



GOBIERNO DE LA
CIUDAD DE MÉXICO
CIUDAD INNOVADORA Y DE DERECHOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARIA DE SALUD DE LA CIUDAD DE MÉXICO

DIRECCIÓN DE FORMACIÓN, ACTUALIZACIÓN MÉDICA E INVESTIGACIÓN

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

*“EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS EN PLACENTA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
HIPERTENSIVA DEL EMBARAZO Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA”*

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

PRESENTADO POR

DRA. MALENY SANCHEZ FLORES

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

DIRECTOR DE TESIS

ALHELÍ RUÍZ MORALES

CIUDAD DE MÉXICO -2021 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



GOBIERNO DE LA
CIUDAD DE MÉXICO
CIUDAD INNOVADORA Y DE DERECHOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARIA DE SALUD DE LA CIUDAD DE MÉXICO

DIRECCIÓN DE FORMACIÓN, ACTUALIZACIÓN MÉDICA E INVESTIGACIÓN

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

*“EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS EN PLACENTA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
HIPERTENSIVA DEL EMBARAZO Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA”*

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

PRESENTADO POR

DRA. MALENY SANCHEZ FLORES

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

DIRECTOR DE TESIS

ALHELÍ RUÍZ MORALES

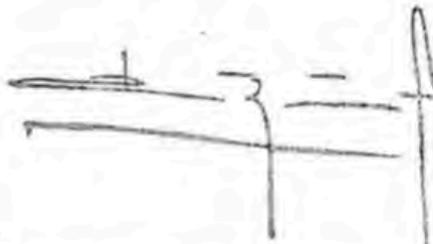
-2021 -

TITULO: Expresión de acuaporinas en placenta de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo y su importancia clínica.

Autor: Sánchez Flores Maleny



Vo. Bo. _____
Dr. Jesús Raymundo González DelMotte
Profesor Titular del Curso de Especialización en
Ginecología y Obstetricia.



Vo. Bo. _____
Dra. Lilia Elena Monroy Ramírez de Arellano
Directora de Formación, Actualización Médica e Investigación
Secretaría de Salud de la Ciudad de México



SECRETARÍA DE SALUD DE LA
CIUDAD DE MÉXICO

DIRECCIÓN DE FORMACIÓN,
ACTUALIZACIÓN MÉDICA E
INVESTIGACIÓN

TITULO: Expresión de acuaporinas en placenta de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo y su importancia clínica.

Autor: Sánchez Flores Maleny

Vo. Bo. _____



Dra. Alhelí Ruíz Morales
Director de tesis.

Médico adscrito del Hospital General Enrique Cabrera
Secretaría de Salud de la Ciudad de México.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO.

Lleno de regocijo, de amor y esperanza dedico este proyecto a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido pilares para seguir adelante.

Es una gran satisfacción poder dedicarles a ellos este nuevo logro de muchos venideros.

A mi madre Rosa por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros te los debo a ti, siempre habrá alguien que escuche mis quejas y alegrías, y que ponga atención a todas las aventuras que suceden en el transcurso de los días.

A mis hermanos Nancy y Armando por siempre acompañarme en este camino.

Alfredo agradezco que me motives constantemente para alcanzar mis anhelos, por tu amor infinito y por siempre oírme y acompañarme en cada momento de este nuevo reto. Un paso más; sigamos creciendo juntos.

A mis hermanos de vida Angie, Sam y Gil por acompañarme estos años y siempre darme ánimos para no rendirme, por escucharme siempre y darme ese abrazo de ánimo.

Así mismo un agradecimiento a las personas que contribuyeron a la realización de este proyecto y también a los baches en el camino que se presentaron y que hicieron de ello un reto, a la doctora Alhelí Ruiz por embarcarse en este viaje y confiar en mí, así como al Hospital General Enrique Cabrera sede de la residencia y siempre mi hogar y refugio durante estos 4 años y a todos los médicos adscritos por su interés en el estudio y todas las interrogantes que surgieron que conllevan a nuevas preguntas que sin duda serían importantes estudiar.

INDICE.

| | |
|--|----|
| 1. Resumen..... | 8 |
| 2. Introducción..... | 10 |
| 3. Marco teórico y antecedentes..... | 12 |
| 3.1 Preeclampsia..... | 12 |
| 3.2 Acuaporinas..... | 15 |
| 3.3 Descubrimiento de acuaporinas..... | 15 |
| 3.4 Estructura de acuaporinas..... | 16 |
| 3.5 Acuaporinas placentarias..... | 19 |
| 3.6 Regulación de oxígeno..... | 20 |
| 3.7 Acuaporinas placentarias y apoptosis..... | 20 |
| 4. Planteamiento del problema..... | 23 |
| 5. Justificación..... | 25 |
| 6. Hipótesis..... | 25 |
| 7. Objetivos..... | 26 |
| 8. Aspectos metodológicos..... | 26 |
| 8.1. Tipo de estudio..... | 26 |
| 8.2. Población de estudio..... | 26 |
| 8.3. Muestra..... | 31 |
| 8.4. Tipo de muestreo y estrategia de reclutamiento..... | 32 |
| 9. Resultados..... | 39 |
| 10. Análisis y discusión de resultados..... | 45 |
| 11. Conclusiones..... | 45 |
| 12. Implicaciones éticas..... | 47 |
| 13. Referencias bibliográficas..... | 48 |
| 14. Carta de consentimiento informado..... | 50 |
| 15. Tablas..... | 51 |
| 16. Anexos..... | 52 |

1. RESUMEN.

La incidencia de preeclampsia oscila entre 2-10% de los embarazos y varia en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia de preeclampsia es siete veces mayor en los países en desarrollo que en los desarrollados (2,8% y 0,4% de los nacidos vivos respectivamente) y es responsable de más de 200.000 muertes maternas por año en el mundo y se asocia con un aumento de 20 veces en la mortalidad perinatal. Por eso muchos científicos han desarrollado diversas investigaciones para responder la interrogante de cuáles son las causas para su aparición, pero hasta el momento no se las ha podido descubrir.

Continúa siendo la enfermedad de las teorías donde se han valorado diversos factores vasculoendoteliales, inmunológicos, genético-hereditarios, trombóticos, así como la mala adaptación placentaria y estrés oxidativo para explicar la fisiopatología de la enfermedad hipertensiva gravídica.

OBJETIVO. Identificar la expresión de la acuaporina 1 (AQP1) en la patogenia de los trastornos hipertensivos en el embarazo (hipertensión gestacional, preeclampsia y preeclampsia con datos de severidad) y analizar la relación entre la expresión y la correlación clínica.

MÉTODO: Estudio longitudinal, prospectivo, comparativo con área de investigación clínica tipo infinito con muestreo aleatorio simple.

RESULTADOS: La tasa de expresión positiva de AQP1 en tejidos placentarios del grupo de pacientes hipertensas embarazadas (85%, 17/20) fue significativamente mayor que la del grupo de embarazo normal (70%, 14/20). La tasa de expresión positiva de AQP1 en tejidos placentarios de mujeres embarazadas con preeclampsia severa (90%, 18/20) fue significativamente mayor que la de mujeres embarazadas con embarazo hipertensivo (80%,

16/20). La tasa de expresión positiva de AQP1 en la membrana fetal del grupo de trastorno hipertensivo (87%, 17/20) fue significativamente menor que la del grupo de embarazo normal (95% 19/20). La presencia de sintomatología asociada como ascitis, edema central y periférico se encontró presente en ambos grupos y no hubo significancia estadística.

CONCLUSIONES: El nivel de expresión de AQP1 de pacientes con preeclampsia aumenta en placenta y disminuye en membranas y mantiene correlación con el grado de enfermedad hipertensiva. Todo esto sugiere que los cambios en la expresión de AQP1 pueden desempeñar un papel importante en el inicio y desarrollo de enfermedad hipertensiva y pueden ser uno de los mecanismos que compliquen la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Preeclampsia, acuaporinas.

2. INTRODUCCION

Los trastornos hipertensivos del embarazo constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad materna y perinatal en el mundo; en particular, la Preeclampsia ocasiona 50,000 muertes maternas al año. Una mujer muere cada siete minutos por Preeclampsia, según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS)^{1,2}.

La mortalidad materna es inaceptablemente alta. Cada día mueren en todo el mundo unas 830 mujeres por complicaciones relacionadas con el embarazo o el parto. En 2015 se estimaron unas 303 000 muertes de mujeres durante el embarazo y el parto o después de ellos. Prácticamente todas estas muertes se producen en países de ingresos bajos y la mayoría de ellas podrían haberse evitado. La mayoría de las muertes maternas son evitables.³

En 2000, los Estados Miembros de las Naciones Unidas se comprometieron a trabajar para lograr una serie de Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), entre los que estaba la meta de reducir en un 75%, para 2015, la razón de mortalidad materna de 1990. Los Objetivos de Desarrollo Sostenible establecen una nueva agenda para la salud materna, destinada a acabar con la mortalidad materna prevenible; la meta 3.1 del ODS 3 consiste en reducir la RMM mundial a menos de 70 por 100 000 nacidos vivos para 2030⁴; según el último reporte de vigilancia epidemiológica de 2016 con los nacimientos corregidos por la DGIS se obtuvo una RMM Nacional de 36.7 MM por 100 mil nacidos vivos registrados; con la información de los nacimientos estimados por el CONAPO fue de 36.3 MM por 100 mil nacidos vivos.⁴

La preeclampsia es un trastorno exclusivo de la gestación humana y una de las complicaciones más preocupantes durante el embarazo, esta patología que tiene origen desconocido y está asociada a múltiples factores de riesgo, constituye uno de los principales problemas de Salud

Pública en nuestro país, que cobra grandes repercusiones en la práctica obstétrica-perinatal, es causante de una elevada morbimortalidad materna y fetal.

Este tipo de hipertensión en el embarazo constituye un amplio espectro de alteraciones en muchos sistemas, que producen consecuencias en el binomio madre-feto, y predisponen a una mayor morbi- mortalidad materna, fetal y neonatal.⁵

3. ANTECEDENTES.

La preeclampsia es un trastorno exclusivo de la gestación humana, cuya incidencia es causante de una elevada morbimortalidad materna y fetal. Se presenta en todas las poblaciones con una incidencia general que varía entre el 5 y el 7%. Según una estimación de la OMS, la preeclampsia es responsable de más de 200.000 muertes maternas por año en el mundo y se asocia con un aumento de 20 veces en la mortalidad perinatal.

Además, produce impacto a largo plazo no sólo por la morbilidad neonatal causada por los partos prematuros, sino también por el aumento del riesgo cardiovascular que tienen las madres e hijos que presentan o son producto de gestaciones complicadas con este síndrome.⁶ A pesar de su importancia en términos de salud pública y de décadas de investigación, los mecanismos patogénicos que involucran su desarrollo y su progresión no están totalmente determinados. Se la define sólo por la presencia de síntomas clínicos; su diagnóstico es poco robusto y su predicción hasta el momento no es posible.

Muchos estudios señalan a la placenta como partícipe necesaria en la patogénesis de la preeclampsia, ya que la enfermedad por lo general se resuelve dentro de 24-48 horas después de su expulsión. Aunque aún no se conoce el rol exacto de la placenta en el desarrollo de este desorden gestacional, se sabe que la placentación defectuosa es una de las características principales de este síndrome.⁷

La hipótesis actual sostiene que la preeclampsia es un desorden que puede ser considerado en dos etapas. En una primera etapa presenta una inadecuada perfusión placentaria resultante de la insuficiente invasión y diferenciación del trofoblasto y en la segunda, se

desarrolla el síndrome materno (etapa sintomática) como consecuencia de la liberación de factores generados por la placenta sometida a condiciones de estrés oxidativo.

Se ha propuesto al estrés oxidativo, generado por la hipoxia intermitente, como un componente crucial en la vinculación entre ambas etapas ya que estimularía la liberación de “toxinas”, como citoquinas, factores antiangiogénicos, macropartículas, etc, que posiblemente inducirían los efectos sistémicos observados en preeclampsia. ^{8,9}

En la actualidad se presentan altos índices de casos de preeclampsia en la Ciudad de México pese a ser una zona urbana con accesibilidad a los sistemas de salud, el Hospital Gineco-Obstétrico Enrique Cabrera cuenta con una alta incidencia presentando complicaciones graves durante la gestación como desprendimiento prematuro de placenta, partos pretérminos, muerte fetal y neonatal, restricción del crecimiento intrauterino, entre otros. En la madre se presentan consecuencias fatales como la eclampsia, síndrome de Hellp, coagulación intravascular diseminada, hemorragia cerebral, insuficiencia renal aguda, shock y mortalidad.

Como la preeclampsia es una patología de alto riesgo en el embarazo que aún no se puede evitar, el principal objetivo de este trabajo es identificar a nivel estructural el papel que cobra la presencia de acuaporinas como moléculas de anclaje y señalización como ligandos que favorezcan un mayor desarrollo para su aparición y contribuir a evitar las complicaciones que puede llevar a la muerte materna y neonatal.

3.1 . PREECLAMPSIA.

La preeclampsia es un trastorno del embarazo asociado con hipertensión de inicio reciente, que ocurre con mayor frecuencia después de 20 semanas de gestación y frecuentemente cerca del término. A pesar de que a menudo es acompañado de proteinuria de nueva aparición, la hipertensión y otros signos o síntomas de preeclampsia pueden presentarse en algunas mujeres en ausencia de proteinuria ¹⁰. Los criterios diagnósticos de preeclampsia fueron modificados por la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP) en 2014.

ISSHP define la preeclampsia como hipertensión de novo presente después de 20 semanas de gestación combinada con proteinuria (> 300 mg / día), otras disfunciones de órganos maternos, como insuficiencia renal, afectación hepática, complicaciones neurológicas o hematológicas, disfunción uteroplacentaria o restricción del crecimiento fetal.

De acuerdo a la ACOG la proteinuria ya no es necesaria para el diagnóstico de preeclampsia, definida como proteinuria ≥ 300 mg en una recolección de orina de 24 horas o en tira reactiva de por lo menos 30 mg/dL (+) en dos muestras de orina tomadas al azar con diferencia de seis horas entre cada una, pero en un lapso no mayor de siete días, sin evidencia de infección de vías urinarias, ahora existen dos categorías separadas la preeclampsia proteinúrica y no proteinúrica. La hipertensión se define como presión arterial sistólica superior a 140 mm Hg o presión arterial diastólica superior a 90 mm Hg en dos ocasiones que tienen una separación de 4 a 6 h. La presión arterial debe medirse en posición sentada y erguida o en decúbito lateral izquierdo, usando un manguito de tamaño apropiado y dispositivos oscilométricos manuales o semiautomáticos que están validados para su uso en preeclampsia (dispositivos Omron T9P

u Omron MIT Elite). La preeclampsia superpuesta se diagnostica cuando las mujeres con hipertensión idiopática subyacente presente con una o más de las características anteriores¹¹.

3.2 ACUAPORINAS.

El agua es el elemento constituyente predominante en el ser humano, la dinámica molecular que se presenta a nivel celular era hasta hace pocos años un misterio, como también el mecanismo de transporte a través de la membrana lipídica, puesto que este transporte de manera interesante se presenta con mínimos cambios osmóticos.

Inicialmente se consideró que todo el transporte correspondía con el mecanismo de difusión simple, sin embargo, el alto gasto de energía que supone transportar agua a través de la membrana lipídica supuso la existencia de un método de transporte con menos gasto y más sencillo. Las acuaporinas constituyen una familia de proteínas que se caracterizan por formar poros que se encuentran en las membranas celulares atravesándolas y permitiendo el paso de agua a través del estrecho canal que forman en su interior. ¹²

El nombre se adoptó oficialmente en 1997 por parte de la Organización del Genoma Humano, el número se les asigna siguiendo un orden secuencial que corresponde a la cronología de su descubrimiento.

3.3 DESCUBRIMIENTO DE LAS ACUAPORINAS

En 2003, Peter Agre investigador de la Universidad Johns Hopkins recibió el Premio Nobel de Química por haber identificado una proteína que permite el pasaje selectivo de agua a través de la membrana celular, a la cual denominó “acuaporina”, la cual resultó ser una proteína

tetramérica de 28 kD que opera como canal selectivo para el tránsito de agua.

A partir de ahí la investigación alrededor de estas proteínas se ha incrementado notablemente y en la actualidad se han determinado gran parte de sus características moleculares y funcionales y se han descubierto varios miembros adicionales de esta familia, presentes a lo largo de toda la escala filogenética. ¹³.

3.4 ESTRUCTURA DE ACUAPORINAS

Las AQP son proteínas transmembranosas que delimitan un canal de 2 nm de largo por 0,3 nm de ancho, por lo cual solamente puede ser atravesado por moléculas de agua. Los iones, incluso el ion hidróxido y los protones, no pueden pasar a través de este canal, cuyo diámetro de aproximadamente 0,28 nm, es sensiblemente menor al tamaño de cualquier ion hidratado.

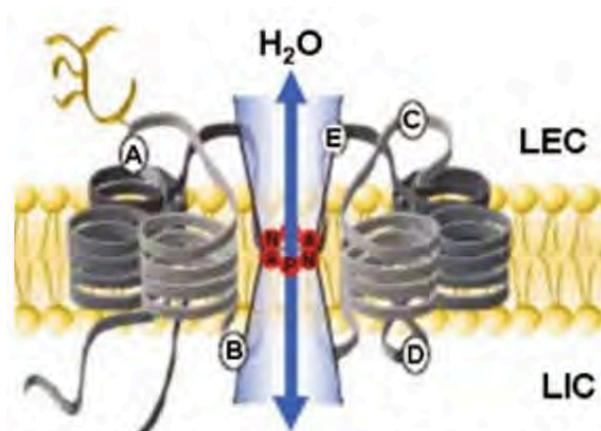


Figura 1. Estructura molecular del monómero de AQP1. Existen dos grandes dominios, imágenes especulares uno de otro, con seis alfa-hélices que atraviesan la membrana, unidos por cinco lazos (A,B,C,D,E). Los lazos B y E portan tripletes asparagina-prolina-alanina (NPA), característicos de todas las AQP. Las flechas indican el sentido del pasaje de agua por el poro acuoso, hacia los líquidos extra e intracelular (LEC, LIC). Echevarría & Zardoya,2006.

El bloqueo del pasaje de iones y solutos cargados previene la disipación del gradiente electroquímico a través de la membrana celular; Se calcula que las AQP son capaces de transportar 3 mil millones de moléculas de agua por segundo. Así, una porción de membrana de 10 cm² filtraría un litro de agua en unos 7 segundos.¹²

Hasta el momento se han descrito once tipos de AQP, las cuales comparten similitudes estructurales y se relacionan con una diversidad de enfermedades en diversos sistemas.

Las acuaporinas son una familia de proteínas de la membrana celular del canal de agua ampliamente distribuidas y su expresión se ha encontrado tanto en la placenta como en las membranas fetales. Sin embargo, la función de las AQP en estos tejidos no se ha determinado completamente.

Dado que no se sabe que la preeclampsia esté asociada con un flujo de agua alterado entre la madre y el feto se ha propuesto que las AQP podrían no tener un papel clave en el transporte de agua a través de la placenta humana, en este contexto, estudios recientes han revelado funciones celulares inesperadas como la participación en la fisiología de los orgánulos, la proliferación, la apoptosis y la migración celular, los cuales están alterados en placentas por embarazos complicados por preeclampsia .

Así mismo se ha analizado su papel en la muerte celular programada placentaria, asociando el incremento en la expresión con la apoptosis del trofoblasto desencadenando manifestaciones clínicas.

Se ha explorado el papel de la AQP 3, 9 y 4 principalmente en membranas placentarias; Sin

embargo, hasta ahora, no se estudió la expresión de AQP1 en tejido placentario ni analizando la diferencia de expresión en los diferentes estadios de la enfermedad hipertensiva (hipertensión gestacional, preeclampsia y preeclampsia con datos de severidad) ¹³

| Tipo de acuaporina | Particularidades | Localización | Enfermedades asociadas |
|--------------------|---|--|--|
| AQP0 | Función estructural intercelular | Cristalino | Cataratas congénitas |
| AQP1 | Expresión poco selectiva | Eritrocitos TPR (m. apical) SDD asa de Henle Endotelio Epitelios en general (excepto TDR y glándula salival) | Edema pulmonar Edema periférico Edema cerebral Glaucoma |
| AQP2 | Dependiente de ADH. | TDR (m. apical) y TCR (c. principales, m. apical) | Diabetes insípida nefrogénica |
| AQP3 | Regulada por ADH Permeable a glicerol. | TPR (m. basolateral) y TCR (c. principales, m. basolateral) Epitelio bronquial Piel Epitelios oculares | No definida |
| AQP4 | Insensible a mercuriales | C. gliales en cerebro Fibras musculares TCR (c. principales, m. basolateral) | Edema cerebral |
| AQP5 | Regula proporción de agua en secreciones glandulares | Epitelios glandulares en general Neumocitos tipo I Epitelio corneal | Asma bronquial Bronquitis crónica Síndrome de Sjögren |
| AQP6 | Localizada en membranas intracelulares Insensible a mercuriales Permeable a aniones | TC renal (c. intercaladas) | No definida |
| AQP7 | Permeable a glicerol Posible papel en control metabólico | Tejido adiposo Testículo TP renal (m. apical) | No definida |
| AQP8 | Exclusivamente localizada en membranas intracelulares Permeable a urea | TPR y TCR Epitelios en yeyuno, ileon y colon Epitelio bronquial Glándulas salivares Hepatocitos Testículo | No definida |
| AQP9 | Permeable a glicerol | Hepatocitos Leucocitos | No definida |
| AQP10 | Posible papel en control metabólico | Epitelios en duodeno y yeyuno | No definida |

TPR = túbulo proximal renal, TCR = túbulo colector renal, TDR = túbulo distal renal; SDD = segmento descendente delgado, c. = células, m. = membrana.

Figura 2. Características principales particulares de las 11 acuaporinas conocidas, incluyendo su localización y las enfermedades con las cuales se ha definido una asociación.

3.5 ACUAPORINAS PLACENTARIAS

Una de las funciones primordiales de la placenta es promover el transporte selectivo de nutrientes entre la madre y el feto. Esta función depende exclusivamente de la exitosa formación y expansión del sincitiotrofoblasto, que controla los movimientos transcelulares de agua y solutos, mantiene la homeostasis y asegura el normal crecimiento fetal.

En lo que se refiere al flujo de agua, los requerimientos fetales aumentan con el avance de la gestación. En la mayoría de los tejidos el transporte transcelular de agua está mediado por las AQP. Estas proteínas aumentan entre 5 a 50 veces la permeabilidad al agua. En mamíferos se han identificado 13 isoformas de AQP que se encuentran distribuidas en una gran variedad de órganos y tejidos.¹⁴

Según su estructura y función se las clasifica en 3 subgrupos:

1. *AQP clásicas*: comprenden las AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6, y 8. Presentan selectividad solo al agua. Dada su estructura molecular se incluyen en este subgrupo la AQP6, que además de agua, es permeable a aniones, y la AQP8 que permite también el pasaje de urea.

2. *Acuagliceroporinas*: pertenecen a este subgrupo las AQP3, 7, 9 y 10. Son permeables al agua, urea y glicerol. La AQP9 facilita además el flujo de solutos neutros como monocarboxilatos, purinas y pirimidinas.

3. *Superacuaporinas*: aquí se incluyen las AQP11 y 12. Estas proteínas se localizan en el citoplasma y posiblemente estarían involucradas en la regulación del transporte intracelular de agua, en la regulación del volumen de organelos y en la homeostasis intravesicular.^{10,11}

3.6 REGULACIÓN DE OXÍGENO.

Es bien sabido que la diferenciación del trofoblasto está regulada por el oxígeno. Durante embarazos normales, la placentación ocurre en un ambiente relativamente hipóxico.

El factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) puede contribuir a la adaptación de la placenta a las fluctuaciones en las tensiones de oxígeno. En condiciones patológicas, la hipoxia intermitente debido a la disminución del flujo sanguíneo materno hacia el espacio intravelloso puede producir un ataque de isquemia/ re perfusión en la placenta.

Dado que la hipoxia controla la expresión de muchos genes implicados en la adaptación celular al estrés, se estudió la regulación de las AQP placentarias por el oxígeno. ¹⁵

3.7 ACUAPORINAS PLACENTARIAS Y APOPTOSIS.

La apoptosis del trofoblasto aumenta progresivamente durante la gestación. Este proceso fisiológico es necesario para la renovación normal del trofoblasto veloso y comprende la fusión de las células de cito trofoblastos mononucleares en el sincitio multinucleado. Estos eventos conducen a la liberación en la circulación materna de agregados sincitiales, que aumentan progresivamente durante el embarazo normal y no dañan a la madre.

En embarazos complicados por preeclampsia, la apoptosis del trofoblasto veloso se exagera en comparación con los embarazos normo tensos, Se propuso que un equilibrio alterado entre proliferación y apoptosis podría aumentar la formación de agregados sincitiales que se vierten en la circulación materna. Esto favorece los procesos inmunológicos e inflamatorios de la madre y promueve la disfunción endotelial sistémica. La lesión producida por isquemia/re

perfusión es causada principalmente por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), que causarían un daño indiscriminado sobre los lípidos, las proteínas y el ADN. En el caso de la placenta, estos daños conducirían a una función placentaria alterada por la modificación covalente de la estructura y función de las proteínas, como así también a un aumento en la velocidad de apoptosis del sincitiotrofoblasto, que desencadenaría el cuadro clínico. ^{15,16}

Numerosas evidencias involucran a las AQP en los procesos de apoptosis o muerte celular programada, específicamente en la reducción del volumen celular. Sin embargo, los mecanismos que desencadenan estos cambios en el volumen celular permanecen sin esclarecerse. La salida del agua del interior de la célula durante la apoptosis es similar a lo que ocurre en las células sometidas a estrés hipertónico.

Durante el estrés hipertónico las células rápidamente se contraen y al mismo tiempo comienzan los mecanismos de recuperación del volumen intracelular, con la salida de iones K⁺. Sin embargo, las células apoptóticas son incapaces de activar estos mecanismos. Si bien las causas no se conocen, se cree que las AQP de membrana estarían inactivas cerrando así el paso para la entrada de agua y la siguiente recuperación del volumen intracelular. ^{13,15}

En embarazos normales, la muerte celular programada es un proceso fisiológico que aumenta progresivamente a medida que avanza la gestación. Se ha propuesto que este proceso jugaría un papel esencial en la diferenciación, la sincialización y la degeneración del trofoblasto vellosos. Por otra parte, en preeclampsia, algunos autores han observado un incremento exacerbado de la apoptosis del trofoblasto. Aunque aún se desconocen las causas exactas de

este aumento, se sugiere que la hipoxia intermitente podría ser la responsable de estos eventos.

Los experimentos funcionales mostraron que luego de la inducción de la apoptosis, las AQP estaban inactivas, al igual que lo que observamos previamente en placentas preeclámpticas. La inactivación de las AQP después de la reducción del volumen celular sería crucial y necesaria para mantener la baja concentración de K^+ , que conducirá finalmente a la activación de las enzimas apoptóticas como las caspasas y nucleasas.¹⁶

Estos resultados nos sugieren que las AQP podrían participar en la muerte celular programada, ya que su bloqueo evitaría el inicio de la reducción del volumen celular y la sucesiva cascada de eventos apoptóticos. Sin embargo, se requerirán más estudios para determinar qué isoforma de AQP está directamente involucrada en estos procesos.¹⁷

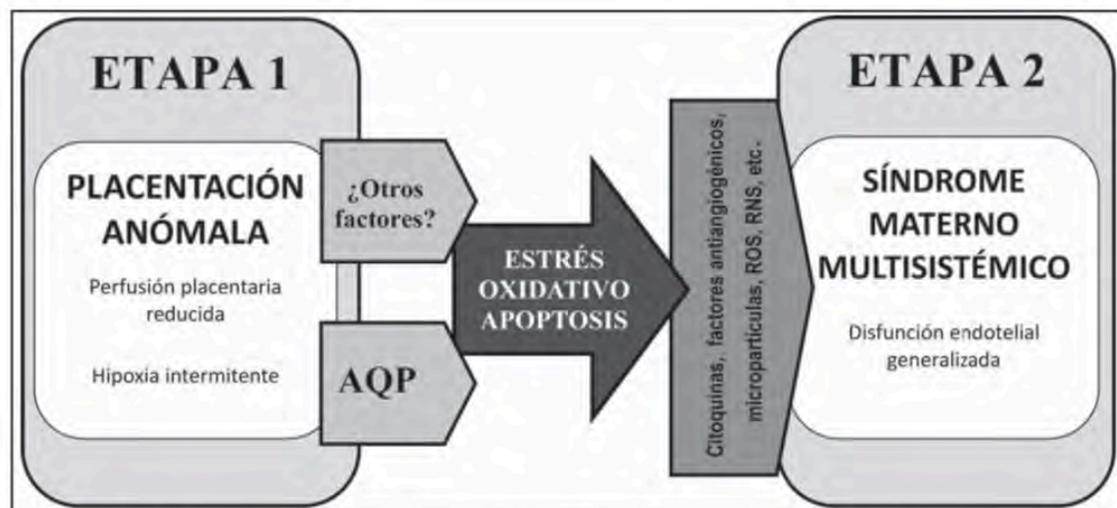


Figura 3. Modelo de dos etapas de la fisiopatología de la preeclampsia: posible rol de las acuaporinas placentarias (modificado y adaptado de Roberts JM y cols.)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que la placenta ocupa un lugar central en este desorden, se propone que las alteraciones en su función podrían contribuir al desarrollo de este síndrome.

Una de las funciones primordiales de la placenta es promover el intercambio de solutos y agua entre la madre y el feto. Se sabe que el transporte transcelular de agua está facilitado por proteínas conocidas como acuaporinas (AQP). Numerosas evidencias muestran que estas proteínas no son meros canales de agua, sino que estarían implicadas en otros roles a nivel celular.

4.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La tasa de expresión de las acuaporinas es mayor cuando se asocia algún trastorno hipertensivos del embarazo?

5. JUSTIFICACIÓN

En México, la preeclampsia constituye la principal causa de muerte materna en las instituciones que conforman el Sistema Nacional de Salud. Se presentan 2.1 millones de embarazos cada año y cerca de 250 000 a 300 000 tienen complicaciones, en consecuencia, cada año 30 000 mujeres quedan con secuelas obstétricas que las convierten en discapacitadas. Sin embargo, aunque el 85% de las defunciones maternas son prevenibles, en promedio, aún fallecen anualmente 1000 mujeres.

Existe una alta incidencia de trastornos hipertensivos, siendo una de las principales causas de

morbi-mortalidad en nuestro país, debido a que la secretaria de salud de la Ciudad de México abarca una gran estadística en el número de pacientes obstétricas se pretende iniciar una línea de investigación para asociar los cambios en la expresión y funcionalidad de las acuaporinas, en especial la más común AQP-1 como uno de los factores involucrados en el desencadenamiento de las manifestaciones clínicas de este desorden gestacional hipertensivo.

Si las acuaporinas no son meros canales de agua y se encuentran involucrados en roles de interacción celular se podría analizar la implicación o los ligandos asociados.

La mayoría de los artículos publicados solo hacen la diferenciación de pacientes sanas y con preeclampsia con datos de severidad sin embargo la expresión de la enfermedad en los diferentes estadios involucra características clínicas diferentes, quizá los aspectos moleculares sean los mismos en los diferentes estadios o quizá exista una forma de frenar los cambios y evitar la progresión de la enfermedad.

Para poder desarrollar nuevas alternativas al tratamiento de la preeclampsia, ya sea para prevenir o retrasar el desarrollo de esta, es necesario comprender los mecanismos patológicos involucrados.

El gobierno de México, en conjunto con otras organizaciones, ha manifestado su preocupación por alcanzar el tercer objetivo de desarrollo sostenible de la OMS para mejorar la calidad de la atención de la salud materna y lograr la meta de disminuir la tasa de mortalidad materna a 70 por cada 100 000 nacidos vivos para el año 2030. En la actualidad en nuestro país, se presentan 2.1 millones de embarazos cada año, de los cuales 300,000 tienen complicaciones obstétricas.

El impacto de estas complicaciones es importante, debido a que 30,000 mujeres quedan con secuelas obstétricas y discapacidad crónica, falleciendo anualmente 1,100 de ellas, con una secuela social de 3,000 huérfanos por año.

6. HIPÓTESIS

La expresión de acuaporinas es mayor ante la presencia de algún trastorno hipertensivo que en pacientes sanas, así mismo entre los trastornos hipertensivos la preeclampsia con datos de severidad es la que reúne mayor expresión.

7. OBJETIVOS.

7.1 Objetivo general.

Identificar la expresión de la acuaporina 1 (AQP1) en la patogenia de los trastornos hipertensivos en el embarazo (hipertensión gestacional, preeclampsia y preeclampsia con datos de severidad) y analizar la relación entre la expresión y la correlación clínica.

7.2 Objetivos específicos

7.2.1 Explorar el papel de la acuaporina en los trastornos hipertensivos asociados al embarazo.

7.2.2 Comparar la expresión de acuaporinas en pacientes sanos y con trastornos hipertensivos

7.2.3 Determinar la presencia de acuaporina por medio de inmunofluorescencia

7.2.4 Analizar la presencia de acuaporina con la expresión de manifestaciones clínicas.

8. METODOLOGÍA.

8.1 TIPO DE ESTUDIO.

Estudio longitudinal, prospectivo, comparativo con área de investigación clínica tipo infinito con muestreo aleatorio simple

8.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se reclutaron 20 pacientes del Hospital Enrique Cabrera en la Ciudad de México el cual abarca población embarazadas como segundo y tercer nivel de atención de las alcaldías Alvaro Obregón siendo sitio de referencia de embarazo de alto riesgo.

El universo de trabajo estará constituido por pacientes embarazadas, en total 80 pacientes embarazadas, 20 pacientes sanas con embarazo de término, 20 con hipertensión gestacional, 20 con preeclampsia con datos de severidad y 20 con preeclampsia sin datos de severidad que reciban atención médica en la consulta de Obstetricia y el departamento de Embarazo de Alto Riesgo durante el lapso del 01 de enero 2020 al 30 de marzo 2020 y que cumplan con los criterios de inclusión de acuerdo a guías de práctica clínica.

De las 80 pacientes se eligieron por muestreo aleatorio a 5 pacientes de cada grupo para generar un total de 20 pacientes embarazadas sin comorbilidades asociadas con edad de 18 a 34 años y edad gestacional de 37 a 40.6 semanas, 5 pacientes sanas, 5 con hipertensión gestacional, 5 con preeclampsia con datos de severidad y 5 con preeclampsia sin datos de severidad.

Se analizará la condición clínica de la paciente al ingreso, los síntomas acompañantes, así como los paraclínicos al momento del ingreso y el resultado perinatal.

Se analizará el rol que presenta la acuaporina 1, se realizará western blot e inmunofluorescencia con ayuda del Instituto Nacional de Pediatría para el procesamiento de las muestras.

8.2.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN.

8.2.1.1 Criterios de inclusión.

GRUPO A. CONTROL.

-Mujeres de la secretaria de salud de la Ciudad de México.

-Tratadas en Hospital Enrique Cabrera

-Embarazo de término (37-40 semanas)

-Nacionalidad mexicana

-De 18-34 años de edad.

-IMC 18.4 a 29

GRUPO B. HIPERTENSIÓN GESTACIONAL

-Presión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg y/o presión arterial diastólica mayor o igual a 90mmHg en una mujer previamente normotensa después de la semana 20.

-Se requieren por lo menos 2 tomas con diferencia de 4 horas entre cada una.

-Proteinuria negativa

-En el postparto (12 semanas) cifras tensionales normales (hipertensión transitoria).

GRUPO C. PREECLAMPSIA

-Presión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg y/o presión arterial diastólica mayor o igual a 90mmHg en una mujer previamente normo tensa.

-Se requieren por lo menos 2 tomas con diferencia de 4 horas entre cada una con la paciente en reposo en embarazo mayor a 20 semanas o hasta 2 semanas postparto.

-Proteinuria mayor o igual de 300mg en una recolección de orina de 24 horas o reporte en tira reactiva de (+) sin evidencia de infección de vías urinarias.

-Relación proteína/creatinina >0.3

-Trombocitopenia: plaquetas $100000 \times 10^9/L$

-Insuficiencia renal: creatinina sérica mayor 1.1mg/dl o una duplicación en la concentración de creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal.

-Función hepática alterada: concentraciones sanguíneas elevadas de transaminasas 2 veces su valor normal

GRUPO D. PREECLAMPSIA CON DATOS DE SEVERIDAD

-Presión arterial mayor o igual a 160/110mmHg en al menos 2 determinaciones con por lo menos 15 min de diferencia en el mismo brazo sin el uso de antihipertensivos previos.

-Alteraciones visuales (visión borrosa, fosfenos, papiledema, ceguera cortical, desprendimiento de retina)

-Cefalea de nueva aparición que no responde a fármacos sin diagnósticos alternativos

-Hipertensión severa no controlada con 3 fármacos

-Saturación de oxígeno <90%, necesidad de oxígeno suplementario para mantener >50% por 1 hora, intubación

-Dolor hipocondrio derecho persistente no responde a medicamentos y sin diagnósticos alternativos, vómito, hipersensibilidad hepática, disfunción hepática (INR >2 en ausencia de CID) DHL >600UL/ml, hematoma hepático o ruptura

-Clonus mayor o igual +++

-Pruebas de funcionamiento hepática alteradas (incremento de LDL, AST y ALT)

-Trombocitopenia: plaquetas 50,000cel/mm³ o necesidad de transfusión.

--Insuficiencia renal: creatinina sérica mayor 1.1mg/dl o una duplicación en la concentración de creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal o diálisis.

-Desprendimiento de placenta normoinserta, onda A reversa del ductus venoso, muerte fetal.

8.2.1.2 Criterios de exclusión.

- Familiares de primer grado con preeclampsia
- Antecedente de elevación de presión arterial
- Cualquier enfermedad crónico-degenerativos.
- Hipertensión crónica
- Hipertensión aislada y de bata blanca.
- Pacientes que no cumplan estrictamente los criterios para su clasificación (hipertensión gestacional, preeclampsia y preeclampsia con datos de severidad)
- Síndrome de Hellp y eclampsia
- Embarazo gemelar
- Extremos de edad (menores de 18 años y mayores de 35 años)
- IMC mayor a 29
- Enfermedades infecciosas(corioamnioitis, VIH)
- Síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible, accidente cerebral vascular, ataque isquémico transitorio, déficit neurológico reversible <48h.
- Edema agudo pulmonar, soporte inotrópico positivo, isquemia miocárdica o infarto.

8.2.1.3 Criterios de interrupción y de eliminación

-Aquellas mujeres a las que se les agregue cualquier otra patología ya sea crónica o por alteraciones bioquímicas.

-Pacientes que ya no deseen participar en el estudio, en cuyo caso la muestra obtenida sería desechada

-Pacientes en los que la muestra fuera dañada, almacenada de manera incorrecta o fuera insuficiente para realizar su análisis.

8.3 MUESTRA

El cálculo de la muestra se realizara utilizando la fórmula de muestreo para población finita utilizando la incidencia de preeclampsia reportada en la literatura, la cual es de 5%.

Por lo tanto, se utilizó la siguiente:

Fórmula: $n = Z_a^2 pq / d^2$ Donde:

n = Tamaño de la muestra

Z_a = Valor correspondiente a la distribución de la curva d Gauss: 1.96

(nivel de confianza del 95%)

p = Frecuencia esperada del fenómeno (Prevalencia reportada: 5%= 0.05)

q = 1 – p = 1-0.05

d = Precisión o error admitido 5% = 0.05

Por lo tanto:

$$n = 1.96^2 \times 0.05 (1-0.05) / 0.05^2$$

$$n = 3.8416 \times 0.05 \times 0.95 / 0.0025$$

$$n = 3.8416 \times 0.0099 / 0.0025$$

$$n = 0.1824 / 0.0025 \quad n = 72.96$$

Sin embargo, por considerarse un proyecto de investigación se tomaron en cuenta 80 pacientes para un muestreo aleatorio obteniendo un total de 20 y de ellas 5 en cada grupo considerando los antecedentes del total de las muestras en los artículos de investigación similares.

8.4 MEDICIONES E INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN.

Procedimientos

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en diferentes etapas.

Etapas 1. Obtención de material biológico.

Se obtuvieron placentas las cuales se clasificaron de acuerdo a las características clínicas y bioquímicas, fueron obtenidas previo consentimiento minutos después de la resolución del embarazo, en condiciones asépticas. Se obtuvieron muestras de 2 cm x 2cm en el grosor del cotiledón en su parte media con cortes finos preservando los bordes, se colocaron en 3 frascos, el primero en solución Karnovsky, paraformaldehído al 4% y una parte, previo lavado con solución de PBS (2.68mM KCL, 1.7mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl, 1.45mM Na₂HPO₄ pH 7.4) en solución hexano para la extracción del RNA, proteínas y para la realización de laminillas usadas en inmunofluorescencia.

Etapa 2. Procesamiento de las muestras en laboratorio.

Primer paso. Extracción del RNA.

El RNA del tejido placentario se extrajo utilizando TRIZOL (GIBCO-BRL)

Se colocó de 50-100mg de tejido fresco en 1ml de TRizol y se homogenizó perfectamente; se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se incubó por 5 min de 15-30°C. posteriormente se adicionaron 0.2ml de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se agitó vigorosamente, se incubó de 15-30°C por 3 min y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 0.5mL de alcohol isopropílico, se incubó de 15-30°C por 10 min y se centrifugó durante 5min a 7,500g a 4°C, se decantó el sobrenadante y el precipitado de RNA se dejó secar de 5-10min a temperatura ambiente. El precipitado se disolvió en 0.1mL de agua ultrapura libre de RNAsan y se incubó por 10 min a 55-60°C. La concentración de RNA de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 750nm. EL RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

Segundo paso: Diseño de primers.

Se diseñaron pares de oligonucleótidos o “primers” para generar la amplificación de AQP-1 en placenta, los primers se diseñaron con el programa Vector NTI advance a partir de la secuencia de RNAm de AQP-1.

se amplificó un fragmento AQP1 de 300 pb con el cebador directo, 5'-GCCATCGGCCTCTCTGTAGCC-3 'y el cebador inverso, 5'-CTATTTGGGCTTCATCTCCAC-3' (Operon, Alameda, Calif). Se amplificó un fragmento AQP3 de 117 pb con el cebador directo,

5'-CCGCCTTTTACAGCCCTTG-3', y el cebador inverso, 5'-GGCGGAAAAATGTCGGGAAC-3' (Operon).

Tercer paso: Amplificación de RNA por RT-PCR

El RNA obtenido se empleó para realizar los ensayos RT-PCR. Para realizar la conversión de RNA a DNA complementario (cDNA) se utilizó 1µl de primers y 500 ng de RNA. Las muestras se incubaron a 94°C por 5 min. Posteriormente se adicionó la mezcla de reacción la cual contiene 4µl de buffer de RT (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2µl de ditionitritol 0.1M (DTT), 0.9 µl de transcriptasa reversa (40U/µl superScript II de GIBCO-BRL) y 0.7µl de dNTPs 10mM. La secuencia de amplificación fue de 25°C por 10min, 42°C durante 60 min y finalmente 70°C por 15 min. El cDNA se incubó durante 20min con 0.8µl de ribonucleasa H (RNasa H 2 U/µl, Invitrogen) a 37°C para degradar las cadenas híbridas. Se emplearon 2µl de cDNA para el ensayo de PCR con las condiciones de amplificación: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 4 min, alineamiento a 56°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Las secuencias amplificadas se corrieron en un gel de agarosa a 2% teñidos con 0.5 µg/ml de EtBr. La visualización de los productos amplificados se realizó utilizando el programa Kodak 1D Image Software 3.5 system utilizando los parámetros estándar de programa.

Cuarto paso: Extracción de proteínas.

Se extrajeron proteínas totales del tejido placentario, cada muestra se homogenizó con buffer de extracción de proteínas (2% SDS, 2mM EDTA, 2mM EGTA y mM Tris, pH7.2) e inhibidores de proteasas (aprotinina, inhibidor de tripsina, leupetina (10µg/ml) y PMSF (100µM). Los tejidos fueron macerados 20 veces en un homogenizador, el homogenado se transfirió a un tubo de

1.5ml y se hirvió durante 5min. Una vez hervidas las muestras se centrifugan a 10000 rpm (9600g), 10min a 4°C y se recuperó el sobranste. Las proteínas se almacenan a -70°C hasta su uso.

Quinto paso: Cuantificación de proteínas.

Para cuantificación de proteínas se empleó el Kit Aquaporin 1 antibody / 1/a5f6. 0.1mg Bio Rad. Se realizó una curva estándar de concentraciones graduales de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2mg/ml, de albúmina. Se tomaron 10µl de cada dilución, así como de cada una de las muestras y se agregaron 50µl del reactivo A y 400µl del reactivo B y se dejó reaccionar por 15min. Se midió la absorbancia a 750nm en un espectrofotómetro. Con las absorbancias obtenidas de la curva estándar se realizó una regresión lineal para obtener una curva que permitió calcular la concentración de proteína obtenida en cada una de las diferentes muestras. Se emplearon concentraciones de 5, 25 y 40µg.

Sexto paso: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para realizar la electroforesis se preparó un gel de poliacrilamida al 10%. Se colocaron 10ml de “resolving gel” (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS y 0.04% TEMED) en la cámara de electroforesis. Una vez polimerizado se colocaron 2ml de “stacking gel” al 4%, (4% acrilamida, 0.126M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% TEMED). En seguida se colocó el peine de 10 pozos y se dejó polimerizar otros 20min, se colocó el buffer de corrida (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.5-8.7) y se cargaron las diferentes muestras en los pozos colocando las proteínas más el buffer de carga (0.125 M Tris, 4% SDS, glicerol, 10% mercaptoetanol) en cada uno, se corrieron a 40mA durante 1 hora.

Séptimo paso: Transferencia.

Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) donde quedan inmobilizadas. En gel y la membrana se colocan en papel filtro saturado de buffer de transferencia (0.025M Tris, 0.192M glicina, 20% metanol). Este “sándwich” se trasladó al equipo ECL Semi –Dry Transfer Unit y se aplicaron 30V durante 60min.

Octavo paso: Western Blot.

Después de la transferencia la membrana se incubó en leche al 10% en TBST (10mM Tris, 150mM NaCl y 0.05% Tween, pH 8.0) durante 12 horas. Se colocó el anticuerpo primario conejo anti-AQP1 (1:3000, Vector) en TBST durante 1 hora. Se incubó la membrana con el reactivo AB (Bio Rad) durante 30 min. Después de cada incubación se realizaron 3 lavados con TBST por 5 minutos. Para revelar la membrana, ésta se extendió entre dos acetatos y se colocó sobre la membrana el reactivo de Amersham ECL durante 2 min protegido de la luz. Posteriormente se coloca sobre el acetato una película de Hyperfilm ECL por 3 min de exposición para capturar la señal del anticuerpo. Después de retirar la película se sumerge en revelador durante 1 minuto, se lava con agua por 1 min, con fijador 1 min y finalmente con agua. El proceso se realizó en cuarto oscuro. Finalmente, la membrana fue reutilizada, previo a tratamiento con solución para desnudar membrana (10mM β -mercaptoetanol, 5mM Tris-HCL, SDS 2%), 30min a 50°C con anticuerpo primario de ratón anti-actina (1:40.000) y biotina anti-raton (1:300) para normalización.

Noveno paso: Inmunofluorescencia.

En portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina se realizaron extensiones de tejido placentario para separarlo. Las laminillas preparadas con el tejido se dejaron secar al menos una hora y posteriormente se fijaron durante 10 min con metanol 15 min con paraformaldehído 4% en buffer fosfatos (0.1 M NaH₂PO₄ y 0.1M Na₂HPO₄, pH 7.4). se bloquearon con leche al 10% en PBS a 4°C durante 3 horas, posteriormente se colocó el primer anticuerpo conejo anti-AQP diluido en PBS con 10µl de leche al 10% y 1.5µl de Tween 20, en cámara húmeda toda la noche a 4°C. se colocó el reactivo AB durante 30min en cámara húmeda y posteriormente se reveló el marcaje con DAB (3,3´-diaminobenzidina) durante 7 min. Después de cada incubación se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min.

Posteriormente se colocó conejo anti biotina (1:300) por 1 hora y fluorescencia (1:1000) por 30 min. También se realizó el marcaje con ratón anti-actina (1:1500) se incubaron de 2-3 horas se lavó 3 veces con PBS y se montaron con VectaShield para su observación en el microscopio de fluorescencia. Para el control negativo no se colocó el primer anticuerpo.

Los tejidos se cortaron en trozos pequeños y se fijaron en para formaldehído al 4 % durante 4 horas. Las muestras se crioprotegieron durante la noche con PBS que contenía sacarosa al 30% embebido en compuesto de ornitina carbamoiltransferasa y congelado en nitrógeno líquido.

Las secciones de criostato (4-6 µm) se incubaron durante 10 minutos con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Los portaobjetos se enjuagaron con cloruro de sodio al 2,7% y luego con PBS y luego se incubaron durante 30 minutos con el fragmento F (ab) 2 de oveja

anti-conejo conjugado con Cy3 (1: 200, Sigma) con una dilución 1: 500 de suero inmune o preinmune toda la noche a 4 ° C. Los portaobjetos se incubaron luego con un anticuerpo anti-conejo de oveja conjugado con fluoresceína secundario.

Etapa 3. Análisis de secuencias de acuaporina

Se realizó una búsqueda en la base de datos para obtener la secuencia codificante de acuaporina1.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa Clustal W con secuencias de acuaporina de distintas especies.

Una vez alineadas se buscaron los dominios conservados entre las secuencias y se generó un árbol filogenético entre las proteínas. Para identificar la región expuesta y secuencia funcional se analizó la estructura utilizando el servidor TMHMM.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de software Scientific Package for Social Sciences (SPSS Chicago, IL) versión 13.0. Los resultados se expresan como media \pm DE. Los datos se sometieron primero a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para confirmar la distribución normal. La prueba *t de Student* se utilizó para comparar las variables entre los grupos, que mostraban una distribución normal (gaussiana). La comparación de las tasas entre dos grupos se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

9. RESULTADOS

1. Se encontró expresión de AQP1 en placenta y membrana fetal de los grupos.
2. Los sitios de expresión se ubicaron en los vasos sanguíneos y capilares de la placenta, y las células epiteliales amnióticas en la membrana fetal.
3. La tasa de expresión positiva de AQP1 en tejidos placentarios del grupo de pacientes hipertensas embarazadas (85%, 17/20) fue significativamente mayor que la del grupo de embarazo normal (70%, 14/20). La diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.01$).
4. La tasa de expresión positiva de AQP1 en tejidos placentarios de mujeres embarazadas con preeclampsia severa (90%, 18/20) fue significativamente mayor que la de mujeres embarazadas con embarazo hipertensivo (80%, 16/20). Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de embarazo normal y el grupo de embarazo normal ($P < 0.05$).
5. La tasa de expresión positiva de AQP1 en la membrana fetal del grupo de trastorno hipertensivo (87%, 17/20) fue significativamente menor que la del grupo de embarazo normal (95% 19/20), la diferencia entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$).
6. Entre ellos, la tasa de expresión positiva de AQP1 en la membrana fetal de mujeres embarazadas con preeclampsia severa (80%, 16/20) fue significativamente menor que durante el embarazo.
7. La diferencia de presión arterial en mujeres embarazadas (95%, 19/20) y el grupo de embarazo normal fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

8. La presencia de sintomatología asociada como ascitis, edema central y periférico se encontró presente en ambos grupos y no hubo significancia estadística.

9. Los resultados de RT-PCR mostraron que el ARNm de AQP1 se expresó tanto en placenta como en tejidos de membrana fetal

10. AQP1 Western blot detectó la especificidad de placenta y tejidos de membrana fetal alrededor de 28KD

11. Los resultados de inmunofluorescencia muestran que AQP1 se expresa fuertemente en células endoteliales vasculares placentarias y sincitiotrofoblasto, células epiteliales amnióticas y trofoblastos coriónicos lisos.

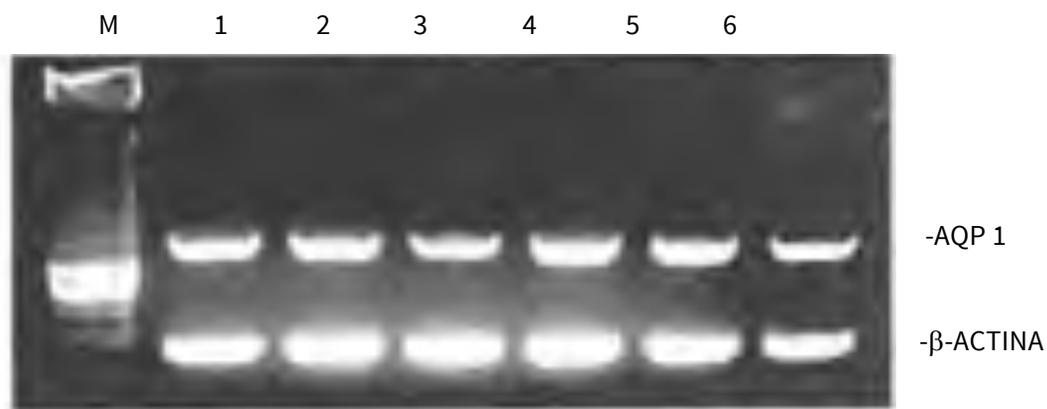


Figura 5. Expresión de la proteína de acuaporina 1 en placenta.

Imagen obtenida por imagen del laboratorio (FACMED UNAM)

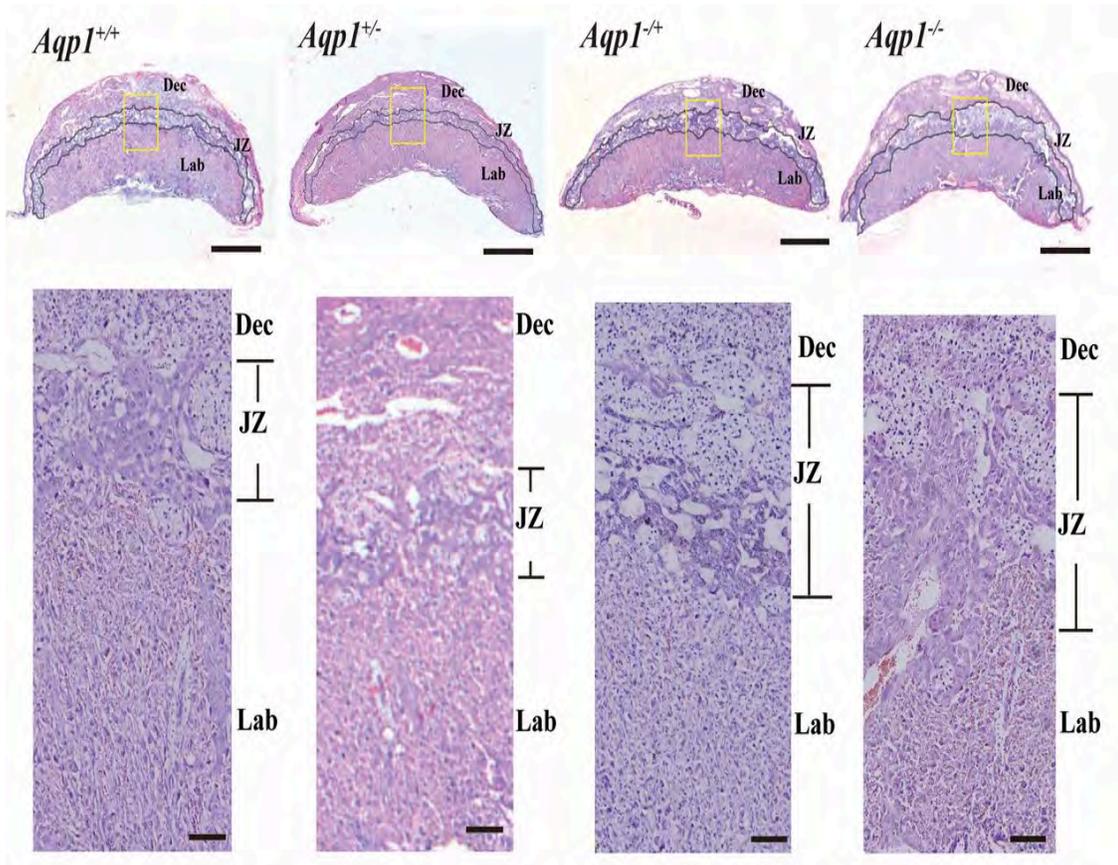


Figura 6. Análisis histológico de placenta con expresión de Aqp1

Análisis histológico de las placentas de los cuatro grupos por tinción con H&E. (Lab; inferior), espongioblásticas (Spo; media) y deciduales (Dec; superior). *Aqp1*^{+/+} (preeclampsia con datos de severidad), *Aqp1*^{+/-} (preeclampsia), *Aqp1*^{-/+} (hipertensión gestacional), *Aqp1*^{-/-} (control).

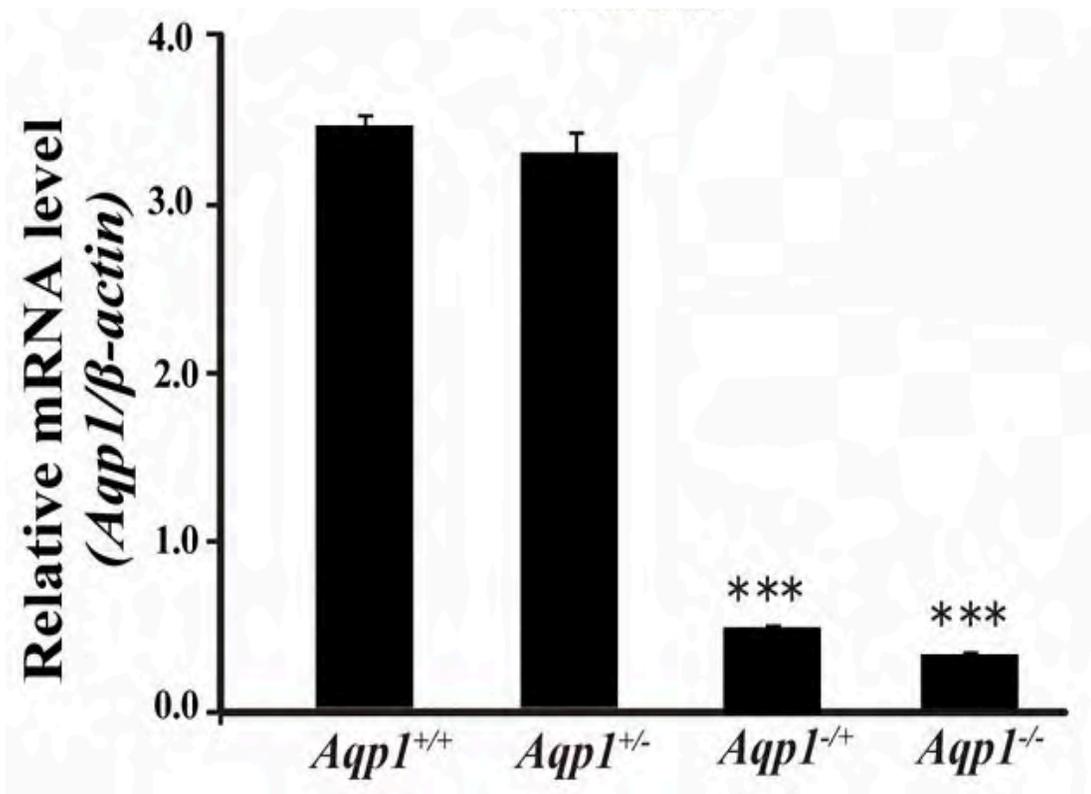


Figura 7. Expresión de ARNm de en placenta de los cuatro grupos por RT-PCR. Los valores se presentan como las medias \pm DE. *** P <0,001 para la expresión de ARNm. *Aqp1*^{+/+} (preeclampsia con datos de severidad), *Aqp1*^{+/-} (preeclampsia), *Aqp1*^{-/+} (hipertensión gestacional), *Aqp1*^{-/-} (control).

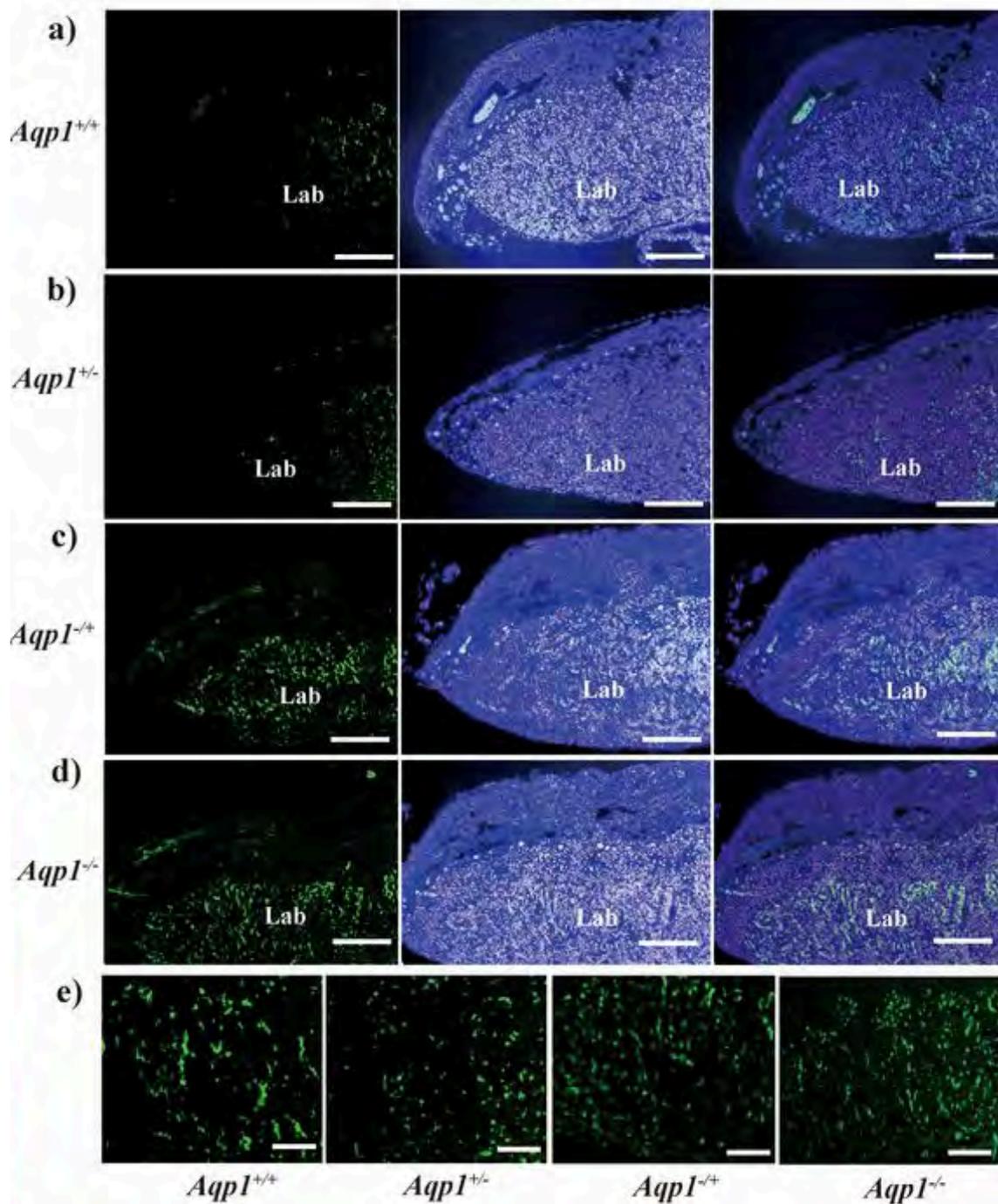


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de vasos sanguíneos en placenta de los cuatro grupos. Las secciones de parafina de 5 μm de grosor de placenta se tiñeron fluorescentemente. *Aqp1*^{+/+} (preeclampsia con datos de severidad), *Aqp1*^{+/-} (preeclampsia), *Aqp1*^{-/+} (hipertensión gestacional), *Aqp1*^{-/-} (control).

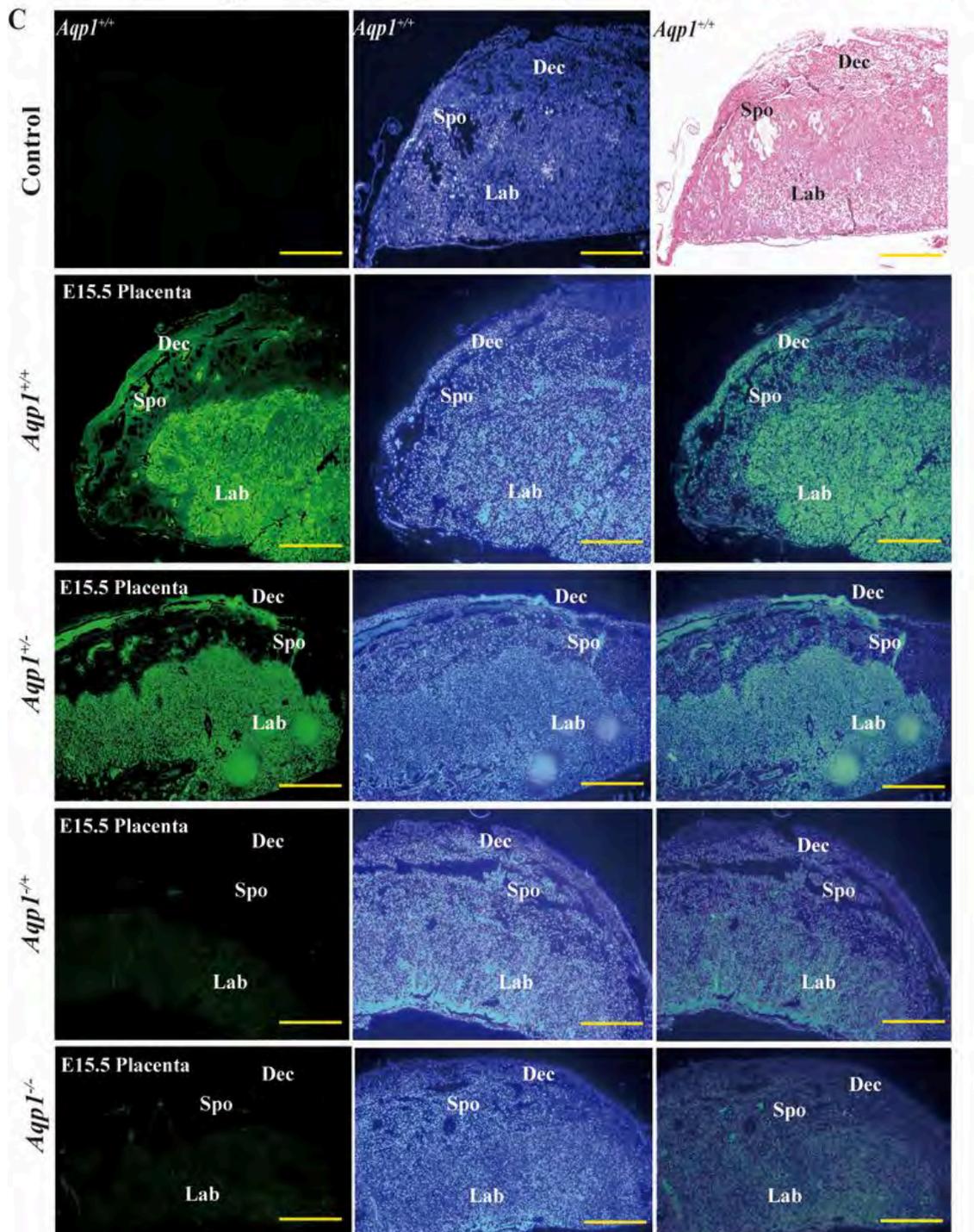


Figura 9. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de Aqp1 en placentas de los cuatro grupos. Dec, capa decidual; Spo, capa de espongioblastos; Laboratorio, capa de laberinto. *Aqp1*^{+/+} (preeclampsia con datos de severidad), *Aqp1*^{+/-} (preeclampsia), *Aqp1*^{+/-} (hipertensión gestacional), *Aqp1*^{-/-} (control).

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El nivel de expresión de AQP1 de pacientes con preeclampsia aumenta en placenta y disminuye en membranas y mantiene correlación con el grado de enfermedad hipertensiva. Todo esto sugiere que los cambios en la expresión de AQP1 pueden desempeñar un papel importante en el inicio y desarrollo de enfermedad hipertensiva y pueden ser uno de los mecanismos que compliquen la enfermedad.

La expresión de AQP1 en placenta humana y membranas fetales sugiere que se intercambia en el fluido materno-fetal. Y el equilibrio del líquido amniótico puede jugar un papel importante.

11. CONCLUSIONES

Una de las características más comunes en placentas por embarazos complicados por preeclampsia es la disminución de la invasión endovascular por citotrofoblastos y la remodelación inadecuada de las arterias espirales uterinas. En consecuencia, la perfusión de estas placentas se ve afectada y la concentración de oxígeno dentro del espacio intervelloso es más variable que en las placentas normales, lo que resulta en una lesión de tipo isquemia / re perfusión. Por lo tanto, las fluctuaciones en las tensiones de oxígeno aumentan el estrés oxidativo y la apoptosis del trofoblasto.

El descubrimiento de las acuaporinas ha cambiado el panorama con respecto a la comprensión del transporte de agua en las membranas biológicas y a la naturaleza de las proteínas transportadoras en general, porque su estudio ha dejado en claro que existen canales en las membranas no sólo permeables a iones y que los movimientos de agua a través

de las membranas son regulados por la célula en forma muy diferente a como se pensaba hace una década.

La búsqueda de nuevas acuaporinas y la investigación acerca de las ya identificadas se está realizando en muchos laboratorios de investigación en todo el mundo por la gran importancia que tienen en la fisiología del control del volumen celular y los mecanismos de control osmótico que toda célula posee. También su papel en el control del flujo de glicerol y otros solutos y las implicaciones que esto puede tener en la regulación metabólica general constituyen desafíos muy interesantes.

Además, la íntima relación que tienen con diversas enfermedades han incrementado el interés por comprender su significancia funcional en los diferentes tipos de células, pues esto podría implicar comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos que lleven al desarrollo de medidas terapéuticas nuevas y tal vez más eficaces para el tratamiento de las enfermedades asociadas.

La fisiopatología de muchas enfermedades cuyo origen molecular era desconocido antes de la era de las acuaporinas ha empezado a comprenderse mejor, lo cual resultará necesariamente en un mejor enfoque de éstas a nivel clínico y terapéutico, porque, por ejemplo, aquellas enfermedades que son secundarias a mutaciones puntuales en el gen de una AQP, como cataratas congénitas secundarias a la mutación Glu-134-Gly en AQP0 o diabetes insípida nefrogénica secundaria a una mutación en Arg-187 en AQP2, podrían ser objeto de terapia génica en el futuro.

12. ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Riesgo de investigación: Sin riesgo.

El presente estudio es factible ya que sin importar la resolución del embarazo se tomaron muestras de placenta y membranas placentarias en las pacientes que se encuentren clasificadas con algún trastorno hipertensivo y sin afectar de alguna manera a las pacientes, la recolección de las mismas y su procesamiento se realizó bajo consentimiento informado.

Se tomaron en cuenta las disposiciones del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, en el Título Segundo, Capítulo primero en sus artículos: 13, 14 incisos I al VIII, 15,16,17 en su inciso II, 18,19,20,21 incisos I al XI y 22 incisos I al V. Así como también, los principios bioéticos de acuerdo a la declaración de Helsinki con su modificación en Hong Kong basados primordialmente en respeto, beneficencia y Justicia.

DECLARACIÓN DE INTERÉS

El autor declara que no existe conflicto de intereses que perjudique la imparcialidad de este trabajo científico.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Gleicher N. Why much of the pathophysiology of preeclampsia-eclampsia must be of an autoimmune nature. Am J Obstet Gynecol 2007; 196(1):51-57.
2. Von Dadelszen P, Magee L. What matters in preeclampsia are the associated adverse outcomes: the view from Canada. Curr Opin Obstet Gynecol 2008; 20(2):110-115.
3. Mortalidad Materna [sede web], Septiembre 2019-[acceso el 8 de Diciembre de 2019]. Disponible en: www.who.int/es/
4. (5) omm.org.mx, Numeralia 2016 [sede web], Diciembre 2016-[acceso el 09 de Diciembre de 2019]. Disponible en: www.omm.org.mx
5. Clínica, detección y diagnóstico de enfermedades hipertensivas del embarazo. México: Secretaría de Salud, 2010 (consultado en marzo de 2017).
6. CENETEC. Guía de Práctica Clínica. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Preeclampsia en segundo y tercer nivel de atención. Actualización 2017.
7. Briones-Garduño JC, Díaz de León-Ponce M, Briones-Vega CD. Muerte Materna por Preeclampsia. En: Colección Medicina de Excelencia. Academia Mexicana de Cirugía. Ed. Alfil. México 2013.
8. WHO, Make every mother and child count, in The World Health Report 2005, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2005. Consultado el 27/03/17
9. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes. Stephanie E. Mann, MD, Emily A. Ricke, MS, Baxoue A Yang, et al. Am J Obstet Gynecol. Volumen 187, number 4, páginas 902-907.
10. ACOG Practice Bulletin No. 202: gestational hypertension and preeclampsia. Obstet Gynecol. 133(1):e1-e25, 2019.
11. B. W J Mol, C. T Roberts, S. Thangaratinam, L. A Magee, et.al. Pre.eclampsia. The Lancet, 2016-03-05, Volumen 387, Número 10022, Páginas 999-1011.
12. Acuaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua. Julio Cesar Sanchez. Colombia Médica. Vol 34 N 4, 2003
13. Acuaporinas. Osvaldo Lopez Gaston. Medicina Intensiva. Volumen 25, numero 3, 2008, 116-121-
14. Expression of aquaporin-3 (AQP3) in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. Natalia Szpilbarg a, Alicia E. Damiano. Placenta 59 (2017) 57-60.

15. Aquaporins in the female reproductive system of mammals. Cui Zhu, Zongyong Jiang. *Frontiers in Bioscience, Landmark*, 20, 838-871, January 1, 2015
16. Aquaporin 1 gene deletion affects the amniotic fluid volume and composition as well as the expression of other aquaporin water channels in placenta and fetal membranes. Hui Luo, Ailan Xie, Ying Hua, et al. *Clinica Chemical Acta* 482 (2018) 161–165.
17. Maternal-fetal fluid balance and aquaporins: from molecule to physiology. Xiao-yan SHA1, Zheng-fang XIONG1, et al. *Acta Pharmacologica Sinica* (2011) 32: 716–720.
18. New Insights Into the Role of Placental Aquaporins and the Pathogenesis of Preeclampsia. Natalia Szpilbarg1, Nora A. Martínez, et al. *Frontiers in Physiology* (2018) 9:150
19. Expression and significance of aquaporin-2 and serum hormones in placenta of patients with preeclampsia. Yurong Zhao, Li Lin & Ailuan Lai. *Journal of Obstetrics and Gynecology* (2018). VOL. 38, NO. 1, 42–48

14. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: Expresión de acuaporinas en placenta de pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo y su importancia clínica.

El propósito de esta ficha de consentimiento es proveer a los participantes en esta investigación con una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

El presente estudio es realizado por la doctora Maleny Sánchez Flores residente de la especialidad de Ginecología y Obstetricia en la Secretaría de Salud de la Ciudad de México, y bajo la dirección y asesoramiento de la doctora Alhelí Ruíz Morales. Médico Adscrito Hospital General Enrique Cabrera. Ginecología y Obstetricia. Secretaria de Salud de la Ciudad de México.

Es importante resaltar que el principal objetivo de este estudio es evaluar la presencia de acuaporina 1 en placentas y evaluar las implicaciones clínicas con pacientes con preeclampsia y de acuerdo a la información recolectada y a los resultados de laboratorio ver la implicación de estas proteínas en la expresión de la enfermedad y buscar posibles alternativas de tratamiento.

Por otro lado, es necesario aclarar que la decisión de participar en el estudio de investigación es voluntaria; sin embargo, al aceptar su participación se procederá a realizarle una historia clínica dirigida y minuciosa sobre los factores de riesgo para desarrollar preeclampsia y en caso de tener el diagnóstico sobre los criterios para su clasificación, así mismo se tomará un fragmento de placenta después de la resolución del embarazo, el presente ejercicio no tendrá ningún valor diagnóstico adicional al establecido por su médico y sus resultados solo serán empleados con fines académicos; de igual modo se informa que el procedimiento tomará como máximo 15 minutos de su tiempo.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso le perjudique en alguna forma. Adicionalmente si alguna de las preguntas realizadas se le hace incómoda tiene usted el derecho de hacérselo saber el investigador o de no responderlas.

Desde ya le agradecemos su colaboración.

Nombre del participante y firma _____

Ciudad de México, _____/_____/2020

15. ANEXO 1. RECOLECCION DE DATOS.

| PERSONAS | EDAD MATERNA | EDAD GESTACIONAL | DIAGNOSTICO | IMC | PARIDAD | RESOLUCION EMBARAZO | PARACLINICOS | PERINATALES |
|----------|--------------|------------------------|--------------------------|-----|----------|---------------------|--|--|
| 1 SIMIC | 18 AÑOS | 37 SEM X USG | SANA | 24 | G1P1 | PARTO | SIN ALTERACIONES | HOMBRE, 48CM, PESO 2400GR, 37 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 2 GGCL | 28 AÑOS | 40 SEM X USG | SANA | 24 | G4P1A1C2 | CESAREA | SIN ALTERACIONES | MUJER, 52CM, PESO 44075GR, 40 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 3 MVKDR | 25 AÑOS | 39.3 SEM X FUR | SANA | 25 | G5A3C1P1 | PARTO | SIN ALTERACIONES | HOMBRE, 51CM, PESO 3265 GR, 39 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 4 JLLF | 24 AÑOS | 40.1 X FUR | SANA | 23 | G3C2P1 | CESAREA | SIN ALTERACIONES | MUJER, 49CM, PESO 2865GR, 40 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 5 GHS | 24 AÑOS | 40 SEM X FUR | SANA | 24 | G1P1 | PARTO | SIN ALTERACIONES | MUJER, 50CM, PESO 3003 GR, 40 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 6 CMLG | 30 AÑOS | 39.2 X FUR | HIPERTENSION GESTACIONAL | 28 | G4P1C2A1 | CESAREA | SIN ALTERACIONES | MUJER, 51CM, PESO 2780GR, 40 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 7 CGMS | 35 AÑOS | 40.5 SEM X USG 2 TRIM | HIPERTENSION GESTACIONAL | 28 | G3P3 | PARTO | SIN ALTERACIONES | HOMBRE, 53CM, PESO 3500GR, 39 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 8 SRA | 27 AÑOS | 39.2 X FUR | HIPERTENSION GESTACIONAL | 19 | G2C2 | CESAREA | SIN ALTERACIONES | MUJER, 51CM, PESO 2750GR, 40 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 9 AARA | 22 AÑOS | 39 SEM X FUR | HIPERTENSION GESTACIONAL | 24 | G3P3 | PARTO | SIN ALTERACIONES | HOMBRE, 50CM, PESO 3200GR, 39 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 10 WEPI | 19 AÑOS | 38.3 X FUR | HIPERTENSION GESTACIONAL | 25 | G4P4 | PARTO | SIN ALTERACIONES | MUJER, 50CM, PESO 2880GR, 38 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 11 AMKN | 21 AÑOS | 37 SEM X FUR | PREECLAMPSIA | 25 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 600, TGP 19.4, TGP 20.1, DHL 217.39, PLAQUETAS 174MIL | MUJER, 45CM, PESO 2190 GR, 37 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 12 OFG | 40 AÑOS | 37.1 X USG | PREECLAMPSIA | 25 | G6P5 C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 600, TGP 21, TGO 28, DHL 160, PLAQUETAS 160MIL | HOMBRE, 46CM, PESO 1690 GR, 40 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 13 MVJMI | 18 AÑOS | 38.4 X FUR | PREECLAMPSIA | 26 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 600, TGP 27.5, TGO 41.2, DHL 240.66, PLAQUETAS 232MIL | HOMBRE, 48CM, PESO 2365GR, 38.5 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 14 RLJ | 20 AÑOS | 38.3 X FUR | PREECLAMPSIA | 25 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 300, TGP 7.6, TGO 14.7, DHL 202.90, PLAQUETAS 242MIL | MUJER, 50CM, PESO 3125 GR, 3125 GR, 38 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 6 GPY | 27 AÑOS | 37.2 X USG 1 TRIMESTRE | PREECLAMPSIA | 29 | G3C2 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 600, TGP 40, TGO 47, DHL 320, PLAQUETAS 137MIL | MUJER, 48CM, PESO 2740GR, 37 SEMANAS 8/9 APOGAR |
| 16 MSF | 19 AÑOS | 37 SEM X FUR | PREECLAMPSIA CON DATOS | 25 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 600, TGP 540, TGO 660, DHL 968, PLAQUETAS 100MIL | MUJER 49CM, PESO 2600GR, 38 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 17 GRP | 18 AÑOS | 37.5 SEM X FUR | PREECLAMPSIA CON DATOS | 23 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 300, TGP 462.9, TGO 695, DHL 894.92, PLAQUETAS 117MIL | MUJER 48CM, PESO 2325GR, 38 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 18 CRMF | 18 AÑOS | 37 SEM X USG | PREECLAMPSIA CON DATOS | 24 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 300, TGP 125.8, TGO 184.5, DHL 409.82, PLAQUETAS 130MIL | HOMBRE, 44CM, PESO 1655 GR, 37 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 19 ARV | 18 AÑOS | 37 SEM X USG | PREECLAMPSIA CON DATOS | 25 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 600, TGP 400, TGO 767, DHL 899.9, PLAQUETAS 106MIL | MUJER, 49CM, PESO 2001GR, 37 SEMANAS, APOGAR 8/9 |
| 20 NSF | 19 AÑOS | 38 SEM X USG | PREECLAMPSIA CON DATOS | 24 | G1C1 | CESAREA | EGO: PROTEINAS 300, TGP 340, TGO 430, DHL 700, PLAQUETAS 98MIL | HOMBRE, 46CM, PESO 1980GR, 37 SEMANAS, APOGAR 8/9 |

ANEXO 2. HISTORIA CLINICA.

Nombre: _____ Edad: _____ NHC: _____ Grupo y Rh. _____
 Fecha: _____

Antecedentes Heredofamiliares:

Madre con diagnóstico de enfermedad hipertensiva en el embarazo SI NO

Antecedentes Personales Patológicos:

Enfermedades crónico-degenerativas SI NO

Antecedente de elevación de presión arterial en embarazos previos SI NO

Antecedente de elevación de presión arterial en embarazo actual SI NO

Diagnóstico de diabetes gestacional SI NO

Enfermedades infecciosas durante el embarazo SI NO

¿Cuáles?

Consumo de tabaco o alcohol SI NO

Inicio y suspensión.

Consumo de medicamentos SI NO

¿Cuáles? Y tiempo de uso.

Antecedentes Gineco-obstétricos:

Edad gestacional por ultrasonidos: _____

Fecha de última regla: _____

Inicio de control prenatal: _____ Consultas realizadas: _____

Ultrasonidos *Número y alteraciones:* _____

Ruptura de membranas. *Fecha y hora:* _____

Datos de infección intra-amniótica: _____

Antecedente de hijos con Restricción de crecimiento: _____

Signos Vitales:

Presión arterial al ingreso: _____

Presión arterial máxima reportada: _____

Presión arterial previo a la resolución del embarazo: _____

Frecuencia cardíaca: _____ Frecuencia respiratoria: _____ Temperatura: _____

_____ Frecuencia cardíaca fetal basal: _____ Peso: _____ Talla: _____

_____ IMC: _____

Resultados de laboratorio:

| Biometría Hemática | Valor | Examen General de Orina | Valor |
|--------------------|-------|-------------------------|-------|
| Leucocitos | | Proteínas | |

| | | | |
|-----------------------|-------|------------------------|-------|
| Hemoglobina | | Nitritos | |
| Hematocrito | | Esterasa leucocitaria | |
| Plaquetas | | Leucocitos por campo | |
| Química sanguínea | Valor | Tiempos de coagulación | Valor |
| Glucosa | | TP | |
| Urea | | TTP | |
| BUN | | INR | |
| Creatinina | | | |
| Ácido úrico | | | |
| Bilirrubina directa | | | |
| Bilirrubina indirecta | | | |
| Bilirrubina Total | | | |
| TGO | | | |
| TGP | | | |
| DHL | | | |

Diagnóstico

Terapéutica: Resolución del embarazo:

Edad gestacional: _____

Peso _____

Talla: _____

APGAR: _____

Sexo

HOMBRE

MUJER

Alumbramiento

MANUAL

DIRIGIDO

Complicaciones

SI

NO

¿Cuáles?

Dra. Alhelí Ruíz Morales. Médico Adscrito Hospital General Enrique Cabrera. Ginecología y Obstetricia. Secretaria de Salud de la Ciudad de México.

Dra. Maleny Sánchez Flores. Residente de Ginecología y Obstetricia. Secretaria de Salud de la Ciudad de México.