

11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE GINECO-OBSTRETICIA No. 3
'CENTRO MEDICO LA RAZA'

ALTERACIONES GENETICAS EN LA
PREECLAMPSIA - ECLAMPSIA
(ESTUDIO PRE-ELIMINAR

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TITULO EN LA ESPECIALIDAD DE
GINECOLOGIA Y OBSTRETICIA

PRESENTA

DR. JORGE JESUS CURIEL ORTIZ

ASESOR:
DR. JORGE FUENTES LEON

COLABORADORES:
DRA. MARIA EUGENIA CHAVARRIA OLARTE

MEXICO, D.F.

FEBRERO 2004



Handwritten signature and stamp of the author.

Handwritten signature of the advisor.

Official stamps from the University of Mexico and IMSS.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. S. ROBERTO LEMUS ROCHA

JEFE DE DIVISION DE EDUCACION, INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
EN SALUD

DR. JORGE FUENTES LEON

ASESOR DE TESIS

DR. JORGE JESUS CURIEL ORTIZ

ALUMNO

No. PROTOCOLO:

2001 692 0002
99 692 0030

INDICE

1.- RESUMEN

2.- INTRODUCCION

3.- ANTECEDENTES CIENTIFICOS

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

5.- OBJETIVOS

 GENERAL

 ESPECIFICOS

6.- HIPOTESIS

7.- MATERIAL Y METODOS

8.- ANALISIS Y RESULTADOS

9.- CUADROS Y GRAFICAS

10.- CONCLUSIONES

11.- BIBLIOGRAFIA

12.- ANEXOS

RESUMEN

ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA (ESTUDIO PRE-ELIMINAR).
Curiel JJ. Hospital de Gineco-Obstetricia No 3 "Centro Médico la Raza". Instituto Mexicano del Seguro Social. Gineco-obstetricia.

La preeclampsia es un padecimiento multifactorial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal y ocurre en 5 a 10% de todos los embarazos. Varios grupos han reportado una tendencia familiar a desarrollar preeclampsia, principalmente preeclampsia severa. Se ha sugerido la participación en la preeclampsia de genes ubicados en el cromosoma 1,3,4 o 18. En el cromosoma 1 se sugiere la mutación de genes relacionados con el factor 5 de coagulación, el de la metileno tetrahidrofolato reductasa y en el gen del angiotensinógeno.

OBJETIVO: Determinar la frecuencia con que se presentaron las mutaciones en los genes del factor V de coagulación, de la metileno tetrahidrofolato reductasa y del angiotensinógeno en mujeres puerperas, con y sin preeclampsia - eclampsia.

MATERIAL Y METODO: Se realizó un estudio clínico, comparativo, transversal, en pacientes atendidas en la Gineco 3 y la Gineco 4 del IMSS, sin preeclampsia (control) y con preeclampsia (casos), tomando una muestra de sangre y enviándose a analizar a laboratorio. Se obtuvo muestra sanguínea a 181 pacientes de las cuales teníamos 103 pacientes controles normales y 78 pacientes con preeclampsia severa. A las cuales se les analizó en el cromosoma 1 los genes que codifican para metileno tetrahidrofolato reductasa, factor V de coagulación y angiotensinógeno

RESULTADOS: Hasta el momento solo se habían analizado a 57 pacientes 30 controles y 27 casos para los genes que codifican para metileno tetrahidrofolato reductasa y el factor V, encontrando en las pacientes que llegaban a presentar algún tipo de lesión cromosómica ya sean mutaciones homocigotas, heterocigotas o mosaicos tenían un riesgo ligeramente mayor a presentar la enfermedad.

CONCLUSIONES: Mediante este estudio analizaron las mutaciones genéticas para los genes que codifican para metileno tetrahidrofolato reductasa y para el factor V de coagulación, observando una tendencia ligeramente mayor a desarrollar preeclampsia severa en las pacientes que presentan algún tipo de mutación en los genes que codifican para estas sustancias, observando una mayor tendencia en mujeres homocigotas para la mutación.

INTRODUCCION

El trabajo trató de investigar acerca de si hay mutaciones en algunos genes en el cromosoma 1, específicamente en los genes que codifican para el factor 5, en la metileno tetrahidrofolato reductasa y en el angiotensinógeno, en las pacientes con preeclampsia – eclampsia, provocando esto una mayor tendencia a desarrollar la enfermedad.

La preeclampsia – eclampsia es un padecimiento multifactorial y multisistémico que se inicia al principio del embarazo, se manifiesta clínicamente a partir de la vigésima semana y puede presentarse aún durante el parto y/o en el puerperio. En el contexto internacional y en México, esta entidad nosológica es un de las causas principales de morbilidad y mortalidad materna y perinatal y ocurre en el 5 al 10% de todos los embarazos (1,2). La preeclampsia – eclampsia se presenta con mayor frecuencia cuando existen factores de riesgo tales como: primiparidad, embarazos en edades extremas de la vida reproductiva (menos de 20 y más de 35 años) , antecedentes familiares y personales de embarazo con preeclampsia o de hipertensión arterial sistémica (1-7).

Existen suficientes evidencias que señalan que la preeclampsia es el resultado de una invasión anormal de las arterias espirales uterinas por parte del trofoblasto, debido a mecanismos inmunológicos y/o genéticos (2,6,8-10). Esta implantación deficiente se traduce en un perfusión restringida del tejido placentario, lo cual induce la liberación de un factor, o factores a la circulación sistémica que modifica(n) la estructura y la función de las células endoteliales, provocando activación de la cascada de la coagulación; aumento en la sensibilidad a los agentes vasopresores que normalmente se encuentran en la circulación, lo que produce vasoconstricción generalizada; aumento en la resistencia vascular sistémica con perfusión restringida de los órganos maternos, principalmente riñón, hígado y cerebro así como una distribución anormal de los líquidos corporales (2,6,8,9,11-13). No obstante lo anterior , la etiología de la preeclampsia no está aun completamente elucidada y por lo tanto no se cuenta con marcadores moleculares para diagnosticarla tempranamente.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Varios grupos de investigadores han reportado una tendencia familiar a desarrollar preeclampsia, principalmente preeclampsia severa (14 – 18). En estos estudios se encontró que la frecuencia de presentación de la preeclampsia es mayor en la madres, hermanas, hijas y nietas de mujeres con preeclampsia; sin embargo el patrón de herencia no es claro. Basándose en los hallazgos en mujeres con preeclampsia y normales y sus familiares del sexo femenino. Chesley y Cooper propusieron un modelo de preeclampsia con un solo gen recesivo con penetración incompleta (17). Asimismo estudiando los patrones de predisposición familiar y herencia genética de la preeclampsia a través de 3 o 4 generaciones en 94 familias de Islandia. Arngrimsson y col. (18) encontraron que los modelos de un solo gen recesivo o un gen dominante con patrones de herencia de penetración incompleta podrían explicar sus resultados. Por otra parte Hayward y col. (19) construyeron un mapa de exclusión para la preeclampsia asumiendo una herencia autosómica recesiva, sin embargo no pudieron establecer una relación positiva entre dos generaciones de familias escocesas con preeclampsia. Liston y Kilpatrick (20), por su parte sugirieron que existe una interacción entre el genotipo materno y el fetal. En todos estos modelos los resultados accesibles sugieren que es necesario un alelo relativamente común, que actúe como un "gen principal" y que confiera susceptibilidad a la preeclampsia para explicar el patrón de herencia observado. Sin embargo, los estudios de concordancia entre gemelas y los estudios de consanguinidad que podrían usarse para discriminar entre los modelos propuestos, son escasos y no son concluyentes (21,22).

Es poco probable que exista un genotipo particular que sea necesario para que se presente la preeclampsia. Basándose en el hecho de que las enfermedades más comunes del adulto, como la hipertensión, la diabetes mellitus y las neoplasias no se heredan como factores mendelianos simples, si no más bien varios loci confieren "labilidad genética" predisponiendo a los individuos a la enfermedad, puede proponerse que los "genes de la preeclampsia" actúen, posiblemente a factores ambientales, como loci de susceptibilidad que disminuyen el umbral de la mujer y predispongan el desarrollo de esta patología (10,23).

Por otra parte, cada día es más frecuente encontrar reportes en la literatura que señalen una contribución genética del feto al desarrollo de la preeclampsia (10,23). De hecho, un estudio de población realizado recientemente en Noruega en mujeres que habían cambiado de pareja (24) sugirió que la transmisión fetal de un gen paterno contribuye con la probabilidad de que se desarrolle la preeclampsia. También existe la posibilidad de que en el desarrollo de esta patología participe un polimorfismo en un gen paterno silenciado que sea expresado por el feto (25).

Genes Candidatos

La fisiopatología de la preeclampsia parece indicar una disfunción generalizada del endotelio vascular materno y la presencia de enfermedades vasculares como la diabetes, la hipertensión esencial y el síndrome antifosfolípidos en las mujeres embarazadas las predispone a esta patología (9,26). Estos antecedentes, conjuntamente con la tendencia al tromboembolismo que presentan algunas mujeres preeclámpicas, han permitido proponer a varios genes como candidatos que podrían estar involucrados en la fisiopatología de la preeclampsia (2,10,23,27). Los genes relacionados con el control de la presión sanguínea, con la distribución de los líquidos corporales, con las enfermedades vasculares y con la regulación de la remodelación vascular, parecen ser los candidatos más viables.

El análisis de mapeo de exclusión cromosómica asumiendo una herencia autosómica recesiva, así como los estudios de tipo genealógico han sugerido la participación en la preeclampsia de genes ubicados en los cromosomas 1,3,4,9 o 18 (28,29). No obstante que hasta ahora se han estudiado relativamente pocos genes candidatos a estar vinculados con esta patología, los resultados obtenidos con los que han sido evaluados apoyan esta propuesta. Por ejemplo, entre los genes analizados se encuentran dos relacionados con la coagulación, el factor V y el de la metileno tetrahidrofolato reductasa, así como el gen del angiotensinógeno; localizando todos en el cromosoma 1(23).

Mutación de Leiden en el factor V.

El factor V forma parte de la cascada de la coagulación y es procoagulante; su actividad está regulada por la proteína C activada. La mutación de Leiden en el factor V es la causa genética más común de resistencia a la proteína C activada y por lo tanto un factor de predisposición a la trombosis. Entre el 2 y el 7% de la población de origen europeo porta la mutación de Leiden del gen del factor V, que consiste en la sustitución de un solo nucleótido en este gen, en el nucleótido 1691, lo que ocasiona la sustitución de la glutamina por la arginina en la posición 506 de esta molécula y hace al factor V resistente a la inactivación proteolítica por la proteína C activada (30). La resistencia a la proteína C activada está presente en aproximadamente 20% de las mujeres con preeclampsia y esta mutación parece estar asociada con más del 60% de las complicaciones tromboembólicas del embarazo (27,31). Los intentos para definir mutaciones genéticas específicas asociadas con la preeclampsia ha demostrado relación entre la variante molecular del factor V y esta patología (32,37). Estudios recientes de esta mutación en población Caucásica, han encontrado que entre 9 y 19% de las mujeres que han padecido preeclampsia severa son heterocigotas para la mutación de Leiden, comparadas con el 4 – 7 % detectado en embarazadas normotensas (32,37).

Metileno tetrahidrofolato Reductasa

Una mutación relativamente común produce el polimorfismo C677T en el gen de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La sustitución de citosina por timina en el nucleótido 677 de este gen tiene como resultado una disminución en la actividad de esta enzima y por lo tanto en la síntesis de 5-metileno tetrahidrofolato, el donador principal de metilos en la conversión de homocisteína a metionina, así como un aumento en las concentraciones plasmáticas de homocisteína. Este evento constituye un factor de riesgo para la trombosis tanto venosa como arterial (34,38,39). La presencia de hiperhomocisteinemia es un evento que ha sido descrito en la preeclampsia y los efectos de la disminución del folato en el embarazo son más evidentes en las mujeres que portan la variante termolábil de la MTHFR (26,40). Existen estudios que han reportado recientemente un aumento en la homocigosidad para TT en mujeres con preeclampsia (33,34,41). Por lo tanto, la hetero u homocigosidad para estas mutaciones puede ser un factor predisponente para esta patología.

Angiotensinógeno T235

Hasta ahora, el gen más próximo en el estudio de la preeclampsia parecer ser el gen del angiotensinógeno. Reportes recientes señalan la presencia de variantes de este gen que aumentan el riesgo de desarrollar preeclampsia, principalmente la variante molecular que implica la sustitución de metionina por treonina en el codón 235 (Met 235 → Thr235), la cual se asocia con la hipertensión esencial (10,42,43). El angiotensinógeno es el precursor de la hormona vasoactiva angiotensina II, que participa de manera importante en la regulación de los eventos como la presión sanguínea, el volumen y distribución de los líquidos corporales y la remodelación vascular (10). En estudios publicados acerca de este gen en mujeres embarazadas de raza blanca; se ha encontrado aumentada la frecuencia de la variante M235T en las pacientes con preeclampsia, asociada con un aumento en la concentración plasmática de angiotensinógeno (43,45). Se ha reportado también que las mujeres heterocigotas para la mutación M235T tienen un aumento significativo en la expresión del alelo T235 en las arterias espirales deciduales y se ha postulado una relación causal con las alteraciones vasculares de la preeclampsia (44,46).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No obstante los avances científicos y tecnológicos en salud reproductiva, la preeclampsia – eclampsia continua siendo una de las causas principales de morbi-mortalidad perinatal, ya que hasta la fecha se desconoce su etiopatogenia, su diagnóstico es tardío y su resolución terapéutica sigue siendo la resolución del embarazo.

Desde hace varios años se ha propuesto que las alteraciones en la función del endotelio vascular podrían explicar en buena medida la fisiopatología de la preeclampsia. En los últimos años se han generado datos que sugieren que la disminución en la perfusión de la placenta provoca la secreción a la circulación materna de compuestos que afectan la función endotelial. Esta alteración provoca cambios en la sensibilidad vascular a los vasopresores circulantes, activa la coagulación y afecta la integridad vascular, eventos que parecen provocar los cambios fisiopatológicos característicos de la preeclampsia. En este contexto, estudios recientes han hecho evidente que el daño endotelial observado en las pacientes preeclámpicas no parece deberse a efectos tóxicos ni a un daño inespecífico, sino que coincide con las características morfológicas y funcionales de la activación endotelial (9). Se ha propuesto la participación de varios mecanismos para explicar este evento, sin que hasta la fecha se cuente con evidencia concluyente. Dentro de estas posibilidades se encuentra la participación de un componente genético en la preeclampsia. La identificación de genes asociados con esta patología ha sugerido como candidatos algunas mutaciones en genes ubicados en el cromosoma 1, principalmente el del factor V de la coagulación, el de la metileno tetrahidrofolato reductasa y el del angiotensinógeno.

Los reportes en la literatura acerca de la presencia de mutaciones en estos genes en pacientes con preeclampsia se han limitado básicamente al estudio de poblaciones altamente endogámicas, como son los Mormones de Utha en los Estados Unidos, Los Islandeses y los Israelitas. También se han realizado estudios en mujeres europeas de origen caucásico (Suecia, Escocia, Holanda, Hungría), Australianas (de origen Británico) y asiáticas (Japón y China), pero no existen reportes de estudios realizados en la población de origen latino en Europa o Latinoamérica, a excepción de dos

trabajos realizados en Palermo, Italia (33,39). Los resultados obtenidos hasta ahora han indicado variaciones en la frecuencia de estas mutaciones, aún entre poblaciones descritas como "Caucásicas", lo que sugiere la posibilidad de diferencias étnicas crípticas y marcada variabilidad entre las poblaciones.

En este estudio se propuso identificar la frecuencia con que se presentan algunas alteraciones génicas en las mujeres Mexicanas puerperas, derechohabientes del IMSS en el DF con y sin preeclampsia – eclampsia, con la finalidad de contribuir a elucidar el papel que guarda el componente cromosómico en la etiopatogenia de esta enfermedad en nuestra población.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia con la que se presentan mutaciones en los genes del factor V de coagulación, de la metileno tetrahidrofolato reductasa y del angiotensinógeno en mujeres puerperas con y sin preeclampsia – eclampsia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Identificar mutaciones específicas en los genes humanos del factor V de coagulación (mutación de Leiden), de la metileno tetrahidrofolato Reductasa (C677T) y del angiotensinógeno (Met 235→Thr235) en una población de derechohabientes del IMSS con preeclampsia – eclampsia y determinar la frecuencia con que se presentan.
- 2.- Constatar los resultados de las pacientes con preeclampsia – eclampsia con los obtenidos en mujeres que hayan cursado un embarazo normoevolutivo.

HIPOTESIS

Las mujeres derechohabientes del IMSS con preeclampsia – eclampsia presentan mutaciones en los genes del factor V de la coagulación, de la metileno tetrahidrofolato reductasa y/o del angiotensinógeno con mayor frecuencia que las embarazadas normales.

HIPOTESIS NULA

Las mujeres derechohabientes del IMSS con preeclampsia – eclampsia presentan mutaciones en los genes del factor V de coagulación, de la metileno tetrahidrofolato reductasa y/o del angiotensinógeno con la misma frecuencia que las embarazadas normales.

MATERIAL Y METODOS

TIPO DE ESTUDIO

Se efectuó un estudio clínico, comparativo, transversal.

UNIVERSO DE TRABAJO

La población en estudio estuvo comprendida por pacientes con diagnóstico de preeclampsia severa, síndrome de HELLP, eclampsia o embarazo normoevolutivo, que reciban atención médica en el Hospital de Gineco-Obstetricia No 3 del CM "La Raza" entre mayo del 2000 y mayo del 2001, que llenaron los criterios de inclusión y que aceptaron participar voluntariamente. Por cada paciente proveniente de UCIA que se incluyó en el estudio, se incluyó una mujer con diagnóstico de embarazo normoevolutivo y puerperio fisiológico.

CRITERIOS DE INCLUSION

1. Puerperio inmediato
2. Pacientes con diagnóstico comprobado de preeclampsia severa, síndrome de HELLP o eclampsia.
3. Pacientes con diagnóstico comprobado de embarazo normoevolutivo y puerperio fisiológico.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

1. Diagnóstico de preeclampsia leve.
2. Patología sistémica agregada a la madre.
3. Haber tenido un producto con malformaciones congénitas en el embarazo actual o en alguno anterior.

4. Rechazo a participar.

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Datos clínicos incompletos

DEFINICION DE VARIABLES

Variable Dependiente: Presencia de preeclampsia – eclampsia.

VARIABLES INDEPENDIENTES: Alteraciones en los genes: factor V de coagulación, metileno tetrahidrofolato reductasa y angiotensinógeno.

DEFINICIONES OPERATIVAS:

Medición de la presión arterial

Debido a que para el diagnóstico de la preeclampsia es de fundamental importancia la medición de la presión arterial, para su evaluación, se registro la fase IV y V de Korotkoff. Si la fase V es igual a 0, está se substituyó por la fase IV. El equipo para esta medición se encontraba debidamente calibrado. Se tomó en cuenta tanto los registros de los datos previos a la resolución del embarazo, como los correspondientes al puerperio inmediato, hasta el egreso de la paciente.

Determinación de las proteínas en orina.

Se utilizó el resultado del último análisis cuantitativo de una muestra de orina de 24 hrs antes de la resolución del embarazo. Cuando no se contaba con este estudio, se tomó en cuenta la

determinación realizada antes de la resolución del embarazo mediante el uso de tira reactiva (dipstick) y reportada en cruces.

Identificación del edema

Se tomó en cuenta tanto el reporte de ingreso hospitalario de la revisión de cara, pies y manos de la paciente en búsqueda de edema, así como los reportes en este sentido generados durante la estancia de la paciente en el hospital. Se reportará en cruces de acuerdo a su localización y profundidad.

Embarazo normoevolutivo

Mujeres gestantes sanas, con una presión sanguínea de 120/80 mm Hg o menor sin proteinuria.

Diagnóstico de la Preeclampsia

De acuerdo con la Norma Técnica Médica para la Prevención y Manejo de la preeclampsia – eclampsia del IMSS (1), la preeclampsia se diagnosticará como hipertensión gestacional con proteinuria y edema.

- a) Hipertensión Gestacional: El diagnóstico se realizará de acuerdo con los siguientes criterios:
Pacientes con preeclampsia severa o síndrome de HELLP, presión sistólica de 160 mm Hg o más y presión diastólica > 110 mm Hg en por lo menos dos ocasiones, con un mínimo de diferencia de 6 hrs entre ellas, o una presión diastólica > 100 mm Hg en pacientes bajo tratamiento antihipertensivo.
- b) Proteinuria : La prueba definitiva para el diagnóstico de proteinuria será la medición cuantitativa de la excreción total de proteínas en la orina en un periodo de 24 hrs. En las pacientes con preeclampsia severa o síndrome de HELLP deberá registrarse un valor > a 2 grs de proteínas en orina de 24 hrs, independientemente de los valores obtenidos con la tira reactiva. En el caso que no sea posible obtener la orina de 24 hrs, el diagnóstico de proteinuria se basará en el resultado del índice proteína / creatinina >3 + en tira reactiva en por lo menos 2 muestras obtenidas cuando menos con 4 hrs de diferencia.

- c) Edema: para su identificación se utilizará la clasificación señalada la Norma Técnica Médica Para la Prevención y Manejo de la Preeclampsia – eclampsia del IMSS (1). Se tomarán en cuenta tanto los reportes del ingreso hospitalario, como los generados durante la estancia en el hospital.

Síndrome de HELLP

Se considerará como síndrome de HELLP la presencia de signos y síntomas de preeclampsia severa, acompañados de trombocitopenia (Número plaquetas $< 100 \times 1000\text{mm}^3$), enzimas hepáticas anormales ($>$ a dos desviaciones estándar por arriba de los valores normales) y hemólisis (LDH $> 1.2\text{mgs/dl}$) o identificación de anemia hemolítica en un frotis de sangre periférica).

Diagnóstico de la Eclampsia

De acuerdo con la Norma Técnica Médica Para la Prevención y Manejo de la Preeclampsia – eclampsia del IMSS (1), la eclampsia se diagnosticará como el desarrollo de convulsiones y/o coma en pacientes con signos y síntomas de preeclampsia en ausencia de otras causas de convulsiones.

La recolección de datos incluyó también la presencia de complicaciones severas, incluyendo accidentes vasculares cerebrales, falla renal, desprendimiento prematuro de placenta, elevación de las enzimas hepáticas sin otros síntomas de HELLP y coagulación intravascular diseminada. Se registraron también los casos de muerte materna y / o fetal.

PROCEDIMIENTOS

De acuerdo a la evolución del embarazo se formaron 3 grupos de estudio:

1. Grupo control formado por mujeres con embarazo normoevolutivo y puerperio fisiológico.
2. Pacientes con diagnóstico de preeclampsia severa o síndrome de HELLP.
3. Pacientes con diagnóstico de eclampsia.

A todas las pacientes que se incluyeron en este protocolo, se les extrajo una muestra de sangre venosa periférica (10ml), la cuál se deposito en un tubo conteniendo EDTA 0.5M como anticoagulante. Esta muestra se guardo en refrigeración (4°C) hasta por 48 horas. La obtención del paquete de leucocitos se realizó mediante la utilización de un gradiente de Ficoll-Hipaque. Los leucocitos recuperados se lavarán con una solución conteniendo NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 nM y Tris-HCl 10 nM, ph 7.6 se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. A 4°C, y posteriormente se les añadirá 1 ml del reactivo "Tripure" para aislar en una sola etapa el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA), de acuerdo al procedimiento recomendado por el proveedor (ROCHE). La concentración y la pureza de los ácidos nucleicos se determinaron mediante espectrofotometría (260/280 nm) y cromatografía en gel de agarosa al 1%.

El DNA aislado y purificado fue utilizado para amplificar regiones específicas de los genes: factor V de coagulación (FV), metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y angiotensinógeno (AGT), ubicados en el cromosoma humano 1. Se utilizó 150 mcg. de cada muestra e DNA para llevar a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos.

Angiotensinógeno.

Para el análisis del gn GT se utilizó los oligonucleótidos diseñados por Hixson y Powers (47), los cuales están dirigidos a la amplificación del exón 2 de este gen. En este exón se localizan los sitios que con más frecuencia se alteran en los síndromes de hipertensión arterial (mutaciones puntuales T174M, M235T). La estrategia que se uso se describe a continuación:

1) Para la realización de la PCR se utilizaron los oligonucleótidos:

5'-GATGCGCACAAAGGTCCT-gtc-3' (del exón 2) y

5'-GCCAGCAGA-GAGGTTTGCCT-3' (del intrón 2), con la siguiente mezcla de reactivos: 0.5 mcg del DNA, 20 pmol de cada oligonucleótido, 1U de taq polimerasa, los desosirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) a una concentración 0.2mM final de cada uno de ellos, Tris-HCl 10mM, mgCl 50mM, pH 8.3. en un volumen final de 20 mcg. La reacción se llevo a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos

de amplificación (60°C por 1 min. 70°C por 2 min. Y 95°C por 1 min.) El fragmento que se obtuvo fue de 354 pares de bases (pb)

- 2) Una décima parte del amplificado se sometió a electroforesis para verificar la eficiencia de la PCR.
- 3) Después de corroborar el procedimiento, otra décima parte se sometió a electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida con un gradiente de temperatura, para la identificación de mutaciones puntuales por medio de diferencias en la movilidad electroforética de los fragmentos utilizados (47). Para llevar a cabo esta etapa, se utilizó el equipo semi-automatizado Dcode System (Bio Rad).
- 4) Al detectarse una diferencia de movilidad electroforética, indicativa de mutación, el DNA amplificado se marco para su secuenciación posterior: Para este último procedimiento se previó utilizar el estuche Big Dye (Perkin Elmer) y el secuenciador automatizado de DNA (Applied Biosystem 373).

Factor V de coagulación.

Para la identificación de la mutación de Leiden (arg-506-Glu) en el gen del Factor V se usó la siguiente metodología: Se utilizó los oligonucleótidos diseñados por Dizon-Townson y col (329), los cuales están dirigidos a la amplificación del exón 10 del gen, en el cual se encontró el sitio que se altera más frecuentemente (la mutación puntual del nucleótido 1691 que genera un cambio G→A en la posición 506 y un sitio de restricción para la enzima MnlI).

- 1) Para la realización de la PCR se utilizó como oligonucleótidos:
5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3' (del exón 10) y
5'-TGTTATCACACTGGTGCTAA-3' (del intrón 10), con la siguiente mezcla de reactivos: 300 ng del DNA, 0.25 µg. /L de cada oligonucleótido, 1.25 U de Taq polimerasa, 200 mcg/L de cada uno de los dNTP's. MgCl₂: 3.0 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.3, albúmina de suero de bovino a una concentración final de 0.4 mg/ml y 0.4% de dimetil sulfóxido, en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción en el termociclador fueron las siguientes: desnaturación a 94°C

por minutos. Seguida por 36 ciclos de amplificación (94°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos).

- 2) El fragmento producto de la amplificación es de 267 pb, el cual fue sometido a una digestión enzimática con MnlI para corroborar la existencia de la mutación. El análisis de restricción se llevo a cabo con la siguiente mezcla de reactivos: 3.75U de la enzima, NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10mM, DL- ditioneitol 1 mM a pH 7.9 albúmina de suero de bovino a una concentración final de 0.04 ng/ml y 20 µl del producto de a PCR, en volumen final de 40 µl. La reacción se incubo a 37°C durante 18m horas. Los productos de la digestión se separaron por tamaño utilizando electroforesis en gel (32). Los alelos naturales producen fragmentos de restricción de 37, 67 y 163 pb. Mientras que los alelos mutados producen fragmentos de 67 y 200 pb.
- 3) El procedimiento de digestión generó un resultado positivo en el amplificado, se siguieron los mismos pasos realizados para el gen de angiotensinógeno, a partir del inciso número 3.

Metilnotetrahidrofolato reductasa

Para analizar este gen se utilizó los oligonucleótidos diseñados por Frosst y col. (38), los cuales permiten amplificar el exón 4 del gen en el cual se encuentra contenida la mutación C→T en el nucleótido 677, que convierte a la Alanina en Valina y además genera un sitio de restricción para la enzima HinfI.

- 1) Para la realización de la PCR se utilizó como oligonucleótidos:
5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' (exónico) y
5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTGG-3' (intrónico), con la siguiente mezcla de reactivos: 300 ng del DNA, 0.2 µmoles/L de cada oligonucleótido, 2.5 U de Taq polimerasa, 200 µmol/L de cada uno de los dNTP's, MgCl₂ 1.5 mmol/L. Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.3, en un volumen final de 100 µl. Las condiciones de reacción en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, seguida por 36 ciclos de amplificación (95°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos y 72°C por 45 segundos).
- 2) El fragmento producto de la amplificación es de 198 pb. Para verificar la mutación, los amplificados fueron sometidos a una digestión enzimática con HinfI. El análisis de restricción se

llevó a cabo con la siguiente mezcla de reactivos: 3.75 U de la enzima, NaCl 50 mM, Tris – HCl 10mM, MgCl₂ 10 mM, DL-ditiotreitol 1 mM a pH 7.9, albúmina de suero de bovino a una concentración final de 0.04 mg/ml y 20 µl del producto de la PCR, en un volumen final de 40 µl. La reacción se incubó a 37 °C durante 18 hrs. Los alelos naturales producen un solo fragmento de 198 pb. Después de incubarse con la enzima de restricción mientras que los alelos mutados producen dos fragmentos de 175 y 23 pb. Respectivamente.

- 3) Dado que el procedimiento de digestión generó un resultado positivo, se realizaron los mismos pasos para el gen angiotensinógeno a partir del inciso número 3.

ANALISIS Y RESULTADOS

Se tomo muestra sanguínea para análisis a 181 pacientes, previo consentimiento informado (anexo1). De las cuales 103 eran pacientes sanas con embarazos normoevolutivos y 78 eran pacientes que se encontraban en la terapia intensiva donde se les tomo la muestra.

Hasta el momento solo se habían analizados 57 pacientes y solo para metileno tetra hidrofolato reductasa y para el factor V; de las cuales 30 pertenecian a los controles (embarazos normoevolutivos) y 27 a pacientes con preeclampsia.

De las 30 pacientes con embarazos normoevolutivos se formaron 4 grupos que fueron analizadas para metileno tetra hidrofolato reductasa y que son: pacientes que eran homocigotas sin mutación (w/w), homocigotas con mutación (m/m), heterocigotas (w/m) y mosaicos. Observando la siguiente distribución; 12 pacientes homocigotas negativas a alguna mutación (40%), 6 pacientes homocigotas para una mutación (20%), 5 pacientes heterocigotas (16.6%) y 7 mosaicos (23.4%).

Fueron 27 pacientes con preeclampsia las que fueron analizadas para metileno tetra hidrofolato reductasa encontrando 4 pacientes homocigotas sin mutación (14.8%), 8 pacientes homocigotas para mutación (29.6%), 7 pacientes heterocigotas (26.2%) y 8 mosaicos (29.4%).

De las 57 pacientes, las que no tuvieron lesión cromosómica fueron aquellas que eran homocigotas sin mutación para metileno tetra hidrofolato reductasa de las cuales encontramos 12 (21%) en los controles que son pacientes sin preeclampsia y 4 (7%) en los casos que son pacientes con preeclampsia, y de las que se encontró lesión cromosómica fueron en los controles 18 (31.5%) pacientes contra 23 (40.3%) pacientes de los casos.

Y analizando tan solo las pacientes homocigotas con mutación y homocigotas sin mutación encontramos que son 30 pacientes, de las cuales los controles sin mutación fueron 12 (40%) y de

los casos 4 (13.3%), y de los controles encontramos homocigotas con mutación a 6 pacientes de los controles (20%), contra 8 pacientes de los casos (26.7%).

De las pacientes que fueron analizadas para el factor V de coagulación con la mutación de Leiden encontramos que fueron analizadas 30 pacientes sanas sin preeclampsia (controles) y 27 de las pacientes con preeclampsia (casos), formándose solo tres grupos los cuales eran: pacientes homocigotas sin mutación (w/w), homocigotas con mutación (m/m) y heterocigotas. Donde encontramos que de las 30 pacientes sin preeclampsia homocigotas sin mutación eran 16 (53.3%), de las homocigotas con mutación fueron 8 (26.7%) y de las heterocigotas fueron 6 (20%).

Dentro de las pacientes con preeclampsia (casos) encontramos que fueron 27 las analizadas de las cuales 9 (33.3%) eran homocigotas sin mutación, 11 (40.7%) eran homocigotas con mutación y 7 (26%) eran heterocigotas.

Del total de las pacientes que fueron 57 encontramos que 16 pacientes de los controles (28%) no presentaban lesión cromosómica (eran homocigotas sin mutación), contra 9 de las pacientes con preeclampsia (15.7%). 14 de las pacientes de los controles (24.6%) presentaban algún tipo de lesión cromosómica contra 18 de los casos (31.7%) que presentaban algún tipo de lesión cromosómica.

Haciendo la relación de las 57 pacientes específicamente por grupo encontramos que 16 (28%) pacientes de los controles eran homocigotas sin mutación, contra 9 (15.7%) de los casos; pacientes homocigotas para mutación de los controles fueron 8 (14%), contra 11 (19.2%) de los casos; y de las pacientes heterocigotas encontramos 6 de los controles (10.5%), contra 7 (12.6%) pacientes de los casos.

Analizando a ambos grupos únicamente para aquellos que presentaban homocigosidad con mutación y sin mutación encontramos que fueron 44 pacientes de las cuales del grupo control fueron 16 (36.3%) eran homocigotas sin mutación contra 9 (20.6%) de los casos, y de las homocigotas con mutación de los controles fueron 8 (18.1%) contra 11 (25%) de los casos.

Aún faltaba por analizar el resto de las pacientes y el gen que codifica para el angiotensinógeno, más como el procedimiento llevó más tiempo del planeado queda pendiente reportar el resto de las pacientes.

Para el análisis inferencial se utilizó la prueba de chi cuadrada, con un nivel de significancia <0.05 . Se calculó la razón de momios con un intervalo de confianza de 95%.

En los siguientes recuadros tenemos la relación de los resultados obtenidos de las pacientes:

PACIENTES SIN PREECLAMPSIA			
CONTROLES	CONC. DE DNA	MTHFR	FACTOR V
	ng/ml	Restricción Hinf-1	Restricción Mnl-I
N1	724	Mosaico	m/m
N2	500	w/w	w/w
N3	172	w/w	w/w
n4	269	w/w	w/w
n5	794	Mosaico	w/w
n6	590	m/m	w/w
n7	226	w/w	w/w
n8	202	m/m	w/w
n9	181	w/m	m/m
n10	690	m/m	m/m
n11	300	w/m	m/m
n12	208	Mosaico	w/m
n13	639	Mosaico	m/m
n14	790	Mosaico	w/w
n15	360	w/m	w/w
n16	530	m/m	w/m
n17	389	w/w	w/m
n18	400	m/m	w/w
n19	806	w/w	w/w
n20	330	w/w	m/m
n21	599	m/m	w/m
n22	470	w/m	w/w
n23	312	w/w	w/w
n24	861	w/w	w/w
n25	751	Mosaico	w/w
n26	272	w/w	w/m
n27	221	w/m	w/w
n28	350	Mosaico	m/m
n29	746	w/w	m/m
n30	160	w/w	w/m

PACIENTES CON PREECLAMPSIA			
CASOS	CONC. DNA	MTHFR	FACTOR V
	ng/ml	Restricción Hinf-1	Restricción Mnl-I
LR-2	132	W/m	m/m
LR-6	611	M/m	m/m
LR-5	134	M/m	m/m
LR-8	815	w/m	w/m
LR-9	128	mosaico	w/m
LR-17	943	mosaico	w/w
LR-18	135	m/m	w/w
LR-24	426	mosaico	m/m
LR-30	371	m/m	m/m
LR-32	207	w/m	w/m
LR-46	347	mosaico	w/m
LR-48	275	m/m	m/m
LR-56	208	m/m	w/w
LR-57	582	mosaico	w/w
LR-70	330	w/w	w/w
LR-81	230	w/w	w/m
LR-82	260	w/m	m/m
LR-83	268	w/m	m/m
LR-85	143	m/m	w/m
LR-86	427	mosaico	w/w
LR-87	271	w/w	m/m
LR-88	797	mosaico	m/m
LR-89	590	w/m	w/w
LR-90	226	w/w	w/w
LR-91	202	m/m	w/m
LR-93	181	w/m	m/m
LR-94	619	mosaico	w/w

TABLAS Y GRAFICAS

PACIENTES HOMOCIGOTOS SIN Y CON MUTACION DE METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

	HOMOCIGOTOS S/MUTACION	HOMOCIGOTOS C/MUTACION
CONTROLES	12 (40%)	6 (20%)
CASOS	4 (13.34%)	8 (26.7%)

TOTAL DE PACIENTES SIN Y CON MUTACION PARA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

	PACIENTES SIN MUTACION	PACIENTES CON MUTACION
CONTROLES	12	18
CASOS	4	23

TOTAL DE PACIENTES POR GRUPO ESPECIFICO
PARA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

	HOMOCIGO SIN / MUT	HOMOCIGO CON / MUT	HETEROCIGOTO	MOSAICO	TOTAL
PACIENTES SIN / PREEC (CONTROLES)	12	6	5	7	30
PACIENTES CON / PREEC (CASOS)	4	8	7	8	27

PACIENTES HOMOCIGOTOS SIN Y CON MUTACION DE
FACTOR V

	HOMOCIGOTOS SIN MUTACION	HOMOCIGOTOS CON MUTACION
CONTROLES	16 (28%)	14 (24.5%)
CASOS	9 (16%)	18 (31.5%)

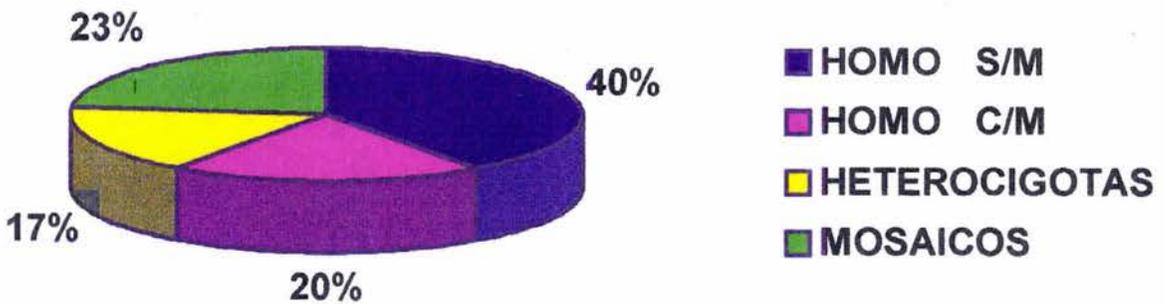
TOTAL DE PACIENTES SIN Y CON MUTACION DE
FACTOR V

	HOMOCIGOTOS S/MUTACION	HOMOCIGOTOS C/MUTACION
CONTROLES	16 (36.34%)	14 (24.5%)
CASOS	9 (20.6%)	18 (31.5)

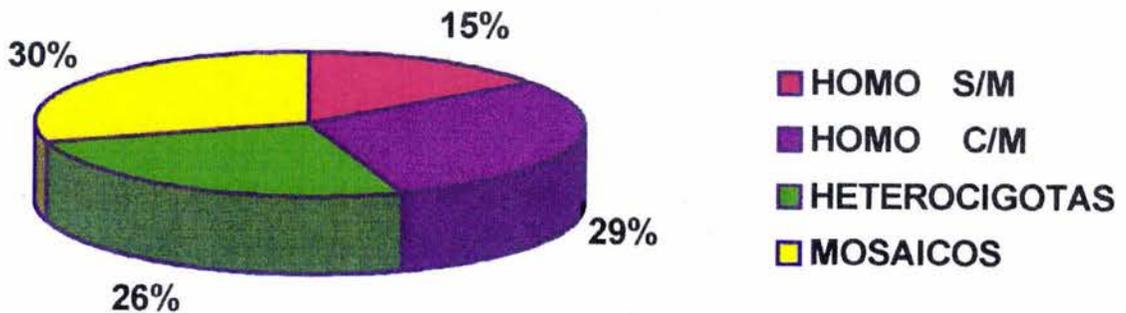
TOTAL DE PACIENTES POR GRUPO DE
FACTOR V

	HOM S/M	HOM C/M	HETEROCIGOTO	TOTAL
PACIENTES SIN / PREEC	16 (28%)	8 (14%)	6 (10.5)	30
PACIENTES CON / PREEC	9 (15.7)	11 (19.2%)	7 (12.6)	27

**PACIENTES CON EMBARAZO NORMOEVOLUTIVO
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA**

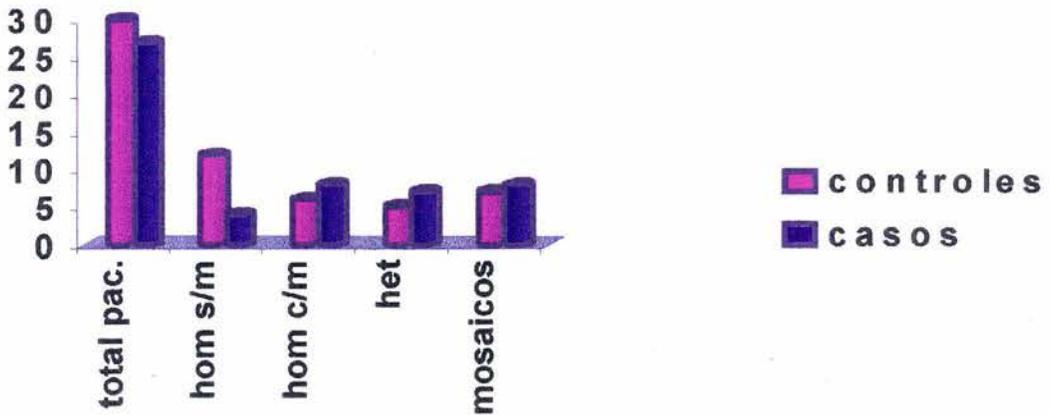


**PACIENTES CON PREECLAMPSIA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA**



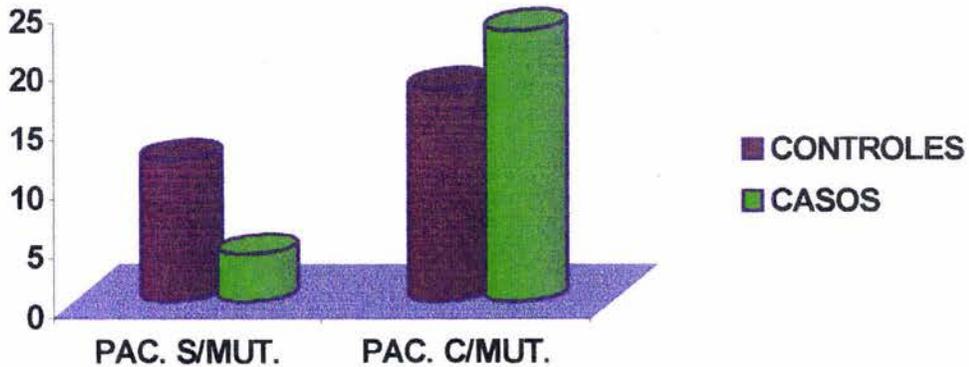
RELACION DE PACIENTES

METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

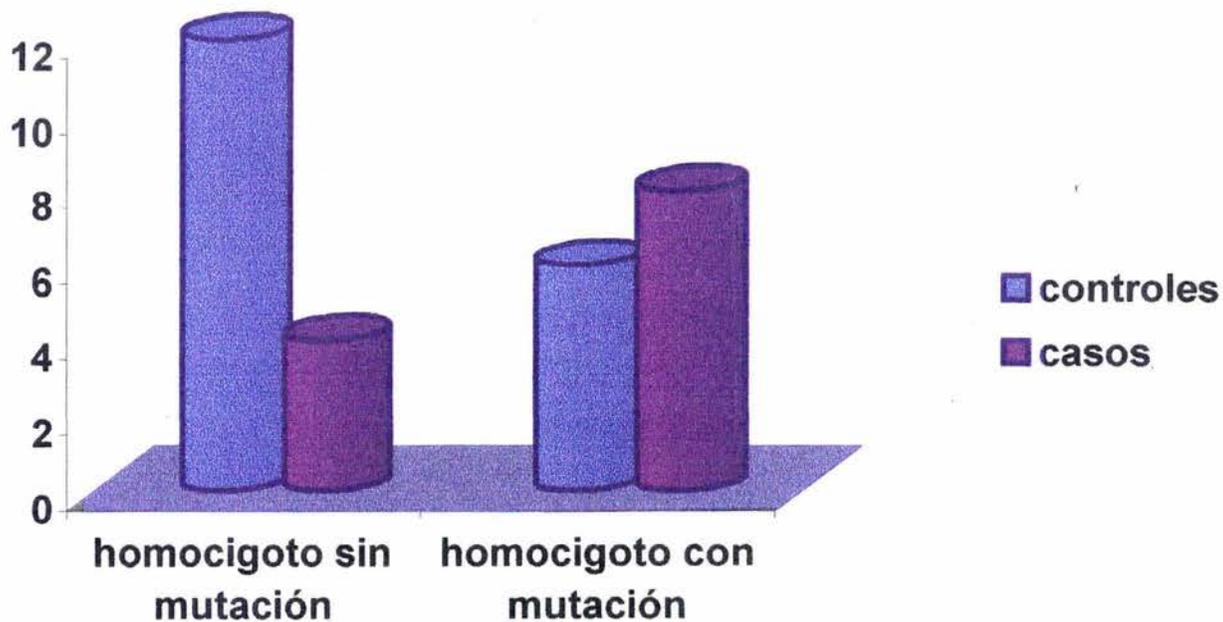


TOTAL DE PACIENTES CON Y SIN LESION

METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

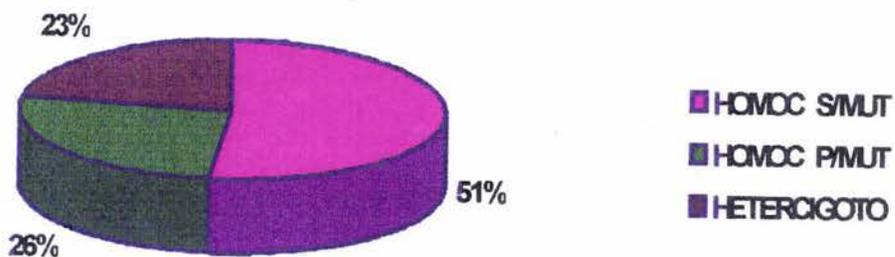


**PACIENTES HOMOCIGOTAS CON Y SIN MUTACION
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA**



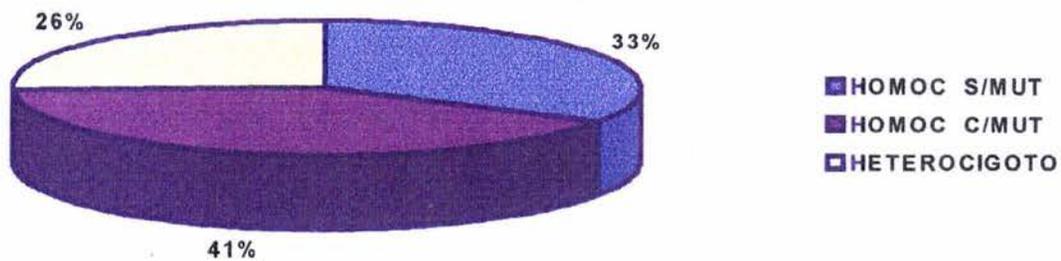
PACIENTES SIN PREECLAMPSIA

FACTOR V

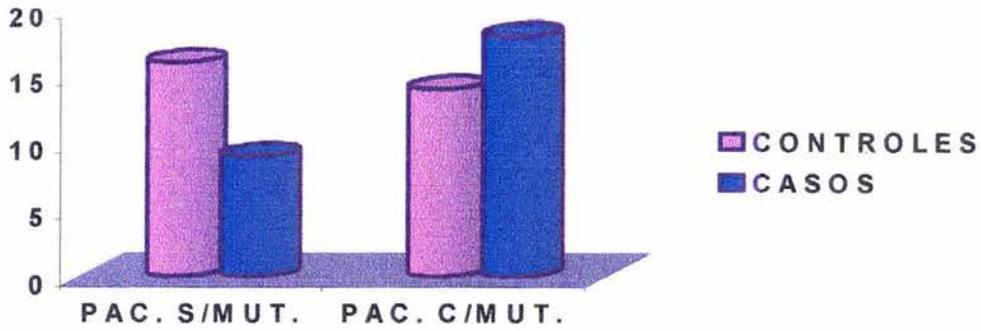


PACIENTES CON PREECLAMPSIA

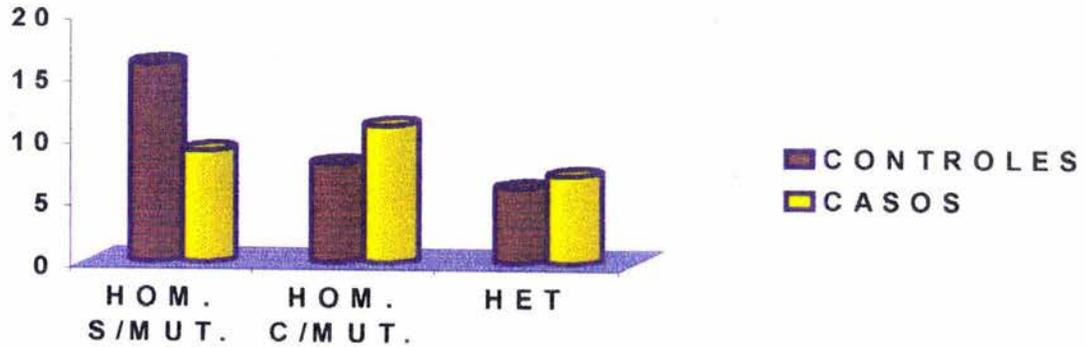
FACTOR V



**TOTAL DE PACIENTES CON Y SIN MUTACION
FACTOR V**

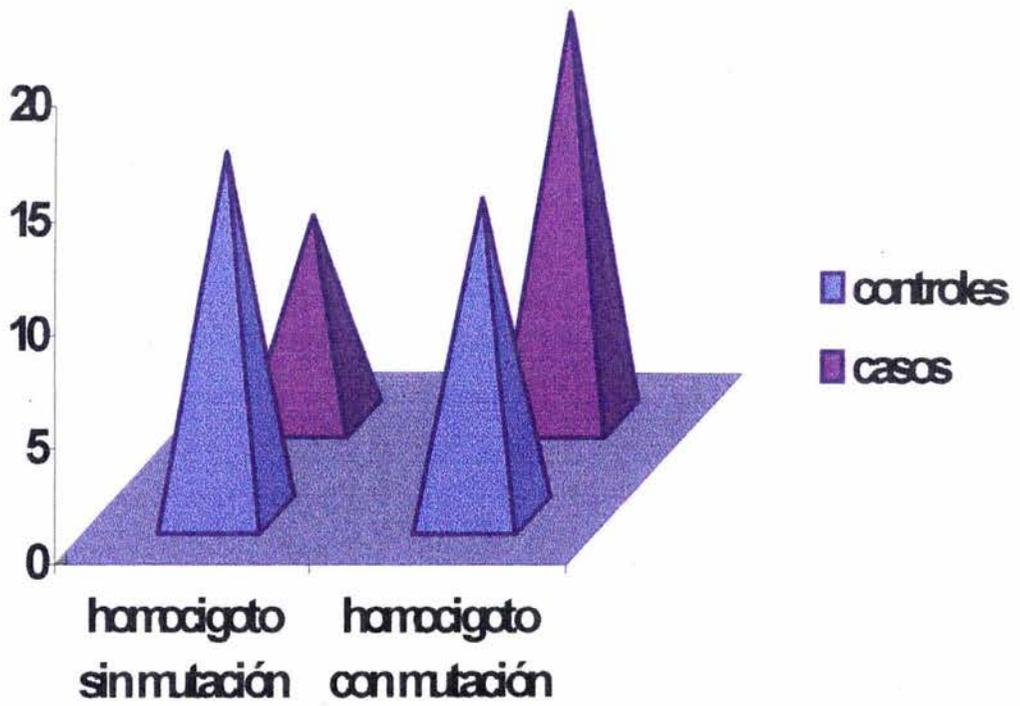


**RELACION DE PACIENTES
FACTOR V**



PACIENTES HOMOCIGOTAS CON Y SIN MUTACION

FACTOR V



CONCLUSIONES

La preeclampsia - eclampsia sigue siendo un padecimiento frecuente en nuestro país, el cual tiene un alto índice de morbilidad y mortalidad, siendo que no se ha encontrado una causa en específico o un factor predisponente en especial, encontramos que quizás la unión de varios de ellos pudiesen llegar a influir para el desarrollo de la enfermedad, y como ejemplo de algunos de ellos encontramos el factor cultural, el social, socioeconómico y nutricional de las pacientes, siendo este último uno de uno de los más importantes, ya que en este tipo de pacientes encontramos una deficiencia importante de minerales y proteínas.

El tipo de estudio realizado es un estudio observacional, transversal, comparativo, clínico en donde observamos que las pacientes que tienen lesión cromosómica en el gen que codifica para metileno tetrahidrofolato reductasa y para el factor V de coagulación (mutación de Leiden) podrían llegar a presentar mayor tendencia a desarrollar preeclampsia - eclampsia, aunque la diferencia encontrada es muy pequeña y la cantidad de pacientes es poca.

Dentro de los hallazgos del gen que codifica para metileno tetrahidrofolato reductasa encontramos que las pacientes que tienen algún tipo de lesión cromosómica tienen mayor riesgo de presentar la enfermedad, observando una mayor probabilidad de presentar la enfermedad cuando encontramos que las pacientes son homocigotas para la mutación, siendo una diferencia ligeramente menor en las pacientes heterocigotas.

Para lo que es el factor V de coagulación encontramos también que las pacientes que tienen algún tipo de mutación cromosómica tienen mayor riesgo de presentar la enfermedad; observando una mayor propensión de desarrollar la enfermedad aquellas que son homocigotas para la mutación, no observando tal diferencia entre las pacientes heterocigotas, ni con las pacientes que se les analizó en el grupo del metileno tetrahidrofolato reductasa.

También observamos que cuando comparamos ambos grupos el de pacientes con embarazos normoevolutivos y el de las pacientes con preeclampsia severa para los genes que codifican para

metileno tetrahidrofolato reductasa y del factor V, encontramos que las pacientes con preeclampsia severa tendían a tener una mayor cantidad de mutaciones en ambos genes (tanto en el de la metileno tetrahidrofolato reductasa como en el del factor V), en comparación con las pacientes que no eran preeclámplicas, siendo mayor la probabilidad cuando se encontraban mutaciones homocigotas en ambos grupos.

Sería conveniente realizar el estudio en las pacientes con factores de riesgo para desarrollar preeclampsia, ya que esto podría servir para aumentar medidas y cuidados en este tipo de pacientes, tratando de evitar la aparición de la enfermedad y de sus complicaciones, más sin embargo debido al costo y a la poca accesibilidad aún no es posible difundir su uso, por lo que lo podríamos considerar por el momento poco práctico.

Además falta el análisis del resto de las pacientes y del gen que codifica para el angiotensinógeno, los cuales se encuentran aún en procesamiento, ya que su análisis tardó más del tiempo previsto, dado que la cantidad de pacientes es poca y que encontramos pocas referencias acerca de este tipo de lesiones cromosómicas sería conveniente realizar nuevos estudios con una mayor cantidad de pacientes.

Hay que recordar que este tipo de lesiones serían un factor predisponente para el desarrollo de la enfermedad, no un factor causal por lo que es conveniente llevar un estricto control del embarazo en todas las pacientes, teniendo que ser más acuciosos en aquellas pacientes que presentan factores de riesgo para el desarrollo de la misma o que ya han presentado la enfermedad.

REFERENCIAS

1. IMSS: Norma Técnico Médica Para la Prevención y Manejo de la Preeclampsia-Eclampsia. Dirección de Prestaciones Médicas. Coordinación de Salud Reproductiva y Materno Infantil, 1995.
2. Dekker GA, Sibai BM: Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359-1375
3. Dekker GA: Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42: 422-435.
4. Lara González AL, García Alonso A, Macías Gallardo E, Alpuche G: Mortalidad materna por eclampsia. Cinco años de revisión. *Ginec Obstet Mex* 1999; 67: 253-257.
5. Knuist M, Bonsel GJ, Zondervan HA, Treffers PE: Risk factors for preeclampsia in nulliparous women in distinct ethnic groups: a prospective cohort study. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 174-178.
6. Roberts JM, Redman CWG: Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension *Lancet* 1993; 341, 1447-1451.
7. Stone JL, Lockwood CJ, Berkowitz GS, Alvarez M, Lapinski R, Berkowitz RL: Risk factors for severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 357-361.
8. Broughton Pipkin F, Rubin PC: Pre-eclampsia – the “disease of theories”. *Br Med Bull* 1994; 50:381-396.
9. Roberts JM: Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Perinatol* 1998; 16:5-15.

10. Morgan T, Ward K: New insights into the genetics of preeclampsia. *Semin Perinatol* 1999; 23:14-23.
11. Walsh SW, Leeper SW: Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16:93-104.
12. Arbogast BW, Leeper SC, Merrick RD, Olive KE, Taylor RN: Which plasma factors bring about disturbance of endothelial function in preeclampsia? *Lancet* 1994; 343:340-341.
13. Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, McLaughlin MK: Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1025-1034.
14. Chesley L, Annitto L, Cosgrove R: The familial factor in toxemia of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1968; 32:303-311.
15. López- Llera M: Recurrent eclampsia. Clinical data, morbidity and pathogenic considerations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993; 50:39-45
16. Cooper D, Liston W: Genetic control of severe preeclampsia. *J Med Genet* 1979; 16:409-416.
17. Chesley LC, Cooper DW: Genetics of hypertension in pregnancy: Possible single gene control of preeclampsia and eclampsia and the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:898-908.
18. Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G: Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990; 97:762-769.

19. Hayward C, Livingstone J, Holloway S, Liston WA, Brock DJ: An exclusion map for pre-eclampsia: assuming autosomal recessive inheritance. *Am J Hum Genet* 1992; 50:749-757.
20. Liston W, Kilpatrick D: Is genetic susceptibility to preeclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus? *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98:1079-1086.
21. Thornton JG, Onwude JL. Pre-eclampsia: discordance among identical twins. *BMJ* 1991;303:1241-1242.
22. George K, Vedamony J, Idikulla J, Rao PS: The effect of consanguinity on pregnancy induced hypertension. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*; 1992; 32:231-232.
23. Broughton-Pipkin F: What is the place of genetics in the pathogenesis of pre-eclampsia? *Biol Neonate* 1999; 76:325-330.
24. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM: Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: Population based study. *BMJ* 1998;316:1343-1347.
25. Graves JA: Genomic imprinting, development and disease- is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:23-29.
26. Dekker G, De Vries JIP, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BME, Jacobs C: Underlying disorders associated with severe early-onset pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1042-1048.
27. Girling J, de Swiet M: Inherited thrombophilia and pregnancy, *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10:135-144.

28. Hayward C, Livingstone J, Holloway S, Liston WA, Brock DJH: An exclusion map for pre-eclampsia: Assuming autosomal recessive inheritance. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 749-757.
29. Harrison Ga, Humphrey KE, Jones N, Badenhop R, Guo G, Elakis G, Kaye JA, Turner RJ, Grehan M, Wilton AN, Brennecke SP, Cooper DW: A genome-wide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for candidate region on 4q *Am J Hum Genet* 1997; 60:1158-1167.
30. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Driven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-67.
31. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K: The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:902-905.
32. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Jang H, Varner MW, Ward K: The incidence of the factor V Leiden mutation in an obstetric population and its relationship to deep vein thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:883-886.
33. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Capucci G, Paladini D, Martinelli P, Montanaro S, Pavone G, Di Minno G: Factor V Leiden, C>T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997; 77:10052-1054.
34. Kupfermine MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB: Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340:9-13.

35. Van Pampus MG, Dekker GA; Wolf H, Huijgens PC, Koopman MMW, von Blomberg BME, Buller HR: High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 1146-1150.
36. O'Shaughnessy KM, Fu B, Ferraro F, Lewis I, Downing S, Morris NH: Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in an east anglian preeclampsia cohort. *Hypertension* 1999; 33:1338-1341.
37. Nagy B, Tóth T, Rigó J, Karádi I, Romics L, Papp Z: Detection of factor V Leiden mutation in severe pre-eclampsia Hungarian women. *Clin Genet* 1998; 53:478-481.
38. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP: A candidate risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*: 1995; 10:111-113.
39. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, Di Minno G: Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism; Roles of factor V Leiden prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1324-1328.
40. Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR: Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1997;90:168-171.
41. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet* 1997;34:525-526.
42. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC; Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM: Molecular basis of human hypertension role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71:169-180.

43. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S: A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet* 1993;4:59-61.
44. Morgan T, Craven C, Nelson L, Lalouel JM, Ward K: Angiotensinogen T235 expression is elevated in decidual spiral arteries. *J Clin Invest* 1997; 100:1406-1405.
45. Arngrimsson R, Purandare S, Connor M, Walker JJ, Bjornsson S, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Geirsson RT, Bjornsson H. Angiotensinogen: a candidate gene involved in preeclampsia? *Nat Genet* 1993; 4:114-115.
46. Morgan T, Craven C, Lalouel JM, Ward K: Angiotensinogen Thr235 variant is associated with abnormal physiologic change of the uterine spiral arteries in first-trimester decidua: *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:95-102
47. Hixson JE, Powers PK: Detection and characterization of new mutations in the human angiotensinogen gene (AGT). *Hum Genet* 1995; 96:110-112

Anexo I: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D. F. ____ de _____ de 200__.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: **"Alteraciones Genéticas en la Preeclampsia-Eclampsia"**, registrado en el Comité Local de Investigación Médica del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del CMN "La Raza" con el número 029/99 y en la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con el número 99-692-0030.

El objetivo de este proyecto es estudiar la presencia de mutaciones o cambios genéticos específicos, en mujeres mexicanas que desarrollaron preeclampsia-eclampsia durante su embarazo y comparar estos resultados con los que se obtengan de mujeres que tuvieron un embarazo normal.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en que se me tomará una muestra de sangre durante mi estancia en este Hospital y se analizará mi expediente médico.

Se me ha informado también que no existen riesgos derivados de mi participación en este estudio y que la única molestia o inconveniente será la asociada con la toma de la muestra de sangre. También se me informó que yo no recibiré directamente algún beneficio, pero que mi participación ayudará a conocer mejor las causas de la preeclampsia-eclampsia y podrá beneficiar en el futuro a otras mujeres que presenten esta enfermedad.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de este estudio. Asimismo, me ha asegurado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme posteriormente, si yo lo solicito, la información que obtenga de mi persona en relación con este estudio.

Entiendo que en caso que quisiera retirarme del estudio, puedo hacerlo en el momento que considere conveniente, sin que ésto altere la atención médica y los servicios a los que tengo derecho.

Nombre y firma de la paciente

Nombre, matrícula y firma del investigador principal

TESTIGOS

Nombre y firma

Nombre y firma