

11262

10
E2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
División de Investigación Biomédica

“MODIFICACIONES DE CALCIO INTRACELULAR EN
PLAQUETAS DE MUJERES TOXEMICAS”

T E S I S

Q U E P R E S E N T A :

ADA CELIA PEREYRA MARTINEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

MAYO DE 1993



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 está 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.

ANTECEDENTES

La enfermedad hipertensiva aguda del embarazo es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal, que afecta aproximadamente entre el 5 y el 10% de todos los embarazos ¹, en nuestro país la frecuencia de su presentación es alta y ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte materna ²⁻⁴. Se han propuesto múltiples teorías para explicar la etiología de esta enfermedad conocida ya desde la antigua Grecia antes de la época de Hipócrates ⁵⁻⁶; sin embargo, hasta hoy día se desconoce su etiología. Generalmente se presenta después de la semana veinte de gestación y más frecuentemente cerca del término. Es más común en nulíparas con una relación de 6 - 8 a 1 en comparación con las múltiparas. Se sabe que existen factores predisponentes en la presentación de este síndrome hipertensivo, como nulíparidad, antecedentes familiares de preeclampsia o eclampsia, gestación múltiple, diabetes, hipertensión crónica, mola hidatidiforme, hidrops fetalis y embarazos en mujeres muy jóvenes o bien añosas ⁷⁻⁸.

Las alteraciones clínicas y de laboratorio que diagnostican a este síndrome hipertensivo son proteinuria ≥ 0.3 g/L en orina de 24 h o de 1 g/L en una muestra al azar, edema de miembros inferiores, manos o cara o una combinación de ellos, aumento de al menos 30 mmHg de la presión sistólica, 15 mmHg la cifra diastólica o ambas sobre valores previos al embarazo, o bien 130 mmHg de tensión sistólica y 90 mmHg de diastólica cuando se desconoce la tensión arterial previa al embarazo. Estos valores deben observarse por lo menos en dos ocasiones y en un intervalo de al menos 6 horas ^{1,7}. Se presentan también cambios en la función renal caracterizados por disminución de la filtración glomerular y del flujo plasmático renal. Mientras que en el embarazo normal la filtración glomerular aumenta hasta en un 50%, en la preeclampsia disminuye en aproximadamente 25% o bien permanece en los valores previos al embarazo ⁹⁻¹¹. Este decremento en la función renal puede tener como consecuencia disminución en la depuración de ácido úrico e hiperuricemia. Este hallazgo ha sido utilizado como predictor del estado de salud fetal ya que se ha encontrado correlación entre los niveles de ácido úrico y la morbilidad fetal ^{12,13}. Algunos investigadores consideran que estas alteraciones en la función renal son consecuencia de glomeruloendoteliosis renal, considerada patognomónica de la enfermedad, esta lesión sólo es comprobable por

biopsia renal ^{14,15}. Es de importancia señalar que tanto los cambios en la función como en la morfología renales, son reversibles una vez que el embarazo llega a término ¹⁰.

Pueden observarse también trastornos de la coagulación, pero existe controversia respecto a la frecuencia de su presentación e importancia clínica ¹⁶⁻¹⁸. Algunos autores han descrito la presencia de coagulación intravascular diseminada y se ha sugerido que ésta puede tener un papel importante en la patogénesis de la enfermedad ^{6, 19, 20}; Pritchard y colaboradores encontraron trastornos de la coagulación en la minoría de sus pacientes ²¹. La perfusión útero placentaria también se encuentra disminuida en mujeres preeclámpicas, debido al tono uterino aumentado y vasoconstricción de las arterias uterinas; esta es la causa principal de pérdidas fetales, retardo en el crecimiento intrauterino y de infantes pequeños para la edad gestacional ^{6, 22-24}.

Las mujeres con preeclampsia presentan mayor susceptibilidad a los efectos de sustancias vasopresoras ⁷; Se ha informado que la mujer embarazada normal es resistente a los efectos vasopresores de angiotensina II. Por el contrario, las embarazadas que posteriormente padecerán preeclampsia responden con aumento de la tensión arterial a dosis menores de esta hormona ²⁵⁻²⁷. Se cree que la respuesta disminuida a la infusión de angiotensina II en el embarazo normal depende de la reactividad del músculo liso vascular a angiotensina II, o a la acción de prostaglandinas sobre el músculo liso. Este mecanismo puede estar mediado por calcio y nucleótidos cíclicos ^{28,29}.

Respecto a la homeostasis del calcio en el embarazo normal, se sabe que responde a los efectos reguladores de hormona paratiroidea, calcitonina y 1, 25 dihidroxivitamina D. Esta regulación es más activa después de la semana 20 de gestación en respuesta al aumento en el transporte activo de calcio a través de la placenta para cubrir los requerimientos del feto ³⁰⁻³².

Existen numerosas publicaciones encaminadas a reconocer la posible participación del calcio en la hipertensión esencial y gestacional en seres humanos y en animales de laboratorio ³³⁻³⁵. Se ha observado una relación inversa entre la ingestión baja de calcio y la hipertensión ³⁶⁻³⁸. También se

ha visto que, el suplemento de calcio en la dieta protege de la aparición de hipertensión, por algún mecanismo desconocido ³⁹⁻⁴¹.

Recientemente en nuestro laboratorio encontramos que la paciente preecláptica cursa con niveles de calcio sérico más bajo que las embarazadas normotensas ⁴²; Taufield y cols. ⁴³ encontraron hipocalciuria en pacientes preeclápticas. En pacientes con hipertensión esencial se ha encontrado incremento en las concentraciones de calcio libre intracelular comparándolos contra varones sanos ^{44,45}. Recientemente aparecieron dos artículos que informan sobre la medición de la concentración de calcio libre intracelular en pacientes preeclápticas y en embarazadas normotensas con resultados discrepantes, ya que en un grupo se encontró incremento del calcio libre intracelular y en el otro no se encontraron diferencias entre los dos grupos ^{46,47}.

Existen informes del uso de bloqueadores de los canales de calcio en pacientes preeclápticas donde se ha demostrado su utilidad. Sin embargo, su uso es limitado por razones de seguridad materno-fetal ⁴⁸⁻⁵⁰. Hasta hoy día existe controversia con respecto a la participación del calcio en la hipertensión que acompaña a la preeclampsia y si el modelo de plaquetas empleado en hipertensión esencial es adecuado para las pacientes con preeclampsia ⁴⁶.

Los objetivos de este trabajo fueron medir la concentración de calcio citosólico en pacientes con preeclampsia comparadas con embarazadas normotensas y correlacionar esta concentración con las cifras de tensión arterial, e investigar el efecto del plasma de estas pacientes sobre las concentraciones de calcio libre intraplaquetario.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Existe aumento del calcio libre intraplaquetario en las pacientes preeclámpticas?
2. ¿La concentración intraplaquetaria de calcio ionizado se normaliza en las pacientes preeclámpticas en el post-parto?
3. ¿Existe correlación positiva entre la concentración de calcio intraplaquetario y las cifras de tensión arterial?
4. ¿El aumento del calcio intraplaquetario, se debe a un componente del plasma?

OBJETIVOS:

- 1. Medir la concentración intraplaquetaria de calcio ionizado en pacientes preeclámpticas y en embarazadas normotensas.**
- 2. Medir la concentración de calcio ionizado intraplaquetario en pacientes preeclámpticas 6 semanas después del parto.**
- 3. Determinar si las cifras de tensión arterial varían en forma directamente proporcional con las cifras de calcio ionizado.**
- 4. Determinar si el plasma de las pacientes con preeclampsia aumenta la concentración intraplaquetaria de calcio ionizado en plaquetas de varones sanos.**

HIPOTESIS

- 1. La concentración intraplaquetaria de calcio ionizado es mayor en las pacientes con preeclampsia que en las embarazadas normotensas.**
- 2. La concentración de calcio ionizado en plaquetas de pacientes con preeclampsia se normaliza en el post-parto.**
- 3. Las concentraciones intraplaquetarias de calcio ionizado correlacionarán positivamente con las cifras de tensión arterial.**
- 4. Existe movimiento de calcio hacia el citosol plaquetario provocado por algún componente plasmático de la mujer preeclámpsica.**

PACIENTES, MATERIALES Y METODOS

DETERMINACION DE CALCIO INTRAPLAQUETARIO:

1. Diseño del estudio: Observacional, comparativo, longitudinal.
2. Grupos de estudio:

Grupo I: 10 pacientes con preeclampsia

Grupo II: 10 embarazadas normotensas

MEDICION DE FLUJOS DE CALCIO:

1. Diseño del estudio: Cuasi experimental, comparativo, transversal.
2. Grupos de estudio:

Grupo I: 8 pacientes con preeclampsia

Grupo II: 8 embarazadas normotensas

3. Criterios de Inclusión:

- 1) Embarazadas de 20 a 35 años de edad, con 25 o más semanas de gestación con hipertensión, proteinuria y edema.
- 2) Control de su embarazo en el INPer.
- 3) Sin medicamentos antes de la obtención de la primera muestra.
- 4) Sin antecedentes de enfermedades sistémicas o renales crónicas.
- 5) Aceptación para participar en el estudio.
- 6) Grupo testigo: embarazadas sanas, sin datos de preeclampsia, con los mismos criterios de inclusión, edad y tiempo de gestación que las pacientes del grupo con preeclampsia.

4. Criterios de Exclusión

- 1) Persistencia de hipertensión arterial, proteinuria o edema, seis semanas después del parto.
- 2) Abandono del estudio.
- 3) Pérdida para el seguimiento.

5. Criterios de no inclusión

- 1) Cualquier medicamento previo a la toma de la primera muestra.
- 2) Enfermedades sistémicas o renales previas.
 - Hipertensión arterial
 - Lupus eritematoso sistémico
 - Nefropatías
 - Diabetes
 - Trastornos del metabolismo del calcio
- 3) No aceptación para participar en el estudio.
- 4) Familiares en primer grado con hipertensión esencial.

Para cuantificar calcio intraplaquetario se estudiaron 2 grupos de pacientes. Diez pacientes con preeclampsia y diez embarazadas sanas, entre 20 y 35 años de edad, sin medicamentos 2 semanas previas a la toma de la primera muestra y durante la segunda muestra para evitar modificaciones en las concentraciones de calcio, ya que se sabe por estudios previos que algunos fármacos disminuyen las concentraciones intracelulares de calcio ^{44, 51}.

Ninguna de las pacientes ni sus controles tenían antecedentes personales o familiares de hipertensión, ni cursaban con algún padecimiento concomitante que pudiera modificar las condiciones fisiológicas de las pacientes (ver criterios de inclusión y exclusión).

Las pacientes y sus controles cursaban el 3er trimestre de embarazo. Las pacientes con preeclampsia fueron admitidas en el servicio de Urgencias del Instituto Nacional de Perinatología y diagnosticadas por los siguientes criterios: Tensión Arterial $\geq 130/90$ mmHg en 2 tomas con un intervalo de 6 horas, proteinuria ≥ 1 g por litro al momento de su ingreso, edema, manifestado por la huella de la presión del dedo (signo de la fovea), en región pretibial, manos o párpados. Para medir flujos de calcio se estudiaron 8 pacientes con preeclampsia y 8 embarazadas normotensas, ambos grupos diferentes de los grupos de determinación de calcio intraplaquetario. Los criterios de inclusión, no inclusión y exclusión fueron los mismos para ambos grupos. En este ensayo las plaquetas se obtuvieron de varones sanos para evitar cualquier sesgo derivado del funcionamiento plaquetario durante la preeclampsia.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó para la concentración de calcio ionizado intraplaquetario y se determinó mediante la fórmula:

$$n=2\sigma^2 \frac{(Z\alpha/2 + Z\beta)^2}{\delta^2}$$

donde

δ^2 = diferencia entre los promedios =35%,

nivel α = 0.05,

nivel β = 0.20.

METODOLOGIA

A todas las participantes en el estudio se les hizo historia clínica, examen físico y se les midió la tensión arterial (ver anexo); ésta se registró en dos ocasiones, por un mismo observador, con la paciente en reposo con esfigmomanómetro de mercurio y estetoscopio; la cifra sistólica se registró en la fase I de Korotkoff y la diastólica en la fase V. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena antecubital con la paciente en reposo y con un período de ayuno por lo menos de 6 horas. Para la medición de calcio libre intraplaquetario se obtuvieron 2 muestras, durante las semanas 37 o 38 de gestación y 6 semanas después del parto. Las muestras de orina para cuantificar proteínas se obtuvieron al mismo tiempo que la sangre. El ensayo de flujos de calcio se realizó durante el 3er trimestre de gestación. De todas las pacientes se obtuvo el consentimiento por escrito.

CUANTIFICACION DE CALCIO LIBRE INTRAPLAQUETARIO

1. De cada paciente y sus controles se obtuvo una muestra de 20 cc de sangre total, la cual se depositó en tubos de plástico que contenían citrato de sodio al 0.13 M.
2. Se centrifugó a 120 X g X 15 minutos para obtener plasma rico en plaquetas, se aspiró y centrifugó a 1200 X g X 15 minutos para obtener un concentrado plaquetario de 300,000/100 μ l.
3. El concentrado plaquetario (300,000 plaquetas/100 μ l) de pacientes preeclámpticas (n=10) y de embarazadas normotensas (n=10), se incubó durante 50 minutos con Fluo 3-AM, 10 mM, a 37° C en agitación constante.
4. Al término de la incubación las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora con HEPES (ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfónico) 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, MgSO₄ 0.5 mM, glucosa 5 mM, albúmina bovina 0.35%, pH 7.4 a 37° C en agitación constante.
5. La fluorescencia se registró en un espectrofluorómetro Mark I a 506 nm de excitación y 526 nm de emisión, la fluorescencia máxima (FM) se obtuvo al agregar a la suspensión de plaquetas CaCl₂ 2 mM y el ionóforo de calcio A23187 500 nM, la fluorescencia mínima (Fm) agregando EGTA (ácido tetraacético etilenglicol) 600 nM; a un volumen final de 2.5 ml.
6. La concentración de calcio libre intracelular se determinó con la ecuación :

$$[Ca^{2+}]_i = Kd(Fo-Fm) / (FM-Fo)$$

Donde Fo es el valor experimental de la fluorescencia.

La Kd se consideró igual a la informada previamente por Tsien y colaboradores⁵². esto es 400 nM.

DETERMINACION DE FLUJOS DE CALCIO:

1. La sangre total de los donadores se centrifugó a $120 \times g \times 15$ minutos para obtener plasma rico en plaquetas, se aspiró y centrifugó a $1200 \times g \times 15$ minutos para obtener un concentrado plaquetario de 300,000 plaquetas/100 μ l.
2. El concentrado plaquetario (300,000/100 μ l) se incubó en un medio con HEPES 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 1 mM, MgSO_4 0.5 mM, albúmina bovina 0.35%, pH 7.4 a 37°C en agitación constante.
3. La concentración de calcio total en suero se midió con un analizador de electrolitos NOVA 10 biomedical con ión selectivo de calcio
4. La concentración de calcio libre en suero se midió en alícuotas de 150 μ l de suero total marcado con ^{45}Ca 10 μCi , por ultrafiltración a través de una bolsa de poro 2000.
5. El flujo de calcio transmembrana se midió en alícuotas de 300,000 plaquetas que se incubaron durante 0, 15, 30 y 60 minutos, en suero de pacientes preeclámpticas o de embarazadas normotensas, marcado con ^{45}Ca .
6. Al término de la incubación las plaquetas se lavaron 2 veces con solución amortiguadora salina con CaCl_2 frío 1 mM.
7. Las plaquetas se rompieron con desoxicolato y la radioactividad se midió en un contador de centelleo beta Beckman LS 100 C.

ANALISIS ESTADISTICO:

Los resultados obtenidos se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas debido a que las mediciones realizadas a pesar de ser cuantitativas no cumplían con los requisitos para usar pruebas paramétricas. Se compararon los valores de calcio libre intraplaquetario y de tensión arterial entre los dos grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney, los valores de calcio intraplaquetario pre y post-parto en las pacientes preeclámpticas se compararon mediante la prueba de pares igualados de Wilcoxon, la correlación entre las concentraciones de calcio intraplaquetario y la tensión arterial media, diastólica y sistólica se realizó con la prueba rho de Spearman. Para evaluar diferencias en el transporte de calcio en las pacientes preeclámpticas y en las embarazadas normotensas se utilizó análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis ⁵³. Las concentraciones extracelulares de calcio total y calcio libre entre los dos grupos se compararon con la U de Mann-Whitney. Los valores están expresados en $Md \pm$ recorrido intercuartílico. Las diferencias se consideraron significativas con un valor $\alpha \leq 0.05$, con prueba unimarginal, ya que las hipótesis tenían direccionalidad ⁵⁴.

RESULTADOS:

DETERMINACION DE CALCIO INTRAPLAQUETARIO: Las concentraciones de calcio libre intracelular en plaquetas de pacientes preeclámpticas fue significativamente mayor comparada con las embarazadas normotensas (Md 144.5 ± 4 nM vs 105.5 ± 9.5 nM) $p < 0.0002$; el incremento en el calcio libre intraplaquetario en estas pacientes se normalizó 6 semanas después del parto (Md 89 ± 4.3 nM) $p < 0.02$, (fig. 1). Las tensiones arteriales diastólica, sistólica y media fueron significativamente mayores en las pacientes preeclámpticas que en las embarazadas normotensas (Md 140 vs 105, 100 vs 70, 113.3 vs 81.6), $p < 0.0002$, no hubo diferencias entre la edad materna, la edad gestacional, ni la paridad de las pacientes comparadas con el grupo control (cuadro 1). Se obtuvo una correlación significativa entre las concentraciones de calcio libre y la tensión arterial media, $\rho = 0.781$, diastólica $\rho = 0.741$ y sistólica $\rho = 0.781$, $p < 0.0005$ (cuadro 2).

MEDICION DE FLUJOS DE CALCIO: El transporte de calcio en plaquetas de varones sanos, incubadas en suero de pacientes preeclámpticas (Md = 1.475 ± 0.311) nmolas fue significativamente diferente que las incubadas en suero de embarazadas sanas (Md = 0.9725 ± 0.58 nmolas) $p < 0.02$ (fig. 2). La edad materna, la edad gestacional, y la paridad no fueron diferentes en los grupos estudiados; Las tensiones arteriales sistólica, diastólica y media fueron mayores en las pacientes preeclámpticas que en las embarazadas sanas (150 vs 110, 110 vs 70, 123.3 vs 83.3) $p < 0.0008$. Las concentraciones extracelulares de calcio total, no fueron diferentes entre ambos grupos, (Md = 2.04 ± 0.16 vs 2.17 ± 0.10), $p = 0.093$. No hubo diferencias en las concentraciones extracelulares de calcio libre, (Md = 0.566 ± 0.182 vs 0.567 ± 0.117 nM), $p = 0.8$, cuadro 3.

DISCUSION

Los resultados muestran que existe mayor concentración de calcio libre intraplaquetario en las pacientes con preeclampsia que en las embarazadas normotensas, y que estos valores disminuyen a cifras normales 6 semanas después del parto. Previamente a la activación por un agonista, la concentración intracelular de calcio ionizado en el citoplasma de las plaquetas es alrededor de 100 nM, que es 10,000 veces menos que la concentración en el plasma.

En las plaquetas, los iones de calcio requeridos para sostener el aumento en la concentración de calcio ionizado, pueden proceder del líquido extracelular o de una o más pozas intracelulares. Esto se facilita por la tendencia del calcio a penetrar a la célula.

La homeostasis del calcio libre intracelular depende de un sistema de transporte de calcio presente en la mayoría de las células eucarióticas; dicho transporte se lleva a cabo en membrana plasmática, en mitocondria y en retículo sarcoplásmico. En membrana plasmática se realiza a través de:

- 1.- ATPasa específica,
- 2.- Canal de calcio,
- 3.- Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Las plaquetas poseen actividad de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa. Esta enzima se encuentra en el sistema tubular denso y en el sistema de membrana que conecta a la superficie pero no en la membrana plasmática. La entrada de calcio a la plaqueta ocurre a través de un canal selectivo, aparentemente de una sola clase. También existe evidencia de que el gradiente de Na^+ de membrana plasmática afecta la función plaquetaria y posiblemente el transporte de calcio ⁵⁵⁻⁵⁷.

La maquinaria contráctil del músculo liso vascular está compuesta de filamentos delgados (6.4 nm) y gruesos (14.5 nm). Los filamentos delgados están constituidos por las proteínas actina y tropomiosina y los filamentos gruesos por miosina. El mecanismo de la contracción es el resultado de cambios conformacionales que se suceden al interaccionar las moléculas de actina y miosina; en el músculo liso vascular es controlado por un componente de la cabeza de la cadena ligera de miosina. El establecimiento

de enlaces intermoleculares y por lo tanto la velocidad de acortamiento de la célula del músculo liso vascular son determinados por la fosforilación de la cadena ligera de miosina.

Esta fosforilación es producida por una cinasa de la cadena ligera de miosina, la cual es activada por calcio y calmodulina. La concentración de calcio ionizado intracelular es el factor determinante para esta fosforilación y por lo tanto es el regulador fisiológico de la contracción del músculo liso ⁵⁸⁻⁶⁰.

Las plaquetas se han utilizado como modelo celular para el estudio de la hipertensión por la similitud que guardan con las células del músculo liso vascular, ya que tienen un mecanismo de contracción-relajación mediado por calcio, así como receptores α_2 adrenérgicos y serotoninérgicos en su membrana plasmática, cuyo estímulo se traduce en aumento del calcio citoplásmico.^{44-47, 57} Sin embargo, aún existe controversia con respecto a si estas células son un modelo adecuado para el estudio de la preeclampsia ⁴⁸.

En este trabajo se encontró que existe correlación entre la concentración de calcio intraplaquetario y las cifras de tensión arterial. El hecho de que en las mediciones post-parto haya habido disminución del calcio intraplaquetario y de la tensión arterial apoya la validez del modelo. Estos resultados son semejantes a lo informado por Haller y colaboradores ⁴⁷ quienes encontraron diferencias significativas en las concentraciones intraplaquetarias de calcio libre en las pacientes preeclámpicas que estudiaron, así como una respuesta incrementada al estímulo con angiotensina II; Erne y cols. estudiaron pacientes con hipertensión esencial y varones normotensos y encontraron incremento del calcio libre arterial ⁴⁴. Sin embargo, estos hallazgos contrastan con los de Barr y cols. quienes no encontraron diferencias entre las pacientes estudiadas ni correlación entre las cifras de calcio intraplaquetario y tensión arterial ⁴⁶.

Las cifras de tensión arterial media y de calcio citosólico son muy semejantes entre nuestras pacientes y las estudiadas por Haller, no así con las del grupo estudiado por Barr quien al parecer únicamente incluyó pacientes con preeclampsia leve, lo cual sugiere que estos resultados pueden deberse probablemente a la gravedad de la hipertensión.

Para medir el calcio libre intraplaquetario, utilizamos el indicador

fluorescente de calcio fluo 3-AM. Este compuesto derivado de la fluoresceína pertenece a la nueva generación de indicadores metalocrómicos que se une en el interior de las células con membranas íntegras al calcio ionizado. A diferencia del quin-2 y el fura-2, tiene las ventajas de que se lee en longitudes de onda de alrededor de 500 nm, lo cual evita la interferencia con nucleótidos, la K_d es de 0.40 μM lo cual permite trabajar con concentraciones altas de calcio sin perder las mediciones muy bajas, la afinidad del calcio por el fluo-3-AM es menor que para el quin-2 o el fura-2, por lo que es posible obtener mediciones de Ca^{2+} citosólico más precisas ^{52, 61}.

En un intento de explicar a que se debe el aumento de Ca^{2+} citosólico en las pacientes preeclámpicas se decidió investigar uno de los mecanismos que podrían participar en este evento. Se buscó si existe flujo de calcio transmembrana estimulado por factores presentes en el plasma de las pacientes.

Los resultados sugieren que existe un factor circulante en el suero de las pacientes preeclámpicas que puede incrementar el flujo de calcio transmembrana.

Otros factores que podrían ser responsables del incremento de calcio citosólico son alteraciones en los mecanismos reguladores de la homeostasis del calcio intracelular, por ejemplo a nivel de la Ca^{2+} - Mg^{2+} /ATPasa que no permita la salida del calcio del citosol, o bien una alteración en el gradiente de Na^+ que cambie la permeabilidad de la membrana y afecte el transporte de calcio, o por último, que exista aumento en la sensibilidad de los canales de calcio que permita mayor entrada de calcio a la célula.

En este trabajo se encontró que la concentración intraplaquetaria de calcio ionizado es mayor en las pacientes con preeclampsia comparada con embarazadas normotensas; que este incremento se normaliza seis semanas después del parto; que existe correlación positiva entre las cifras de tensión arterial y la concentración de calcio intracelular; que el suero de las pacientes con preeclampsia provoca un mayor flujo de calcio hacia el interior celular, independiente de la concentración extracelular de este ión; y que el modelo celular empleado aparentemente es adecuado para el estudio de la preeclampsia.

REFERENCIAS.

1. Lindheimer MD, Katz AI. Hypertension in pregnancy. *N Engl J Med* 1985;313:675-80.
2. López-Llera M, Rubio G. Some aspects of the toxemic syndrome in a sector of the Mexican population. *J Reprod Med* 1970;4:19-28.
3. López-Llera M. Complicated Eclampsia. Fifteen year's experience in a referral medical center. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:28-35.
4. Mortalidad materna por causas, según entidad federativa. en: Mortalidad 1987. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación. SSA, pág. 117. 1991.
5. Chesley LC. A short history of eclampsia. *Obstet Gynecol* 1974;43:599-602.
6. Page EW. On the pathogenesis of pre-eclampsia and eclampsia. *J Obstet Gynaecol Br Comm* 1972;79:883-94.
7. Lindheimer MD, Katz AI. Pathophysiology of preeclampsia. *Annu Rev Med* 1981;32:273-89.
8. Chesley LC. Hypertension in pregnancy: Definitions, familial factors and remote prognosis. *Kidney Int* 1980;18:234-40.
9. Whichman K, Ryden G. Blood Pressure and renal function during normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986;65:561-6.
10. Lindheimer MD, Katz AI. The kidney in pregnancy. In Brenner BM, Rector FC Jr (Eds). *The Kidney 3a ed* WB Saunders, Philadelphia, 1986:1253-96.
11. Davison JM, Dunlop W. Renal hemodynamics and tubular function in normal human pregnancy. *Kidney Int* 1980;18: 52-61.
12. Redman CWG, Beilin L, Bonnar J, Wilkinson R. Plasma-ureate measurements in predicting fetal death in hypertensive pregnancy. *Lancet* 1976;1370-3.
13. Sagen N, Haram K, Nilsen S. Serum urate as a predictor of fetal outcome in severe pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 63:71-5.
14. Sheehan HL. Renal morphology in preeclampsia. *Kidney Int* 1980;18:241-52.
15. Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine* 1981;60:267-76.
16. Weelink GH, Tieffers PC, Smorenberg-Schoore ME. Antithrombin III levels in preeclampsia correlated with maternal and fetal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:1092-7.
17. Sibai BM, Anderson GD, McCubbin JA. Eclampsia II. Clinical significance of laboratory findings. *Obstet Gynecol* 1982;59:153-7.
18. Weinstein L. Syndrome of hemolysis elevated liver enzymes and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:159-67.
19. Kilam AP, Dillard SH, Patton RC, Pedersen PR. Pregnancy induced hypertension complicated by acute liver disease and disseminate intravascular coagulation. *Am J Obstet Gynecol* 1975;123:823-8.
20. Sibai BM, Spinnato JA, Watson DL, Hill GA, Anderson GD. Pregnancy outcome in 303 cases with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1984;64:319-25.
21. Pritchard JA, Cunningham FG, Masson RA. Does coagulation have a causative role in eclampsia. *Perspect Nephrol Hypertens* 1976;5:95-101.
22. Kaar K, Jouppila P, Kuikka J, Luotola H, Toivanen J, Rekonen A. Intervillous blood flow in normal and complicated late pregnancy measured by means of an intravenous ¹³³Xe Method. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980;59:7-10.

23. Naeye R. Maternal blood pressure and fetal growth. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:780-7.
24. Khong T, De Wolf F, Robertson W, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and small for gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:1049-59.
25. Abdul-Karim R, Assali NS. Pressor response to angiotensin in pregnant and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1981;82:246-51.
26. Talledo DE, Chesley LC, Zuspan FP. Renin-Angiotensin system in normal and toxemic pregnancies III. Differential sensitivity to angiotensin II and norepinephrine in toxemia of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100:218-21.
27. Gant NF, Jiménez JM, Whalley PJ, Chand S, Mac Donald PC. A prospective study of angiotensin II pressor responsiveness in pregnancies complicated by chronic essential hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1977;127:369-75.
28. Gant NF, Worley RJ, Everett RB, Mac Donald PC. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int* 1980;18:253-8.
29. Friedman S. Preeclampsia: A review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* 1988;71:122-37.
30. Pitkin RM, Gebhardt MP. Serum calcium concentrations in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1977;127:775-8.
31. Pitkin RM, Reynolds WA, Williams GA, Hargis GK. Calcium metabolism in normal pregnancy: A longitudinal study. *Am J Obstet Gynecol* 1979;133:781-90.
32. Pitkin RM. Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period. A review. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:99-109.
33. García MP, Mc Carron DA. Calcium and hypertension. *Nutrition Rev* 1984;42:205-13.
34. Mc Carron DA, Morris CD, Cole C. Dietary calcium in human hypertension. *Science* 1982;216:287-9.
35. Mc Carron DA. Low serum concentrations of ionized calcium in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1982;307:226-8.
36. Belizán JM, Pineda O, Sainz E, Menéndez LA, Villar J. Rise of blood pressure in calcium-deprived pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:183-8.
37. Ayachi S. Increased dietary calcium lowers blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Metab Clin Exp* 1979;28:1234-8.
38. Villar J, Belizán J, Fischer P. Epidemiologic observations on the relationship between calcium intake and eclampsia. *Int J Gynecol Obstet* 1983; 21: 271-8.
39. Belizán JM, Villar J, Pineda O y col. Reduction of blood pressure with calcium supplementation in young adults. *J Am Med Assoc* 1983;249:1161-5.
40. Kawasaki N, Matsui K, Masaharu I y col. Effect of calcium supplementation on the vascular sensitivity to Angiotensin II in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:576-82.
41. Belizán JM, Villar J, Repke J. The relationship between calcium intake and pregnancy-induced hypertension: up-to-date evidence. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:898-902.
42. Hernández MA, Ayala AR, Pereyra AC, Hernández C, Vadillo F. Concentraciones de calcio y magnesio en el plasma de mujeres embarazadas y con hipertensión gestacional. *Ginecol Obstet Mex.* 1988;56:35-8.
43. Taufield PA, Ales KL, Resnick LM, Druzin ML, Gertner JM, Laragh JH. Hypocalcemia in preeclampsia. *N Engl J Med* 1987;316:715-8.

ESTA TESIS NO DERE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

44. Erme P, Bolli P, Bürgisser E, Bühler F. Correlation of platelet calcium with blood pressure: Effect of antihypertensive therapy. *N Engl J Med* 1984;310:1084-8.

45. Lindner A, Kenny M, Meacham A. Effects of a circulating factor in patients with essential hypertension on intracellular free calcium in normal platelets. *N Engl J Med* 1987;316:509-13.

46. Barr S, Lees K, Butters L, O'Donell A, Rubin P. Platelet intracellular free calcium concentration in normotensive and hypertensive pregnancies in the human. *Clin Science* 1989;76:67-71.

47. Haller H, Oeney T, Hauck U, Distler A, Philipp T. Increase intracellular free calcium and sensitivity to angiotensin II in platelets of preeclamptic women. *Am J Hypertens* 1989;2:238-43.

48. Walters BNJ, Redman CWG. Treatment of severe pregnancy associated hypertension with the calcium antagonist nifedipine. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:330-6.

49. Constantine G, Beevers DG, Reynolds AL, Luesley DM. Nifedipine as a second line antihypertensive drug in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:1136-42.

50. Waisman GD, Mayorga LM, Cámara M, Vignolo CA, Martinelli A. Magnesium plus nifedipine: potentiation of hypotensive effect in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:308-9.

51. Erme P, Bühler FR, Affolter H, Bürgisser E. Excitatory and inhibitory modulation of intracellular free calcium in human platelets by hormones and drugs. *Eur J Pharmacol* 1983; 91:131-2.

52. Kao J, Haroolunlan A, Tsien R. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 1989;264:8179-84.

53. Siegel S. Estadística no paramétrica. 2da ed. México: Trillas, 1972:1-344.

54. Daniel WW. Bioestadística. 3a ed. México: Limusa, 1980: 221-281.

55. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987;56:395-433.

56. Dawson A. Regulation of intracellular Ca²⁺. *Essays Biochem* 1990;25:1-37.

57. Vermylen J, Badenhorst PN, Deckmyn H, Amout J. Normal mechanism of platelet function. *Clinics in Haematology* 1983;12:107-51.

58. Kuriyama H, Ito Y, Susuki H, Kitamura K, Itoh T. Factors modifying contraction-relaxation cycle in vascular smooth muscles. *Am J Physiol* 1982;243:H641-62.

59. Somlyo AP, Somlyo AV. Vascular Smooth Muscle: calcium, magnesium, and vascular smooth muscle function. In: Genest J, Kuchel O, Hamet P, Cantin M (eds): Hypertension. 2da. ed. Mc Graw Hill, New York, 1983:441-57.

60. Bohr DF, Webb RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. *Am J Med* 1984;77 [suppl 4a]:3-16.

61. Minta A, Kao J, Tsie R. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein Chromophores. *J Biol Chem* 1989;264:8171-8.

Cuadro 1
Características de las Pacientes
con Preeclampsia y Embarazo Normal.

Variables	Embarazo Normal n=10	Preeclampsia n=10	p
Edad Materna (años) *	25.0	23.0	NS
Edad Gestacional (semanas) *	38.0	37.0	NS
Paridad *	1.0	1.0	NS
Tensión Arterial Sistólica (mmHg) **	105.0 ± 10	140.0 ± 10	<0.0002
Tensión Arterial Diastólica (mmHg) **	70.0 ± 0	100.0 ± 5	<0.0002
Tensión Arterial Media (mmHg) **	81.6 ± 3	113.3 ± 7	<0.0002
Proteinuria > 1 g/L	Ausente	Presente	

* Mediana

** Mediana ± recorrido intercuartilico

NS: No significativo

Cuadro 2
Correlación entre las concentraciones de calcio ionizado intraplaquetario y tensión arterial. *

Variables	rho de Spearman	<i>p</i>
[Ca ²⁺] _i y Tensión sistólica	0.781	< 0.0005
[Ca ²⁺] _i y Tensión diastólica	0.741	< 0.0005
[Ca ²⁺] _i y Tensión arterial media	0.754	< 0.0005

* [Ca²⁺]_i (nM), Tensión arterial (mmHg). Los valores son las medianas.

Cuadro 3

Características de las pacientes con preeclampsia y embarazo normal.

Variables	Embarazo Normal n=8	Preeclampsia n=8	<i>p</i>
Edad Materna (años) *	30.5	34.5	NS
Edad Gestacional (semanas) *	34.5	37.2	NS
Paridad *	1.5	2.0	NS
Tensión Arterial Sistólica (mmHg) **	110.0 ± 5	150.0 ± 10	<0.0008
Tensión Arterial Diastólica (mmHg) **	70.0 ± 5	110.0 ± 5	<0.0008
Tensión Arterial Media (mmHg) **	83.3 ± 5	123.3 ± 6.7	<0.0008
Proteinuria > 1 g/L	Ausente	Presente	
CaT extracelular **	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.2	=0.09
CaL extracelular **	0.57 ± 0.1	0.57 ± 0.2	=0.8

* Mediana

** Mediana ± recorrido intercuartílico

NS: No significativo ; CaT: Calcio total; CaL: Calcio libre

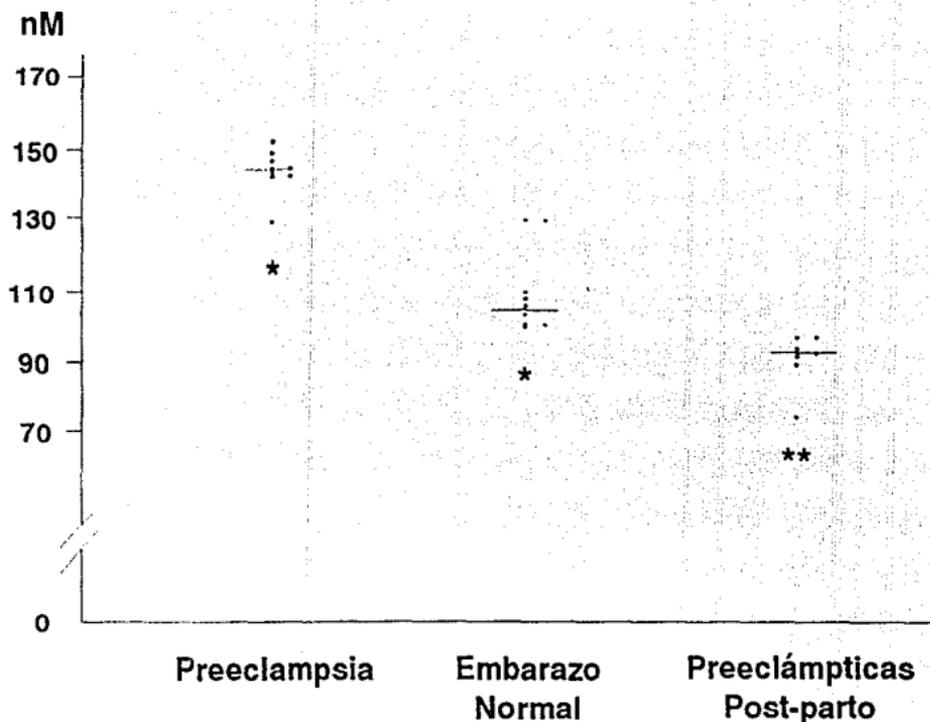


Figura 1. Concentraciones de calcio libre intraplaquetario en pacientes preeclámpticas y embarazadas normotensas. * $p < 0.0002$. ** $p < 0.02$. — Mediana.

° Embarazo Normal + Preeclampsia

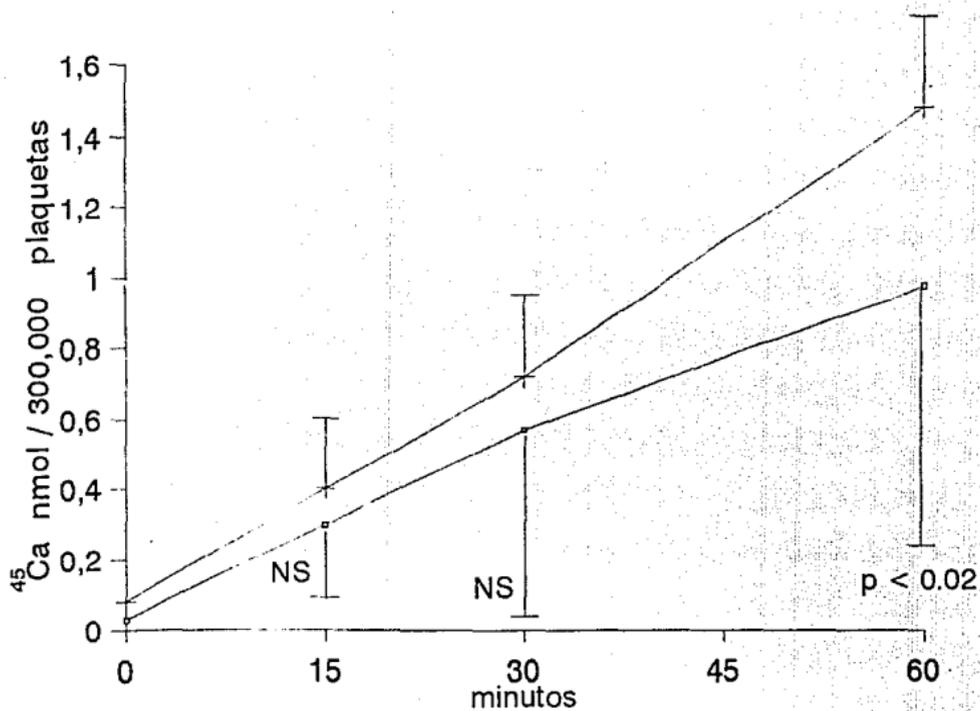


Figura 2. Transporte de calcio en plaquetas de varones sanos incubadas en suero de preeclámpticas y de embarazadas normales. NS: No significativo. Mediana \pm recorrido intercuartílico.