J Maternal Fetal Neonatal Med. 2016;29(7):1072-1076.

19. Haggerty CL, Ferrell RE, Hubel CA. Association between allelic variants in cytokine genes and preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2005;193(1):209-215.

20. Ghasemi M, Kashani E, Fayyaz A, et al. Interleukin-1 alpha variation is associated with the risk of developing preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015;193:75-78.

21. Granger J, Spradley F, Bakrania B. The Endotelin System: A Critical Player in the Pathophysiology of Preeclampsia. Curr Hypertens Rep. 2018;20:32

22. Bhatnagar S, Bhattacharjee J, Vaid M, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism in pre-eclampsia: A pilot study in North India. Aust NZ J Obstes Gyn. 2007;47:477-482.

23. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, Principios éticos para la investigación en seres humanos, 52ª Asamblea general, Edimburgo, Escocia, 2000.

24. Herrera-García G, Contag S. Maternal preeclampsia and risk for cardiovascular disease in offspring. Curr Hipertens Rep. 2014;16:475.

25. Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. Theriogenology. 2000;53(2):555–74.

26. Pinheiro-Araldi R, Correa-de-Melo T, Biude-Mendes T, et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. Biomed Pharmacother. 2015;72:74-82.

27. Madazli R, Benian A, Aydin S, et al. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. J Obstet Gynaecol 2002; 22:477–80.

28. Gupta S, Aziz N, Sekhon L, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. Obstet Gynecol Surv 2009; 64:750-9.

29. Atamer Y, Kocyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005; 119:60–6.

30. Aydin S, Benian A, Madazli R, et al. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;113:21-5.

31. Potdar N, Singh R, Mistry V, et al. First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. *BJOG* 2009; 116:637-42.

32. Wiktor H, Kankofer M, Schmerold I, et al. Oxidative DNA damage in placentas from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Virchows Arch* 2004; 445:74-8.

33. Furness DL, Dekker GA, Hague WM, Khong TY, Fenech MF. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. *Mutagenesis* 2010; 25:489-98.

34. Baserga M, Hale MA, Wang ZM, et al. Uteroplacental insufficiency alters nephrogenesis and downregulates cyclooxygenase-2 expression in a model of IUGR with adult-onset hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R1943–R1955