



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**ESTUDIO INMUNOGENETICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL
DESARROLLO DE PREECLAMPSIA**

**Tesis para obtener el Titulo de
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

P R E S E N T A

Ana Bernarda Delgado Campos

Asesor: Dr. Julio Granados Arriola



México, D.F.

Agosto de 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Ascención (mi ma)
A Francisco (mi Pa)†
A Zita
A Angeles

Agradecimientos:

A Angeles, por ti esta tesis se ha hecho realidad. Tu apoyo, cariño y amor... siempre me han impulsado a ser mejor y a no ser mediocre.

A mis padres por que siempre han estado conmigo, gracias por darme la vida, por su apoyo y su amor. Los quiero mucho...

A Zita por ser la mejor hermana del mundo. Gracias por tu cariño, amor y por hacerme una orgullosa tía. Te quiero mucho

Al Doctor Julio Granados por darme la oportunidad de trabajar con él...

A Daniel por tu paciencia y cariño con el análisis a estadístico de este trabajo. Flaquito te quiero mucho, mucho.

A la Doctora Lastra por impulsarme siempre a ser mejor como estudiante y persona.

A Luz, Martha Elena y Sonia que aun cuando en la lejanía siguen siendo mis mejores amigas. Gracias por su apoyo las quiero mucho.

A Luís Carlos, Juan Daniel, Rodolfo, Luís Gilberto, Manuel†, Will, Alf, Luís Felipe, Rafael, Ernesto, Juan Carlos, Ana, Caro... por ser los mejores amigos berengarios que se pueden tener iiiLos quiero!!!

A Florencia y Olimpia por su amistad y apoyo.

A la Dra. Maldonado, Mica, Mabel, Hilda, Martha, Tere, Martín y Magda por enseñarme el otro lado del laboratorio central del InPer. Gracias por su amistad y apoyo

A todos aquellos que han tenido que ver con el apoyo a esta tesis.

INDICE

	Pag
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
➤ Clasificación de la Enfermedad Hipertensiva	6
➤ Fisiopatología de la Hipertensión del Embarazo	7
➤ Inmunogenética de la Preeclampsia	10
➤ El Complejo Principal de Histocompatibilidad	14
Los Genes clase I	16
Los Genes clase II	17
Los Genes clase III	19
➤ HLA y Enfermedad	20
➤ HLA y Preeclampsia	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO	23
MATERIAL Y MÉTODO	24
➤ Extracción de ADN Mediante la Técnica de Expulsión Salina (Salting out)	25
➤ Tipificación de Genes Clase II del MHC por PCR SSOP	26
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

Cada año mueren aproximadamente 600 mil mujeres durante el embarazo o el parto en el mundo. De las cuales 25 mil pertenecen a América Latina y 1,310 a México. La muerte materna se puede clasificar en tres categorías principalmente, **1.** Muerte obstétrica directa, **2.** Muerte obstétrica indirecta y **3.** Muerte no obstétrica o no asociada.

En México, la enfermedad hipertensiva (Preeclampsia-eclampsia) es la complicación más frecuente del embarazo con una incidencia de 7 fallecimientos por cada 10,000 nacimientos. Esta enfermedad se presenta predominantemente en mujeres jóvenes primigestas, con embarazo múltiple, nefropatía, historia familiar de preeclampsia, hipertensión crónica, enfermedad auto inmune (Lupus) o enfermedad metabólica (diabetes) Las complicaciones de la hipertensión aguda se presentan después de la semana 24 de gestación y pueden incluir proteinuria, edema pulmonar o derrame pleural, ascitis severa, disfunción hepática, trombocitopenia, edema y/o hemorragia cerebral, convulsiones y coma. Además puede retardar el desarrollo intrauterino y provocar muerte neonatal Afecta del 2 al 7% de todos los embarazos, con diferentes niveles de severidad causando mortalidad y morbilidad materna y fetal. Además, constituye hasta 40% de los partos prematuros iatrogénicos.

La teoría de que los mecanismos inmunológicos alterados sean la causa de la hipertensión inducida por el embarazo está soportada por diversas investigaciones. Hay una relación entre HLA-DR materno fetal e hipertensión inducida por el embarazo. Existe una relación entre la hipertensión inducida por el embarazo y los diversos aspectos inmunológicos. De acuerdo con lo anterior, en algunas pacientes pueden existir situaciones multifactoriales, multisistémicas y de herencia, que favorecen la preeclampsia-eclampsia, que de alguna manera pueden causar la enfermedad.

El objetivo del presente estudio es evaluar la susceptibilidad de las mujeres mexicanas al desarrollo de preeclampsia. Esta evaluación está basada en el análisis del HLA de 44 mujeres con preeclampsia y 99 controles sanos.

Los resultados confirman el papel de los genes clase II (HLA) del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la fisiopatología de la enfermedad hipertensiva (Preeclampsia-eclampsia) Por lo tanto, es importante realizar estudios de HLA en mujeres y sus parejas antes o durante el embarazo para conocer la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hipertensiva (preeclampsia-eclampsia) durante el embarazo tiene un aspecto clínico muy amplio. Va desde formas leves y asintomáticas hasta manifestaciones muy severas que pueden causar la muerte del feto y la madre. La preeclampsia-eclampsia es un trastorno endotelial que resulta de una perfusión deficiente de la placenta que libera factores que lesionan el endotelio al activarse la cascada de coagulación o aumentar la sensibilidad del endotelio a agentes supresores. Actualmente, los factores etiológicos más estudiados son el inmunológico y el genético. Así mismo, se considera a la hipoxia trofoblástica crónica como el factor fundamental de la preeclampsia, ya que condiciona alteraciones en la síntesis vascular de prostanglandinas, a favor de efectos de agregación plaquetaria así como de vasoconstricción^{1, 2, 3, 4}. El análisis de las condiciones maternas que favorecen la hipoxia trofoblástica ha propuesto que la bipedestación es un elemento de alteración hemodinámica que siempre está presente en la mujer embarazada y que favorece dicha hipoxia crónica del trofoblasto. El embarazo puede inducir hipertensión arterial en mujeres normotensas o agravar la hipertensión ya existente^{2, 4, 5, 6}.

Varios autores, coinciden en que cualquier causa de la hipertensión inducida o agravada por embarazo es más probable que se desarrolle en la mujer que: **1)** está expuesta a vellosidades coriónicas por primera vez; **2)** está expuesta a una superabundancia de vellosidades coriónicas como en el caso de la mola hidatidiforme y de los embarazos múltiples; **3)** tiene enfermedad vascular preexistente o **4)** está genéticamente predispuesta al desarrollo de dicha hipertensión. Aunque las vellosidades coriónicas son esenciales, no es necesario que exista un feto (Mola hidatidiforme) ni que dichas vellosidades se encuentren localizadas dentro de la cavidad uterina (embarazo abdominal) La teoría de que los mecanismos inmunológicos alterados son la causa de la hipertensión inducida por el embarazo se apoya en diversas investigaciones como la que establece que existe relación entre el antígeno leucocitario humano (HLA-DR) materno fetal y la hipertensión inducida por el embarazo^{7, 8, 9, 11}. Hay una relación entre la hipertensión inducida por el embarazo y los distintos aspectos inmunológicos^{9, 10} como el sexual que aporta el padre^{11 12}.

Aproximadamente 600 mil mujeres mueren cada año durante el embarazo o el parto en el mundo. De las cuales 25 mil mueren en América Latina y 1,310 en México^{13, 14}. La muerte materna se puede clasificar en tres categorías principalmente:

1. La muerte obstétrica directa: que ocurre de complicaciones del embarazo, parto o puerperio, de intervenciones, omisiones, tratamiento incorrecto o de un acontecimiento relacionado de las circunstancias antes mencionadas.

2. La muerte obstétrica indirecta: es la que resulta de una enfermedad ya existente o de una que evoluciona durante el embarazo, agravada por los efectos fisiológicos del mismo.

3. La muerte no obstétrica o no asociada: es la que se da por causas accidentales o incidentes no relacionados con el embarazo o su manejo¹³.

En México, la enfermedad hipertensiva es la complicación más frecuente del embarazo con una incidencia de 7 fallecimientos por cada 10,000 nacimientos. Además, es la primera causa de ingreso de pacientes embarazadas a las unidades de terapia intensiva (por hemorragia masiva, para soporte hemodinámico)¹⁴ y constituye una de las principales complicaciones que ocasionan la muerte materna. Esta enfermedad se presenta predominantemente en mujeres jóvenes primigestas, con embarazo múltiple, nefropatía, historia familiar de preeclampsia, hipertensión crónica, enfermedad autoinmune (Lupus) o enfermedad metabólica (diabetes)^{14, 19, 20}. Las complicaciones de la hipertensión aguda se presentan después de la semana 24 de gestación y pueden incluir proteinuria, edema pulmonar o derrame pleural, ascitis severa, disfunción hepática, trombocitopenia, edema y/o hemorragia cerebral, convulsiones y coma¹⁶. Además puede retardar el desarrollo intrauterino y provocar la muerte neonatal.

CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD HIPERTENSIVA.

La enfermedad hipertensiva afecta del 6 al 8% de todos los embarazos, con diferentes niveles de gravedad causando mortalidad y morbilidad materna y fetal. Además, constituye el 40% de los partos prematuros iatrogénicos ^{13, 16, 21}. La clasificación de la preeclampsia-eclampsia se establece ante la aparición de uno o más de los siguientes signos ^{13, 15,16, 17,18}:

Preeclampsia Leve

Presión Arterial Sistólica (PAS) mayor ó igual a 140mmHg ó una elevación de 30mmHg encima de lo habitual; Presión Arterial Diastólica (PAD) mayor ó igual a 90mmHg ó una elevación de 15mmHg encima de lo habitual; Presión Arterial Media (PAM) mayor ó igual a 106mmHg; Proteinuria menor a 3g en orina de 24h y/o Edema.

Preeclampsia Severa

Presión Arterial Sistólica mayor ó igual a 160mmHg; Presión Arterial Diastólica mayor ó igual a 110mmHg en dos ocasiones, con seis horas de diferencia (con la mujer en reposo); Presión Arterial Media mayor a 126mmHg; Proteinuria mayor a 3g en orina de 24h; Alteraciones visuales, cefalea, dolor epigástrico, hiperreflexia, trastornos vasculares o cerebrales; cianosis y/o edema pulmonar.

Inminencia de Eclampsia

PAS mayor a 185mmHg; Presión Arterial Diastólica mayor a 155mmHg; Proteinuria mayor a 10g en orina de 24h; Perdida total o parcial de la visión; Dolor epigástrico y/o Hiperreflexia generalizada.

Síndrome de HELLP

Además de la enfermedad hipertensiva hay hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y disminución de la cuenta plaquetaria.

Eclampsia

Convulsiones; Coma; Hipertensión Arterial; Edema persistente y Proteinuria.

Los datos de laboratorio presentan alteraciones renales, hepáticas, hematológicas y fetoplacentarias. La función renal presenta un aumento en los niveles de creatinina, nitrógeno ureico (BUM), ácido úrico y proteínas en orina. Los niveles de las enzimas hepáticas transaminasa glutámico oxalácetica (TGO), transaminasa glutámico piruvica (TGP) y lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentran elevados. La hemoglobina y el hematocrito se encuentran aumentados debido a la disminución del volumen plasmático. Así mismo hay presencia de trombocitopenia, aumento de fibronectina y tiempo de protrombina (TP) alargado. La función fetoplacentaria frecuentemente registra dimensiones fetales menores a las esperadas que sugieren retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU)^{15, 16, 17}.

FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN DEL EMBARAZO

En un embarazo normal la primera migración trofoblástica (semana 10 a 16) tiene el objetivo de proveer una mayor irrigación sanguínea. Las paredes musculares y el endotelio de las paredes de la decidua de las arterias espiraladas se remplazan por eritroblasto. En la segunda migración (semana 16 a 22) el trofoblasto invade la capa muscular de las arterias espiraladas, mientras que en las mujeres con preeclampsia la migración trofoblastica no se lleva a cabo, lo cual produce una placentación anormal. Este sería el efecto inicial de la preeclampsia^{21, 22}.

De manera normal, la placenta produce dos eicosanoides en cantidades equivalentes en efecto biológico y antagónicos en acciones, la prostaciclina y el tromboxano. La prostaciclina produce estimulación de la vasodilatación, antiagregación plaquetaria y relajación uterina, en cambio, el tromboxano condiciona vasoconstricción, agregación plaquetaria y aumento de tono y contractilidad uterina. Se ha demostrado que en las pacientes con enfermedad hipertensiva del embarazo, hay un desequilibrio en la producción de prostaciclina y tromboxano A2, a favor de este último. Si la disminución de prostaciclina es considerable, comparativamente con su producción en la placenta normal, así como un aumento de síntesis de tromboxano A2. El desequilibrio entre prostaciclina y tromboxano provoca el incremento de la coagulación intravascular diseminada (CID) y depósitos de fibrina. Esta situación produciría trombos plaquetarios en la placenta, que causarían el retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) y el

desprendimiento prematuro de la placenta. El organismo trata de controlar este proceso mediante mecanismos antioxidantes entre los cuales están las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y los sistemas no enzimáticos de la vitamina C, el tocoferol y la ceruloplasmina^{21, 22, 23, 24, 31}.

Lo anterior produce estrés oxidativo cuando el proceso de oxidación sobrepasa la acción de los antioxidantes (peroxidación lipídica) Generalmente los componentes celulares involucrados son los ácidos grasos poliinsaturados y los grupos tiol de las proteínas. Un exceso de peroxidación lipídica de las proteínas puede alterar y deteriorar la composición química y ultraestructural de las membranas celulares. En consecuencia disminuye la fluidez, cambia la permeabilidad y se inactivan los receptores y las enzimas unidas a las membranas. Así mismo, se puede dañar la estructura de las enzimas a través de la oxidación de grupos sulfhídricos (-SH) de sus centros activos, por modificación de los aminoácidos o por la formación de bases de Schiff^{5, 25, 26, 27}.

Durante el embarazo normal hay un incremento moderado de lípidos circulantes, antioxidantes y peroxidación lipídica. En la preeclampsia la activación de neutrófilos, granulocitos y monocitos; y el incremento de citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina 6 (IL-6) así como la fosfolipasa A2 contribuyen al incremento de la peroxidación, que a su vez aumentan la secreción de elastasas, proteasas y radicales libres, que pueden causar daño tisular, al favorecer la lisis de las células endoteliales, la disrupción del endotelio y el incremento de la permeabilidad vascular^{5, 6, 25, 26, 27, 28}.

En consecuencia el sistema sanguíneo presenta coagulación por consumo. En los riñones los productos de la coagulación (plaquetas y fibrinógeno) son depositados en los capilares glomerulares incrementando el citoplasma endotelial y la disminución de la luz del capilar. Esto aumenta la presión hidrostática del capilar por la imposibilidad de filtración, lo cual rompe la barrera de filtración y permite la pérdida de proteínas (albúmina, globulinas, hemoglobina y transferrina), causando edema e insuficiencia renal aguda (IRA) El edema se generaliza al sumarse al producido directamente por el aumento de sodio intracelular. En el sistema nervioso central (SNC), el edema generalizado, el vasoespasmo y los trombos plaquearios

con microinfartos provocan las convulsiones. En el hígado se produce necrosis por el incremento de las enzimas hepáticas y el edema^{28, 29, 30, 31}.

La prostaciclina disminuye con el incremento del tromboxano provocando vasoconstricción arterial y venosa que aumenta la resistencia al flujo y condiciona la hipertensión arterial. Esta última disminuye la secreción de renina que a su vez, restringe la producción de aldosterona. La aldosterona y la vasoconstricción provocan hipovolemia (Figura 1) El espasmo vascular se observa en los vasos sanguíneos pequeños, los lechos ungueales, el fondo del ojo, las conjuntivas bulbares en los cambios histológicos de los órganos afectados por la hipertensión del embarazo que son comunes en los hallazgos de autopsia en casos de muerte por preeclampsia y eclampsia^{2, 22, 23, 24, 32}.

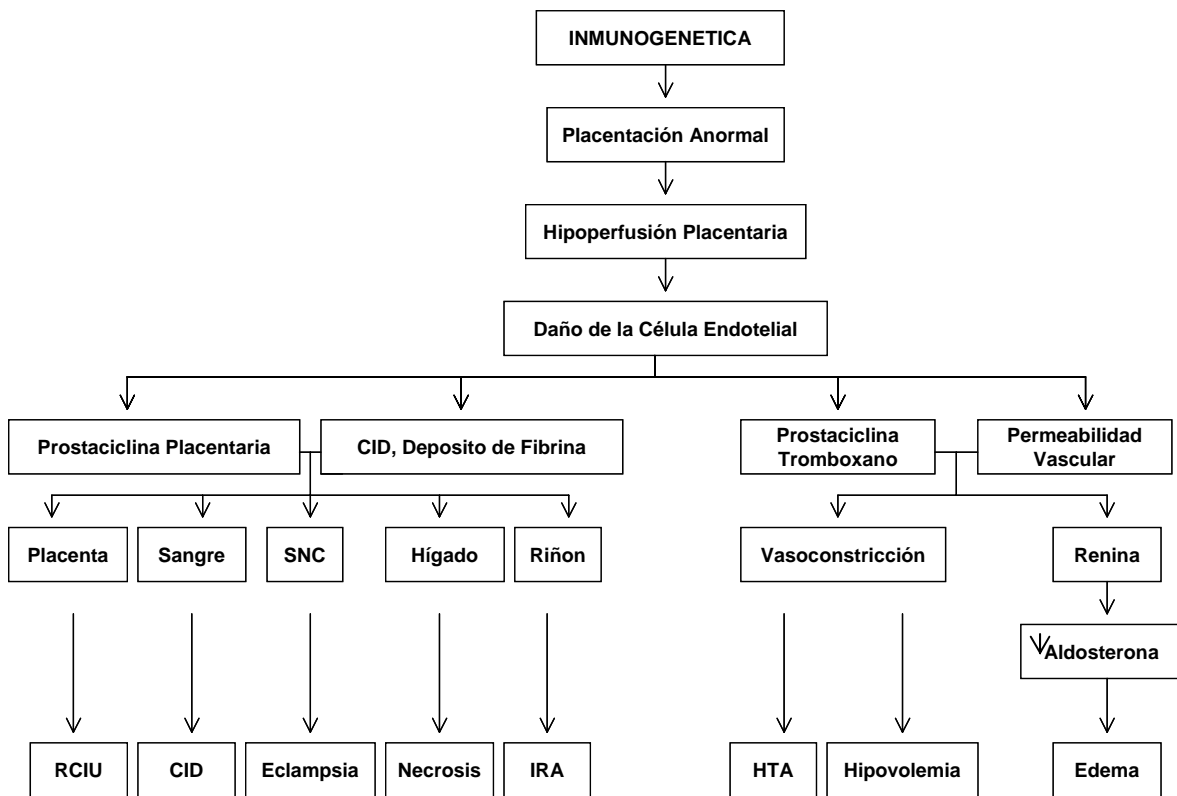


Figura 1. Representación esquemática de la fisiopatología de la Preeclampsia.

RCIU: Retardo en el Crecimiento Intrauterino, CID: Coagulación Intravascular Diseminada, IRA: Insuficiencia Renal Crónica, HTA: Hipertensión Arterial.

INMUNOGENÉTICA DE LA PREECLAMPSIA

La teoría de la preeclampsia no depende de un solo gen recesivo y no excluye la posibilidad de la herencia multifactorial^{35, 36}. Las mujeres portadoras de la variante del gen de angiotensinógeno T235 tienen mayor incidencia de hipertensión inducida por el embarazo. También se encontró asociación entre la variante T235 y la preeclampsia^{33, 34}. Se ha reportado mayor incidencia de mutaciones en el factor V de Leiden, en mujeres con preeclampsia. Así mismo el factor incrementa el riesgo de complicaciones obstétricas^{37, 38, 39, 40}. De acuerdo con lo anterior, en algunas pacientes pueden existir situaciones multifactoriales, multisistémicas y de herencia, que favorecen la preeclampsia-eclampsia, que de alguna manera pueden causar la enfermedad^{41, 42, 43, 44}.

El aloreconocimiento de los antígenos paternos expresados por el embrión, por parte de la madre, genera una respuesta inmunológica que participa en el proceso de la implantación. Esta respuesta se ha definido como la coexistencia de inmunoestimulación e inmunosupresión mediada por citocinas, que conduce al crecimiento y desarrollo fetal. Esta visión del fenómeno es lo que se ha denominado, hipótesis inmunotrópica^{11, 12}. Basándose en esta hipótesis se ha demostrado como las linfocinas derivadas de las células T murinas son capaces de estimular *in vitro*, el crecimiento y la activación de las células placentarias de ratón. A partir del sobrenadante de un cultivo de linfoma murino de células T, se purificaron fracciones de interleucina 3 (IL-3), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina 2 (IL-2) y se probó su efecto sobre la proliferación del trofoblasto. Las fracciones de IL-3 aumentaron la proliferación del trofoblasto hasta cuatro veces y las de GM-CSF la aumentaron hasta once veces; al utilizar IL-3 recombinante murina en los ensayos, el índice proliferativo se elevó once veces de manera dosis dependiente en comparación con otros factores estimulantes de colonia (CSF) recombinantes^{45, 46}. A partir de estos hallazgos, la teoría inmunotrópica ha basado su evidencia, principalmente, en la acción de los CSF como el CSF-1, la IL-3 y el GM-CSF sobre la proliferación trofoblástica. Estos CSF pertenecen a la familia de las hematopoyetinas, de las cuales se han identificado la hormona de crecimiento, la eritropoyetina, la IL-3, la IL-5, el GM-CSF y el csf-1^{45, 46, 47, 48}.

Los factores estimulantes de colonias son elementos decisivos en el microambiente de la implantación y su acción está muy relacionada con la de las hormonas. El GM-CSF es producido por las células deciduales murinas en respuesta al trofoblasto invasivo de conceptus, y también por las líneas celulares de coriocarcinoma humano BeWo, JEG y JAR, y es capaz de promover la implantación embrionaria en cultivos de epitelio uterino. El CSF-1 se ha observado incrementado hasta 1000 veces en el microambiente uterino, en la gestación a término del ratón. Al administrar, a estos ratones, la gonadotropina coriónica humana (GCH), hormona importante en el mantenimiento del cuerpo lúteo y por ende de la gestación, los niveles del CSF-1 aumentan hasta cinco y seis veces mientras que la ooforectomía (escisión del ovario) inhibe completamente el aumento, esto permite pensar que este factor es regulado por las hormonas esteroides ováricas. Las dosis fisiológicas de progesterona y estrógenos sinergizan el efecto del GM-CSF sobre la proliferación del trofoblasto obtenido a partir de placenta humana a término^{47, 48}. En otro trabajo, se observó que la administración de IL-3 al cruce murino CBA/2 x DBA/J (la mayoría de los conceptus son reabsorbidos), disminuyó el porcentaje de reabsorción de 55 a 22%, también se observó tanto el peso fetal como el placentario, y en particular la expansión de la zona del espongiotrofoblasto^{46, 49}.

Por otro lado, existen nuevas evidencias sobre la caracterización de la función de la IL-3 en la interfase materno fetal. La línea TTK-1 (NK/ linfocitos granulares grandes de decidua del primer trimestre), estimulan el crecimiento trofoblástico gracias a la secreción de la IL-3 y a la expresión de laminina en su superficie. Se comparó la administración de GM-CSF y de IL-3 recombinantes en el modelo de reabsorción embrionaria CBA/J x DBA/2 y encontraron que la IL-3 disminuyó las reabsorciones fetales y aumentó el peso placentario y fetal siendo este aumento mayor que con el GM-CSF. Se ha sugerido que estos resultados se podrían explicar a través de un nuevo tipo de receptor de CSF en las células placentarias y deciduales, pero en el caso de la IL-3 aún no se ha reportado un receptor específico en estos tipos celulares⁵⁰. Por lo anterior, se ha postulado otro posible mecanismo en el que la IL-3 provocaría la liberación local de CSF-1 por el trofoblasto o la producción de la IL-3 por los macrófagos u otras células que participan directa o indirectamente en el efecto inmunotrópico. El papel de las citocinas en el reconocimiento del embrión abre una gama de posibilidades de estudio en el campo de la

inmunología de la gestación^{50, 51, 52, 53}. Actualmente, se sabe que el citotroblasto humano tiene una expresión especial de moléculas de histocompatibilidad (HLA)⁵¹. Expresa el HLA-G, que es una glicoproteína oligomórfica, y además una pequeña cantidad de HLA-C en el primer trimestre, pero no expresa las otras moléculas HLA-I clásicas ni las clase II. La función del HLA-G es importante en la tolerancia materna, se ha postulado que éste es el que inhibe la actividad lítica de las células NK (células asesinas naturales) endometriales a través del receptor CD94/NKG2⁵⁴.

El HLA-G podría tener un papel en la modulación de la secreción de citocinas por linfocitos y macrófagos. Se observó el patrón de citocinas de células mononucleares de sangre periférica en un cocultivo con células transfectadas con el gen del HLA-G. Los cocultivos con estas células transfectadas presentaron niveles de IL-3 e IL-1 β aumentados comparados con los cocultivos con células no transfectadas. Los estudios muestran como los linfocitos y los macrófagos maternos modifican la producción de citocinas, y en este caso particular, el aumento de IL-3 cuando entran en contacto directo con el HLA-G que, expresado sobre el trofoblasto humano, favorecería el mantenimiento de la gestación^{55, 56, 57}.

El trofoblasto está compuesto por varias subpoblaciones celulares: el citotrofoblasto de anclaje, el sincitiotrofoblasto, el trofoblasto endovascular y el trofoblasto extraveloso, los cuales se diferencian principalmente por su ubicación, la secreción de hormonas y la expresión de moléculas HLA clase I. García-Lloret y col, observaron como el CSF-1 y el GM-CSF inducen la diferenciación de cito a sincitiotrofoblasto y el aumento de la secreción de lactógeno placentario humano (HPL) y de HCG. Estas hormonas, secretadas por el sincitiotrofoblasto veloso, son importantes en el embarazo porque mantienen la producción de progesterona por el cuerpo lúteo en la gestación temprana. Otras citocinas como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y el factor transformante de crecimiento b(TGF- β), también regulan negativamente la síntesis de la β HCG y promueven la secreción de la trofouteronectina (molécula de la matriz extracelular del tipo de las fibronectinas), para estimular la diferenciación hacia el fenotipo de trofoblasto de anclaje. Esto permite el desarrollo del trofoblasto invasor, la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular y los inhibidores de proteasas que modulan la invasión en la decidua^{31, 56, 57, 58}.

El entendimiento del proceso antes mencionado traería importantes avances en la terapéutica de las enfermedades asociadas a un defecto de la invasión y del desarrollo del trofoblasto como el retardo del crecimiento intrauterino y la eclampsia. El ácido acetilsalicílico, utilizado para la prevención de la preeclampsia y del aborto habitual, que se ha venido utilizando por sus propiedades antiagregantes de plaquetas, induce además la producción de IL-3. La búsqueda de otras acciones de este medicamento sobre el sistema inmunológico y sobre el desarrollo placentario se convierte en algo novedoso en el campo obstétrico^{56, 57, 58}.

Se ha postulado que la actividad de las células inmunes de la decidua puede liberar mediadores que actúan sobre las células endoteliales como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la IL-13 y la asociación de la preeclampsia con moléculas HLA específicas: HLA-G (se expresa sólo en trofoblasto) HLA-DR4 y HLA-A23/29, B44 y DR7^{31, 51, 59}.

En resumen, existen descripciones de múltiples alteraciones genéticas que se han tratado de ligar a la presencia de preeclampsia, están involucradas al menos hasta 26 genes diferentes, pero la gran mayoría de los datos obtenidos hasta el momento no son concluyentes. Están involucrados tanto genes maternos como fetales (paternos) Los genes que participan en la preeclampsia pueden ser agrupados de acuerdo al papel que juegan en la etiología de la preeclampsia de acuerdo a las hipótesis mencionadas; se pueden clasificar en aquellos que regulan la placentación, reguladores de la presión arterial, genes involucrados en la isquemia placentaria y genes que intervienen en el daño y remodelación del endotelio vascular. Las más importantes alteraciones y mejor definidas son las mutaciones en el factor V de Leiden, en la metilentetrahidrofolato reductasa, genes de la angiotensina (alelo T235) y mutaciones relacionadas con el $TNF\alpha$.

El modelo de herencia que explica mejor la frecuencia de la preeclampsia en las poblaciones de bajo riesgo (3-6%) es la presencia de homocigotidad entre la madre y el feto para un mismo gen recesivo. También es muy probable la teoría de impronta genómica como la explicación sobre el modo de herencia de la preeclampsia. Además, se ha demostrado que mutaciones específicas en el factor V de Leiden y de

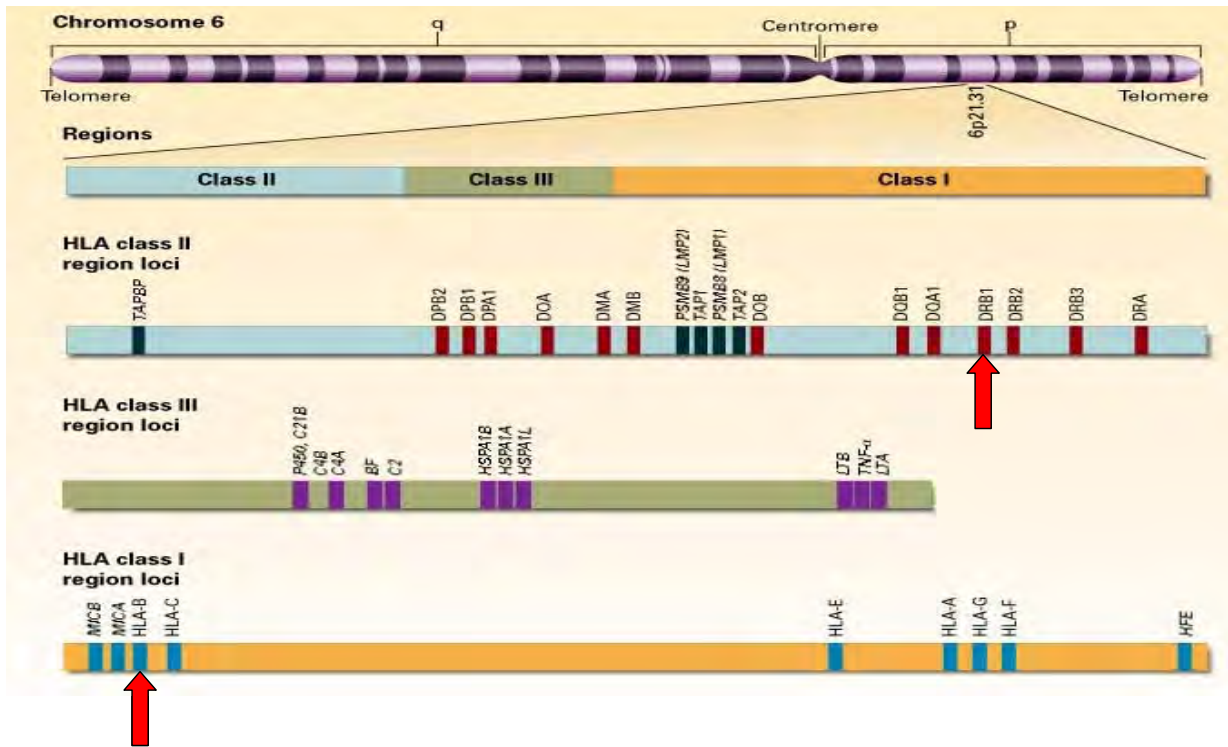
la cadena larga de la enzima 3-hidroxiacil-coenzima A (LCHAD) se asocian con riesgo elevado de síndrome de HELLP.

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH), es un conjunto de genes codificados en el brazo corto del cromosoma seis humano, 6p21.3 (Fig.2) y organizados en varias subregiones o locus (posición del cromosoma donde se halla un gen determinado) El complejo tiene 3.4 Mb y se han identificado más de 140 genes funcionales, de los cuales muchos tienen función inmune. Las tres regiones de mayor relevancia del CMH son: la clase I y II que contienen al HLA (antígenos leucocitarios humanos) y la clase III que incluye las proteínas del complemento. Asimismo, el CMH incluye los genes de la glioxilasa I, próximos al centrómero; el factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF α y β) localizados entre el locus HLA-B y la región clase III; el gen de la proteína RD, de estructura periódica y poco común, que se encuentra entre el gen del factor B y el C4A y dos loci (plural de locus) de la proteína de choque térmico (Hsp 70 1 y 2), situados entre los genes clase III y el TNF- α ^{61, 62, 63, 65}.

Se han encontrado seis genes asociados al locus HLA-B llamados “transcritos asociados a B”, BAT-1, -2, -3, -4, -5 y B-144(análogo del B-144 de ratón) y varios genes que participan en el procesamiento y transporte de péptidos, LAMP 7 Y TAP 2 en la región clase II ^{21, 61, 62}.

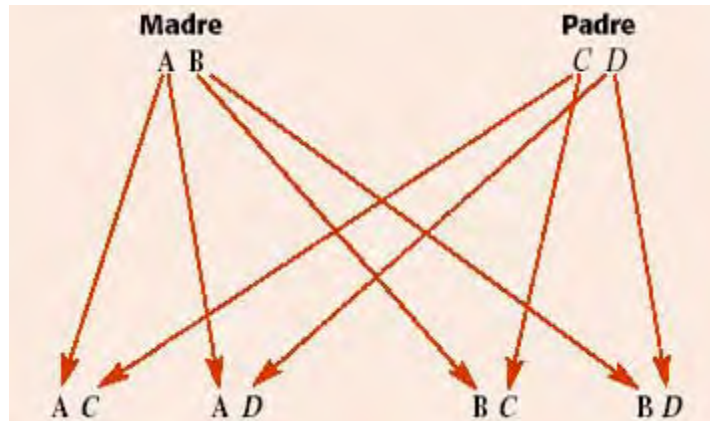
Los genes del CMH se heredan como caracteres autosómicos codominantes. Los alelos (variantes de un gen) de los loci del CMH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo. La combinación de los alelos de los loci fB, C2, C4A y C4B forman un complotipo o haplotipo de genes del complemento. Un individuo expresa dos antígenos de histocompatibilidad derivados de un cromosoma materno y de un cromosoma paterno, que se heredan en bloque (haplotipo) (Fig. 3) ^{21, 61, 62, 66}.



Tomado de the Massachusetts Medical. Society.

Figura 2. Organización de genes del CPH y localización del HLA en el cromosoma 6 humano.

El CMH tiene funciones fisiológicas fundamentales en la respuesta ante un transplante y en la acción a modo de código de señales que permite al sistema inmune reconocer con precisión sustancias extrañas de las propias, su papel en el rechazo de un injerto es una consecuencia de esta función. Un antígeno necesita de las moléculas HLA para poder actuar de forma correcta. Los linfocitos citotóxicos solo reconocen al antígeno asociado a las moléculas clase I propias, mientras que los linfocitos T cooperadores sólo lo reconocen asociados a las moléculas clase II propias^{62, 63}.



Tomado de The Lukemia & Lymphoma Society⁶⁶

Figura 3. Ejemplo del patrón hereditario de los principales HLA. A y B representan los dos cromosomas 6 de la madre, C y D muestran los dos cromosomas 6 del padre. Las características específicas del HLA que recibe el hijo(a), son determinadas por las diferentes combinaciones de los genes materno y paterno que hereda en su cromosoma 6 (haplotipo). Las posibles combinaciones permiten una mayor o menor compatibilidad entre los padres y los hijos. El análisis de los HLA puede ser empleado en casos de trasplante para conocer la compatibilidad de los donares con el receptor⁶⁶.

Los Genes clase I

Estas moléculas se encuentran hacia la región más telomérica del CMH. Los antígenos clase I, son mediadores de la eliminación alogénica y de la restricción de linfocitos T efectores^{61, 62, 64}. Tienen aproximadamente 19 genes relacionados entre sí; en los que se encuentran las moléculas de histocompatibilidad clase I clásicas, HLA-A, -B, -C y las no clásicas HLA-E, -F, -G. Las moléculas clase I clásicas son glucoproteínas que se expresan en la membrana de todas las células del cuerpo, excepto en las neuronas y es difícil detectarlas en eritrocitos. Las moléculas no clásicas se distribuyen específicamente: el HLA-G se expresa principalmente en subpoblaciones del trofoblasto embrionario, el HLA-E se expresa en eosinófilos e hígado fetal y HLA-F sólo se encuentra en hígado fetal.

Tienen una cadena polipéptica alfa y una beta unidas no covalentemente. La cadena pesada alfa, es una glicoproteína polimórfica transmembranal de 45kd que está codificada por el locus HLA-A, -B o -C.

La cadena ligera beta, es una glicoproteína monomórfica de 12kd (β -2-microglobulina) codificada por un gen del cromosoma 15 humano.

Inicialmente, la estructura de los antígenos clase I del MHC se obtuvo mediante la secuencia de aminoácidos de material purificado de una línea celular linfoblastoide⁶². Los antígenos tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica corta. Posteriormente, se determinó la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X. La cadena pesada alfa consta de tres dominios externos (α 1, α 2 y α 3) Los dominios α 1 y 2, contienen los residuos polimórficos y conforman el sitio de unión al antígeno, que de esta forma es presentado por la molécula HLA al receptor del linfocito T. Asimismo, en los dominios α 1 y 2 se encuentra la mayor diversidad de aminoácidos de los antígenos clase I, lo cual se demostró mediante transfección génica y reconocimiento con aloanticuerpos^{61, 62}. El dominio α 3 es muy conservado y su polimorfismo es mayor que el de las regiones variables de las inmunoglobulinas. Las posiciones polimórficas están en los residuos 1 al 94.

Las moléculas clase I no clásicas, HLA-E, -F y -G tienen un polimorfismo limitado a su cadena α aunque se desconoce su estructura. La cadena pesada de HLA-G pesa 39kd debido a una mutación en el dominio citoplasmático, y aún cuando se desconoce su función se ha propuesto que por su limitada expresión tiene funciones específicas.

Mediante serología se han detectado en humanos aproximadamente 23 alelos del locus HLA-A y 49 del HLA-B^{61, 62, 64}.

Los Genes Clase II

La región clase II se encuentra en la porción centrómerica, y contiene a los antígenos clase II, los cuales son determinantes primarios en la generación de la respuesta proliferativa de linfocitos T (cultivos mixtos de linfocitos)^{61, 62} y presentan antígenos al linfocito T. Estos antígenos se encontraron como impurezas en preparaciones de antígenos clase I. La región clase II, se divide en 4 subregiones, DP, DNA/DO, DQ y

DR. Cada subregión cuenta con un par de genes alfa y beta. En la región II se encuentran los determinantes HLA-DW, que se manifiestan por cultivo de linfocitos MLC. Entre estas dos regiones se localizan los genes que codifican las moléculas clase III: complemento C2, factor B (fB), C4A, C4B y los genes estructurales de la 21-hidroxilasa (21-OH)

Las moléculas clase II, están constituidas por dos cadenas glicoproteicas, unidas no covalentemente. La cadena pesada alfa es monomórfica de 33kd y la cadena ligera beta es polimórfica de 28kd⁶², ambas son codificadas por el loci HLA. También tienen cuatro dominios externos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ análogos a los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β -2-microglobulina de la molécula clase I. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ son polimórficos mientras que los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son muy conservados (inmunoglobulinas) La estructura tridimensional de las moléculas clase II es muy similar a la estructura de las moléculas clase I.

La molécula clase II tiene asociada a la cadena α y β una glicoproteína transmembranal de 31kd, la cadena gamma ó invariante. Esta cadena facilita el transporte del complejo por el retículo endoplásmico evitando uniones inespecíficas. Después se disocia por un proceso proteolítico⁶⁴.

De las cuatro subregiones de los genes clase II, la subregión DP tiene dos pares de loci α y β , de los cuales $DP\alpha 2$ y $DP\beta 2$ se cree son pseudogenes. La subregión DNA/DO esta constituida por los genes $DNA\alpha$ y $DO\beta$, que se encuentran separados por varios cientos de kilobases, quizá por esta razón no formen un dímero α/β ⁶⁴. La subregión DQ tiene dos genes alfa y dos genes beta. Incluye dos genes DX (α y β) y un gen $DV\beta$ entre los genes DQ y DX. La subregión DR posee cuatro genes beta: $DR\beta 1$ codifica las variantes de DR1 a DR18, $DR\beta 2$ es un pseudogen, $DR\beta 3$ codifica para el determinante DRw52 y $DR\beta 4$ codifica para DRw53 y un gen $DR\alpha$ monomórfico^{62, 64}.

No existen evidencias de que DNA y DQ se expresen como proteínas, aunque se ha encontrado RNA mensajero (RNAm) de ambos genes en células B. El polimorfismo de las moléculas clase II esta en las cadenas de los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR. Los residuos polimórficos están en cuatro porciones del

dominio B1 de DQ y DR, así como en una sola porción de A1 de DQ. La cadena DP tiene un polimorfismo limitado^{62, 63, 64, 65}.

El polimorfismo alélico de los antígenos de clase I y II se reconoce fenotípicamente por serología, procedimiento donde se estudian los glóbulos blancos para conocer los tipos de tejidos; y recientemente por técnicas moleculares, donde se caracteriza el ADN para identificar genes específicos responsables de la formación del HLA sobre la superficie celular. Las variantes HLA-Dw, se detectan por cultivo mixto de linfocitos. El polimorfismo genotípico se realiza mediante secuenciación de nucleótidos y análisis de fragmentos de restricción^{62, 63, 64, 65}.

La clase II se expresa solo en macrófagos, monocitos, linfocitos B, células endoteliales, células epiteliales del timo, células dendríticas, células de Langerhans y precursores inmaduros hemopoyéticos incluidos los de la serie mieloide. En linfocitos T activados se expresan por la acción de mitógenos o estímulos antígeno específicos.

Los Genes Clase III

Se encuentran ubicados en una porción de 120Kb, entre los genes clase I y clase II y se heredan como una unidad genética llamada complotipo (haplotipo del complemento) Cada complotipo codifica la síntesis de los factores del complemento C2, C4A, C4B de la vía clásica y el factor B de la vía alterna. Intercalados entre los genes C4A y C4B se encuentran dos genes que codifican para la expresión de la enzima 21 hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB), la cual hidroxila al carbono 21 en la biosíntesis del cortisol^{21, 61, 62, 64}.

En la región clase III, hacia el centrómero junto a la región clase II, se encuentran los genes TAP 1, TAP 2 y el gen de la colágena. Las proteínas de choque térmico (HSP 70 1 y 2) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa y beta se localizan cerca de los genes clase I. Así mismo, existen otros genes con funciones

inmunológicas que posiblemente participan en algunos pasos de la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes.

HLA Y ENFERMEDAD

Varios estudios genéticos demuestran la participación de los genes del CMH en un importante número de trastornos inmunes como diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante. Hay asociación entre algunas enfermedades y los alelos de los genes de la región clase II del MHC. Otros genes dentro (regiones clase I y III) o cerca del CMH también se han involucrado en la susceptibilidad a la enfermedad. Debido a su intervención en la respuesta inmunitaria, muchos de los HLA se han relacionado con la predisposición a determinadas enfermedades. Los individuos con diferentes HLA tienen riesgos variables de enfermedad, por lo que la diferencia debe ser tomada en cuenta en la distribución de fenotipos HLA entre pacientes y controles sanos. El objetivo de los estudios de asociación es comparar la frecuencia de antígenos específicos HLA en un grupo de pacientes con la que se presenta en un grupo control. Se considera que lo más importante es seleccionar cuidadosamente a éste último, la presencia de una asociación estadísticamente significativa puede tener varias interpretaciones biológicas^{21, 61, 62, 63, 64}.

La relación de una enfermedad determinada con un antígeno HLA particular se cuantifica mediante el cálculo del Riesgo Relativo (RR) como razón de momios (RM), éste puede definirse como la probabilidad que tiene un sujeto con un antígeno HLA en particular, de desarrollar alguna enfermedad, comparada con la de un individuo que carece de dicho antígeno. Lo cual se calcula con la siguiente fórmula: **$RM=ad/bc$**

La razón de momios establece la asociación de un factor de riesgo y la enfermedad. Los valores mayores a 1 sugieren susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad mientras que los valores menores a 1 sugieren protección contra el desarrollo de la enfermedad. La razón de momios se calculó como sigue:

ENFERMEDAD

		Presente	Ausente
Presente	Número de pacientes expuestos que desarrollan la enfermedad	a	b
	Número de pacientes no expuestos que desarrollan la enfermedad	c	d

FACTOR DE RIESGO

$$RM=ad/bc$$

Tomando en cuenta la tabla de 2 por 2 y el valor de la OR se calculó el intervalo de confianza mediante la siguiente formula:

$$IC\ 95\% = e^{[\ln(RM) \pm 1.96 \sqrt{1/a+1/b+1/c+1/d}]}$$

La correlación al valor de "p" se realizó utilizando la formula:

$$"p" = 1 - (1 - \alpha)^c$$

Donde *a= valor de p sin corregir y c= número de comparaciones.

Mientras más elevado (mayor a 1) el riesgo relativo, mayor es la frecuencia de que el antígeno este dentro de la población de enfermos. Muchos padecimientos se han relacionado con antígenos clase II y esta asociación refleja la función de dichas moléculas en la presentación antigénica a linfocitos T CD4 por los macrófagos^{21, 61}.

Varias enfermedades de origen autoinmune muestran asociación con el antígeno HLA-DR3. Hay varias hipótesis para explicar ésta relación. Cuatro de éstas se aplican por igual a antígenos HLA clase I y clase II. Una solo se aplica a moléculas clase II^{21, 61, 62, 63, 64}.

HLA Y PREECLAMPSIA

Se piensa que la aparición de la tolerancia inmunológica mutua aparece en el primer trimestre y es causa de cambios importantes morfológicos y bioquímicos en la circulación sistémica y uteroplacentaria materna. Debido a que las moléculas del HLA sirven como elementos de restricción para el reconocimiento de patógenos, se dedujo que este complejo podría estar relacionado con la predisposición al desarrollo de algunas enfermedades. Los conocimientos de la genética y la biología de las moléculas clase I, II y III han propiciado la investigación de la asociación de la enfermedad con alelos de estos genes, debido a la función que tienen en la regulación de la respuesta inmune^{21, 62, 64}.

La relación entre los marcadores del CMH y algunas enfermedades presenta varias complicaciones:

- 1) los alelos asociados a algunas enfermedades también se encuentran presentes en la población normal,
- 2) se ha observado que en muchos casos un solo alelo se asocia con más de una enfermedad y
- 3) en una misma enfermedad, está no se asocia al 100% a un sólo alelo.

Debido a esto, se ha determinado un mayor polimorfismo dentro de los alelos del HLA mediante biología molecular. Por lo que, se han descrito subtipos de alelos asociados a algunas enfermedades y se ha propuesto que no es un antígeno específico el que se asocia con un padecimiento, sino que es un epítotope que puede estar presente en varios alelos determinando la susceptibilidad a una enfermedad^{21, 62, 64}.

También es posible, que la susceptibilidad para una enfermedad esté causada por genes recesivos, como es el caso de la deficiencia de C2 y C4 o de la hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia del gen que codifica la enzima 21-hidroxilasa. Así mismo se ha demostrado que un gen del HMC confiere susceptibilidad al desarrollo de hemocromatosis idiopática. Esta enfermedad presenta dos haplotipos HLA comunes con el caso índice, lo que le confiere mayor expresión bioquímica de sobre carga de hierro y aparición de los síntomas clínicos característicos del padecimiento^{21, 62}. En la ataxia cerebelosa se han encontrado genes de susceptibilidad que se heredan de manera dominante unidos al MHC.

La mayoría de las enfermedades asociadas al CMH, muestran asociación pero no se ha demostrado unión. Es importante mencionar la asociación de la espondilitis anquilosante con el B27, ya que presenta uno de los riesgos relativos más elevados en todas las poblaciones estudiadas.

Las moléculas clase II, participan en procesos de activación en condiciones normales y en fenómenos autoinmunes. Además, están implicados en procesos de presentación antigénica y en la selección del repertorio de la célula T. Mediante estos dos eventos, el polimorfismo del HMC controla aspectos importantes como la competencia inmune, la selección del repertorio de las células T y la activación periférica. La influencia de las moléculas clase II en la respuesta inmune, permite asumir que muchas enfermedades que involucran alteraciones inmunológicas estén asociadas específicamente con ciertos alelos polimórficos de la región II del CMH^{21, 62, 64}.

HIPÓTESIS

La liberación de mediadores como el TNF en asociación con moléculas HLA específicas: HLA-G y particularmente con HLA-DR4 pueden causar susceptibilidad al desarrollo de preeclampsia. El conocimiento del papel de los genes del complejo principal de histocompatibilidad, permitirá comprender mejor la fisiopatología de la preeclampsia y en consecuencia contar con nuevos posibles métodos terapéuticos.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es evaluar la susceptibilidad de las mujeres mexicanas al desarrollo de preeclampsia. Esta evaluación está basada en el análisis de haplotipos de genes HLA de 44 mujeres con preeclampsia y de 99 controles sanos.

MATERIAL Y MÉTODO

Método: El estudio se realizó en 99 y 44 pacientes mexicanas que acudieron de agosto a noviembre de 2004, al servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México con embarazo normoevolutivo y con diagnóstico de preeclampsia, respectivamente. Las pacientes se incluyeron en el estudio tomando en cuenta los siguientes criterios y variables:

Criterios de inclusión:

- Mujeres con embarazo de 32 o más semanas de gestación
- Pacientes de cualquier edad, que aceptaron participar en el estudio.
- Diagnóstico de preeclampsia

Criterios de Exclusión:

- Mujeres con menos de 32 semanas de gestación
- Mujeres con alguna enfermedad crónica subyacente o alguna otra patología (Diabetes, hipertensión crónica)
- Pacientes con tratamiento antihipertensivo previo a su ingreso, que modifique la evolución de la preeclampsia.
- Pacientes con alguna enfermedad metabólica durante su estancia en hospital.
- Pacientes que una vez diagnosticadas, presenten hipertensión transitoria.

Variable Independiente: los alelos del CMH clase II y los alelos de los genes HLA-DR.

Variable Dependiente: pacientes sanas y pacientes con preeclampsia leve y severa

- Pacientes Sanas Mujeres que cursan con embarazo de 32 semanas de gestación, sin Diagnóstico de preeclampsia leve o severa y sin criterio de exclusión o eliminación.
- Preeclampsia leve: PAS > ó igual a 140mmHg PAD > ó igual a 90mmHg
- Preeclampsia Severa: PAS > ó igual a 160mmHg PAD > ó igual a 110mmHg
Proteinuria > 3g en orina de 24 horas, edema, cefalea, dolor epigástrico.

Una vez que las pacientes firmaron una carta de consentimiento informado y fueron informadas de la molestia de la punción venosa, se obtuvieron los aspectos clínicos y epidemiológicos y 5mL de sangre de las pacientes sanas y preeclámpticas elegidas. La muestra se colocó en tubos de ensayo con etilendiaminotetraacético (EDTA) al 2% para la determinación de los alelos HLA-DR clase II. Las muestras se procesaron y tipificaron de acuerdo con las siguientes técnicas:

EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXPULSIÓN SALINA (SALTING OUT)⁶⁷

Se adicionaron 8ml de buffer de lisis a 5mL de sangre con EDTA en un tubo de 25ml. Se mezcló por inversión durante un minuto (hasta ver hemólisis) y se centrifugó a 5200rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras con pocas células blancas se lavaron con cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%. Las muestras con suficientes células blancas se resuspendieron en 10ml de solución de lisis y se centrifugaron a 5200rpm por 10 minutos

Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 10ml de buffer de lisis, se mezcló y centrifugó nuevamente.

Se decantó el sobrenadante y los tubos se colocaron boca arriba durante un minuto para quitar el exceso de líquido. El botón se resuspendió en 2ml de buffer de digestión salina con 150µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 150µl de proteinasa K (10mg/ml)

Se incubó a rotación lenta a 62°C durante dos horas. Se agregaron 20ml de proteinasa K después de una hora de incubación. La técnica también permite incubar a 37° durante toda la noche sin adicionar proteinasa.

Se adicionaron 800µl de NaCl 6M, se agitó vigorosamente por 15 a 30 segundos y se centrifugó a 13,000rpm durante 10 minutos (precipitación de proteínas), se decantó el sobrenadante en otro tubo de

1.5ml y se volvió a centrifugar a 13,000rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5ml y se centrifugó a 13,000rpm por 5 minutos.

El sobrenadante se dividió en dos tubos de 1.5ml (450 μ l) Se agregaron 900 μ l de etanol al 99.5% y se dejó precipitar el ADN. El ADN se transfirió a un tubo de 1.5ml con etanol helado al 70%. Se centrifugó a 13,000rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el ADN al aire. El ADN se disolvió en 1000 μ l de solución rehidratante de Tris-EDTA (TE)

TIPIFICACIÓN DE GENES CLASE II DEL MHC POR PCR SSOP

Determinación genética de los alelos HLA-DR: La determinación se realizó mediante la técnica de Dot blot reverso, el ADN se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores genéricos marcados con biotina para la región HLA-DR. La reacción de PCR se realizó con 1 μ g de ADN, 1 pmol/ μ l de cada iniciador o primer, 20mM de cada deoxidonucleótido trifosfatado (dNTP), 2mM de cloruro de magnesio, amortiguador de reacción 1X y una unidad de la enzima Taq polimerasa en un volumen total de 50 μ l. La mezcla se sometió a 35 ciclos para la amplificación. Cada ciclo constó de tres temperaturas diferentes:

Temperatura inicial de desnaturalización 94°C durante un minuto, temperatura de alineamiento de 53°C por un minuto y la tercera de extensión a 72°C durante dos minutos. Cada muestra se corrió en un gel de agarosa al 2%, para comprobar la amplificación. Los amplificados se desnaturalizaron con una solución de hidróxido de sodio y se hibridizaron con sondas específicas de alelo ancladas a membranas de nylon. El proceso de revelado incluyó un conjugado de estreptoavidina peroxidasa y un sustrato colorido con tetrametilbencidina (TMB)

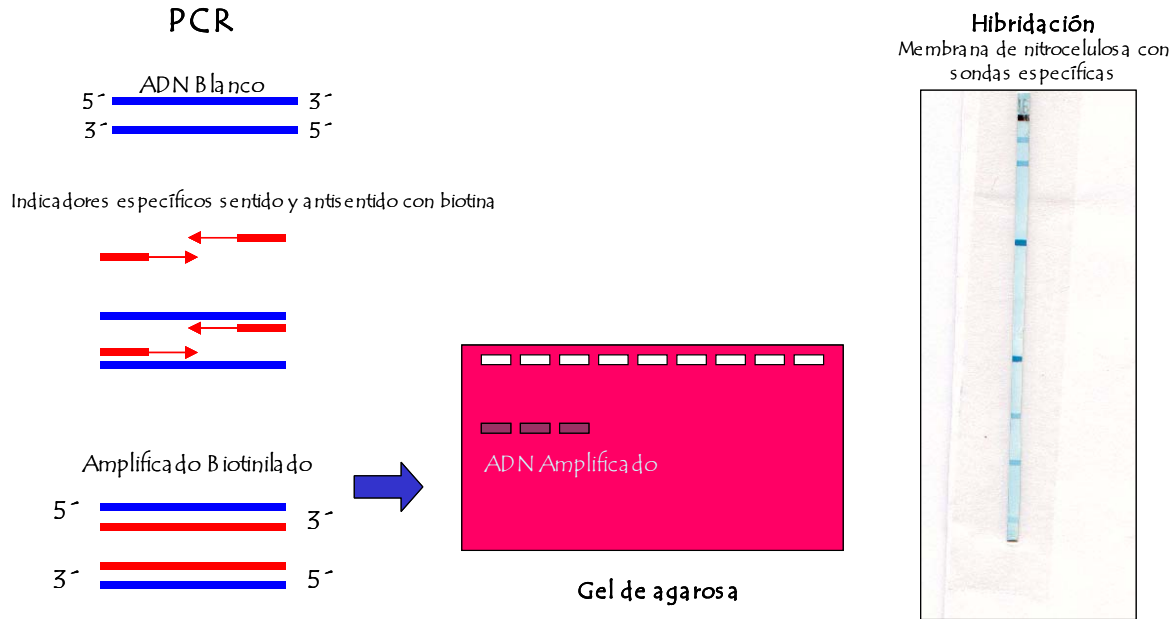


Figura 4. Proceso que se realiza para la tipificación de genes HLA clase II por PCR-SSOP.

Materiales: Tubos de ensayo tipo Vacutainer, con EDTA al 2%; Buffer de lisis para glóbulos rojos pH 7.5 (sacarosa 0.32M, triton X-100 1% v/v, MgCl₂ 6H₂O 5mM, tris-HCl 12mM); Buffer para proteinasa K (NaCl 0.375M + EDTA 0.12M) y HLA-DRB typing Kit MCA Dynal Reli SSO (HLA-DRB master mix, control DNA, HLA-DRB typing STRIPS, solución MgCl, HLA-DRB sobrepuesto y hoja de datos del HLA-DRB) de Hoffmann-La Roche and Roche Molecular Systems.

Análisis Estadístico

Para analizar las variables clínico-epidemiológicas se determinaron promedios de distribución de frecuencias simples y valores mínimos y máximos para determinar la asociación entre la preeclampsia y el HLA-DR. Para analizar las diferencias ente los casos y los controles, se calculó la frecuencia génica y se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas como chi cuadrada y exacta de Fisher, estableciendo el riesgo relativo (RR) como razón de momios (RM) y corrigiendo al valor de "p" por el número de comparaciones (Método de Bonferroni) paquete EPIINFO. Las pruebas no paramétricas se realizaron a

partir de tablas de contingencia de 2X2 con un intervalo de confianza de 95% y un nivel de significancia igual o menor a 0.05 de probabilidad.

V. RESULTADOS

Tabla 1. Características clínicas del grupo de estudio. Donde la cefalea es el principal sintoma de las pacientes.

SINTOMATOLOGÍA	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE (%)
Asintomática	7	15.9
Cefalea	37	84
Fosfenos	14	31.8
Acúfenos	17	38.6
Epigastralgia	3	6.8
Edema	27	61.3
Convulsión	1	2.2

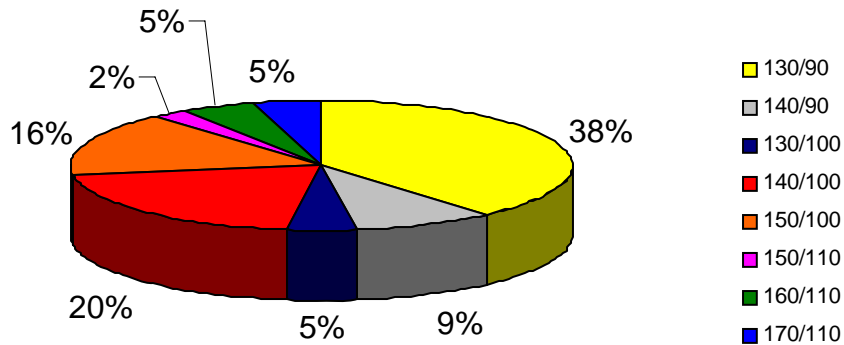
Fuente: Servicio de Ginecología y Obstetricia del HGM

Tabla 2. Cantidad de proteínas en orina registrada. La mayoría de las pacientes presenta proteinuria en orina de 24 horas.

PROTEINAS	NÚMERO DE PACIENTES
0	5
30	18
100-499	4
500-1900	5
MAYOR DE 2000	12

Fuente: Servicio de Ginecología y Obstetricia del HGM

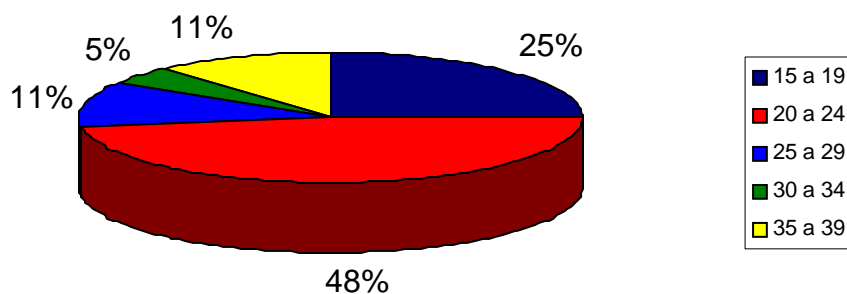
Presión Arterial



Fuente: Servicio de Ginecología y Obstreticia del HGM

Figura 5. La tensión arterial de la mayoría de las pacientes fué de 130/90 la cual representa el 38.6% de los casos. Seguida por la de 140/100 con un 20.4%.

Edad de las pacientes



Fuente: Servicio de Ginecología y Obstreticia del HGM

Figura 6. La mayoría de las pacientes se encuentran entre los 20 y 24 años de edad (47.7%), el 25% corresponde a pacientes entre 15 a 19 años de edad y no hay mujeres con más de 40 años.

Tabla 3. En relación a la edad gestacional se encontró que una edad promedio de 38 semanas. La edad máxima encontrada es de 41 semanas y la mínima de 31 semanas.

EDAD GESTACIONAL	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE (%)
31	1	2.2
32	3	6.8
33	2	4.5
34	0	0
35	4	9.09
36	5	11.3
37	7	15.9
38	8	18.1
39	4	9.09
40	7	15.9
41	3	6.8

Fuente: Servicio de Ginecología y Obstetricia del HGM

Tabla 4. Con respecto al número de embarazos de las pacientes se encontró que la mayoría de las pacientes son primigestas.

NÚMERO DE EMBARAZOS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE (%)
Primer embarazo	28	63.6
Segundo embarazo	8	18.1
Tercer embarazo	5	11.3
Más de cuatro embarazos	3	6.8

Fuente: Servicio de Ginecología y Obstetricia del HGM

Tabla 5. El diagnóstico más frecuentemente encontrado fue el de preeclampsia leve (54.5%), seguido de la preeclampsia severa (34%) La inminencia de eclampsia fue la menos presente con un 2.2%.

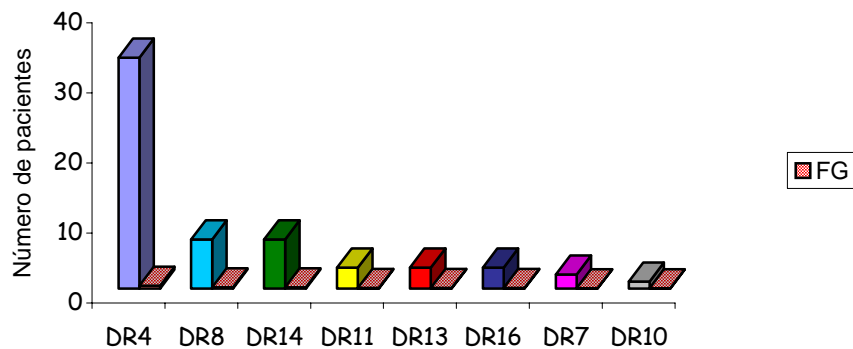
DIAGNOSTICO	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE (%)
Preeclampsia Leve (PL)	24	54.5
Preeclampsia Severa (PS)	15	34
Síndrome de HELLP (SH)	2	4.5
Inminencia de Eclampsia (IE)	1	2.2
Eclampsia (E)	2	4.5

Fuente: Servicio de Ginecología y Obstetricia del HGM

Tabla 6. La tabla muestra los datos obtenidos del HLA-DR para cada paciente. El DR4 esta presente en la mayoría de los casos con una frecuencia génica (FG) de 0.375, seguido del DR8 con una FG de 0.147.

DRB1	NÚMERO DE PACIENTES	FG
DR4	33	0.375
DR8	13	0.147
DR13	10	0.113
DR11	9	0.102
DR14	9	0.102
DR16	6	0.068
DR7	2	0.022
DR10	2	0.022
DR3	1	0.011

HLA-DRB1



Fuente: Departamento de inmunogenética del INCMNSZ

Figura 7. La figura muestra la frecuencia del HLA-DRB1 en las pacientes estudiadas.

Tabla 7. La tabla muestra los datos analizados del HLA-DRB1 04 y HLA-DRB1 07 como factores de susceptibilidad y protección a la enfermedad, respectivamente.

DRB1	CASOS (N=88)		CONTROLES (N=198)			
	n	fg	n	fg	p	RM
DR4	33	0.375	47	0.237	0.01	1.9 (1.0-3.4)
DR8	13	0.147	33	0.165	NS	-
DR13	10	0.113	10	0.050	NS	-
DR11	9	0.102	20	0.100	NS	-
DR14	9	0.102	21	0.105	NS	-
DR16	6	0.068	5	0.025	NS	-
DR7	2	0.022	22	0.111	0.034	5.3 (1.1-33)
DR10	2	0.022	10	0.050	NS	-
DR3	1	0.011	11	0.055	NS	-

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra la asociación del alelo HLA-DR4 con la susceptibilidad al desarrollo de preeclampsia en mujeres mexicanas y confirma los estudios realizados en otros grupos étnicos⁶⁸. Sin embargo, queda pendiente caracterizar el subtipo molecular HLA-DR4 debido a que la frecuencia de la enfermedad en México es del 10%. Por lo que se plantea la necesidad de investigar los factores etiológicos (haplotipos) y el papel étnico de dicha susceptibilidad en mujeres mexicanas.

En las mujeres mexicanas el HLA-DR4 parece ser un factor de riesgo del desarrollo de preeclampsia mientras que el HLA-DR7 parece ser un factor protector del desarrollo de la preeclampsia en el mismo grupo étnico¹⁵.

Los datos también sugieren el papel directo de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la fisiopatología de la preeclampsia. Es muy probable que el mecanismo de la susceptibilidad

involucre genes vecinos a la región HLA ubicados dentro del MHC, en particular en la región clase III donde se encuentra el Factor de Necrosis Tumoral. Diversos estudios han señalado la asociación entre haplotipos HLA (DR4) y TNF (1 y 2) con la hiperproducción o hipoproducción de TNF- α en pacientes con preeclampsia^{10, 15, 59, 60}.

CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos con el presente trabajo sugieren el papel directo del MHC en la patología de la preeclampsia al mostrar un factor de riesgo del desarrollo de dicha enfermedad ubicado en el locus HLA-DRB1.

Lo anterior sustenta la idea de que la patogénesis de la preeclampsia tiene un mecanismo inmunogenético, por lo que es pertinente la determinación de los alelos clase I, clase II y clase III que eventualmente añaden conocimiento en el pronóstico de la preeclampsia.

En conclusión es importante realizar estudios de HLA en mujeres y sus parejas antes o durante el embarazo para detectar la susceptibilidad al desarrollo de la preeclampsia en mujeres mexicanas.

BIBLIOGRAFIA

1. Hylenius S, Andersen AM, Melbye M and Hviid TV. 2004. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod. Apr; 10(4): 237-46.*
2. Merviel P, Carbillon L, Challier JC, Rabreau M, Beaufils M and Uzan S. 2004. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 115 (2) 134-47.
3. Pardo R, Romero S, Herrera J y González A. 2004. Nueva Alternativa Terapéutica en Preeclampsia Severa. *Cir. Ciruj.* 72(3): 203-207.
4. Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. 2004. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: A population-based Swedish cohort study. *Am J Med Genet.* Sep 21.
5. Walsh SW. 1998. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 16(1): 93-104
6. Austgulen R. 2004. Recent knowledge on mechanisms underlying development of preeclampsia. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 124(1): 21-4
7. Hoff C, Peevy K, Giattina K, Spinnato JA and Peterson RD. 1992 Maternal-fetal HLA-DR relationships and pregnancy-induced hypertension. *Obstet Gynecol. Dec; 80(6):1007-12.*
8. De Luca Brunori I, Battini L, Simonelli M, Brunori E, Valentino V, Curcio M, Mariotti ML, Lapi S and Genazzani AR. 2003. HLA-DR in couples associated with preeclampsia: background and updating by DNA sequencing. *J Reprod Immunol. Aug; 59(2): 235-43.*
9. Leszczynska-Gorzela B and Darmochwal-Kolarz D. 2000 Immunological Aspects of Preeclampsia. *Ginekol Pol. Jun; 71(6):448-63.*
10. Kilpatrick DC. 1999. Influence of Human Leukocyte Antigen and Tumour Necrosis Factor Genes on the Development of Preeclampsia. *Hum Reprod Update.* Mar-Apr 5(2): 94-102.
11. Dekker G. 2002. The partner's role in the etiology of preeclampsia. *J. Reprod Immunol.* 57(1-2): 203-5.
12. Wiktor H, Koziol P. 1998. Histocompatibility antigens in pregnant women with preeclampsia and in their husbands. *Ginekol Pol. Dec; 69(12): 937-42.*
13. Aguilar M. 2003. Mortalidad Materna en el Hospital General Dr. Manuel Gea González 1999-2003. Tesis Facultad de Medicina, UNAM.

14. Díaz D y Freyermuth G. 2004. Muerte Materna y Presupuesto Público. Fundar, Centro de Análisis e Investigación. Secretaría de salud.
15. Alanis, P. 2000. Factores Pronósticos Asociados a la Progresión de Preeclampsia-eclampsia. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM.
16. Velasco V, Navarrete E, Pozos JL y Corona JA. 1999. Mortalidad Materna por Preeclampsia-eclampsia en la Región la Raza (1988-1997) 37(5) 349-356
17. Bohórquez M.E. 2001. Factores Pronósticos Asociados a la progresión de la Preeclampsia Severa a Síndrome de Hellp. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM.
18. Artero MR. 2000. Expresión de los Proto oncogenes c-ras y c-fos en Pacientes Preeclámpticas contra Normales. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM.
19. Lorentzen B, Birkeland KI, Endresen MJ and Henriksen T. 1998. Glucose intolerance in women with preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand. Jan; 77(1): 22-7.*
20. Lorentzen B and Henriksen T. 1998. Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia *Semin Reprod Endocrinol; 16(1): 33-9*
21. Méndez A. 2003. Descripción Clínica e Identificación del Polimorfismo de los Genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II y del Factor de Necrosis Tumoral alfa en Pacientes con Preeclampsia Leve y Severa. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM.
22. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. 2001 Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension. 38 (3 Pt 2): 718-22.*
23. Ding ZQ, Rowe J, Ng B, Sinosich MJ, Gallery ED. 2002. Modulation of prostacyclin and thromboxane secretion by cytotrophoblasts from normal and preeclamptic human pregnancies. *Placenta. 23 (8-9): 594-599.*
24. Walsh, SW. 1985 Am J Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Obstet Gynecol. Jun 1 152(3):335-40*
25. Reyna, E. 2002. Metabolitos Del Óxido Nítrico Plasmático Y Niveles De Peróxidos Lipídicos En Pacientes Preeclámpticas Antes Y Después Del Parto. *Rev Obstet Ginecol Venez, Jun Vol.62 #2.*

26. Little RE, Gladen BC. 1999. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol. Sep-Oct;13 (5): 347-52.*
27. Hubel CA. 1999. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med. Dec; 222(3): 222-35.*
28. Page, EW. 1972 On the pathogenesis of preeclampsia and eclampsia. *J Obstet Gynaecol Br Commonw. Oct. 79(10): 883-94.*
29. Camilleri RS, Peebles D, Portmann C, Everington T, Cohen H. 2004. -455G/A beta-fibrinogen gene polymorphism, factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation and MTHFR C677T and placental vascular complications. *Blood Coagul Fibrinolysis. Mar 15(2):139-47.*
30. Bouba I, Makrydimas G, Kalaitzidis R, Lolis DE, Siamopoulos KC, Georgiou I. 2003 Interaction between the polymorphisms of the renin-angiotensin system in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. Sep 10. 110(1): 8-11.*
31. Scalera F. 2003. Intracellular glutathione and lipid peroxide availability and the secretion of vasoactive substances by human umbilical vein endothelial cells after incubation with TNF-alpha. *Eur J Clin Invest. Feb 33(2): 176-82.*
32. Gallery ED, Rowe J, Campbell S. 1999. In vitro human decidual endothelial cell thromboxane secretion in preeclampsia is not abnormal. : *Hypertens Pregnancy. 18(3): 219-27*
33. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, et al. 1993. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet. May; 4(1): 59-61.*
34. Morgan, L., Baker, P., Broughton, Pipkin, F and Kalsheker, N. 1995. Preeclampsia and the Angiotensinogen Gene. *Br J Obstet Gynaecol. Jun; 102(6): 489-90.*
35. Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P. 2004. The importance of Genetic and Environmental Effects for Preeclampsia and Gestational Hypertension: a Family Study. *BJOG. Mar; 111(3): 200-6*
36. Chesley LC and Cooper DW. 1986. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of preeclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *BrJ Obstet Gynaecol. Sep 93(9): 898-908.*

37. Dudding TE, Attia J. 2004. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis. *Thromb Haemost*, 91:700-11.
38. Ament L. 2003. Factor V Leiden: a review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs*, 17: 190-5.
39. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. 2003. Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and preeclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens*, 21: 1221-8.
40. Benedetto C, Marozio L, Salton L, Maula V, Chieppa G, Massobrio M. 2002. Factor V Leiden and factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 81: 1095-100.
41. Levesque S, Moutquin JM, Lindsay C, Roy MC, Rousseau F. 2004. Implication of an AGT haplotype in a multigene association study with pregnancy hypertension. *Hypertension*; 43:71-8.
42. Arngrimsson R, Bjornsson H, Geirsson RT. 1995. Analysis of different inheritance patterns in preeclampsia/eclampsia syndrome. *Hypertension Pregnancy*. 14:27-38.
43. Chesley LC. 1993. The genetics of preeclampsia. *Hypertension Pregnancy* 12:7-10.
44. Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G. 1990. Genetic and familial predisposition to eclampsia and preeclampsia in a defined population. *Br J Obstet Gynaecol*; 97: 762-9.
45. Chaouat G. 1994. Synergy of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines in murine pregnancy: alloimmunization prevents abortion but does not affect the induction of preterm delivery. *Cell Immunol*. Sep 157(2): 328-40.
46. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M and Wegmann TG. 1990. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil*. Jul; 89(2):447-58.
47. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. 2001. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun; 86(6): 2505-12.
48. Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. 1994. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res*. Sep 214(1): 46-54.
49. Knackstedt M, Ding JW, Arck PC, Hertwig K, Coulam CB, August C, Lea R, Dudenhausen JW, Gorczynski RM, Levy GA and Clark DA. 2001. Activation of the novel prothrombinase, fg12, as a basis for

the pregnancy complications spontaneous abortion and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. Sep 46(3): 196-210.

50. Leszczynska-Gorzela B, Darmochwal-Kolarz D. 2000. Immunological aspects of preeclampsia. *Ginekol Pol*. Jun; 71(6): 448-63.

51. Omu AE, Al-Azemi MK, Al-Qattan F and Al-Yatama M. 2004 Connection between human leucocyte antigens D region and T helper cytokines in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. Jan; 269(2): 79-84.

52. Heikkinen J, Mottonen M, Pulkki K, Lassila O, Alanen A. 2001. Cytokine levels in midtrimester amniotic fluid in normal pregnancy and in the prediction of preeclampsia. *Scand J Immunol*. Mar; 53(3): 310-4.

53. Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P, Lopez-Jaramillo P. 2001. Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. Dec; 75(3): 243-9.

54. Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. 2004. Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. *J Exp Med*. Oct 11.

55. Yie SM, Li LH, Li YM, Librach C. 2004. HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. Aug 191(2): 525-529.

56. O'Brien M, McCarthy T, Jenkins D, Paul P, Dausset J, Carosella ED, Moreau P. 2001. Altered HLA-G transcription in preeclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell Mol Life Sci*. 58:1943-1949.

57. Agrawal S, Pandey MK. 2003. The potential role of HLA-G polymorphism in maternal tolerance to the developing fetus. *J Hematother Stem Cell Res*. Dec 12(6): 749-56

58. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. 1999. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. May 41(5): 297-306.

59. Kaiser T, Grehan M, Brennecke SP, Moses EK. 2004. Association of the TNF2 allele with eclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 57(4): 204-209.

60. Vizi ES, Szelenyi J, Selmeczy ZS, Papp Z, Nemeth ZH, Hasko G. 2001. Enhanced TNF- α -specific and decreased interleukin-10-specific immune responses to LPS during the third trimester of pregnancy in mice. *J Endocrinol*. Nov; 171(2): 355-61.
61. Ruíz JA. 2005. Polimorfismos de Genes Clase II (HLA-DRB1 Y DQB1) y de Genes Clase III (TNF α Y HSP-70) del Complejo Principal de Histocompatibilidad en Pacientes Mestizos Mexicanos con Artritis Reumatoide. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM.
62. Yunis EJ, Zúñiga J, Larsen CE, Fernández-Viña M, Granados J, Awdeh ZL and Alper CA. 2005. Single nucleotide polymorphism blocks and haplotypes: Human MHC block diversity.
63. Inmunología Básica Antonio Eduardo Arias. Argentina 2002 WWW.WEBMEDICAARGENTINA
64. HLA-DRB1. 2004. www.ncbi.nlm.nih.gov
65. Piccinelli, G. 2004. Inmunología del trasplante. Crai Sur
66. The Lukemia & Lymphoma Society, 2004.
67. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St. John TP and Padgett RA. 1980. Rapid DNA Isolation for Enzymatic and Hybridization Analysis. *Methods Enzymol*. 65: 404-411
68. Takakuwa K, Honda K, Ishii K, Hataya I, Yasuda M, Tanaka K. 1999. Studies on the HLA-DRB1 genotypes in Japanese women with severe preeclampsia positive and negative for anticardiolipin antibody using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. *Hum Reprod*; 14: 2980-6.