



HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO rs1800247 DEL GEN  
*BGLAP* CON EL RIESGO Y SEVERIDAD DE LA  
PREECLAMPSIA EN PACIENTES DEL HOSPITAL DE LA  
MUJER AGUASCALIENTES**

TESIS

**PRESENTADA POR**

**Mauricio Cornejo Tiscareño**

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y  
OBSTETRICIA

ASESOR (ES)

**Dr. José Rafael Villafán Bernal**

**Dr. Leopoldo César Serrano Díaz**

**Aguascalientes, Ags., febrero de 2020**







## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por ser mi hogar desde que inicié mi educación secundaria, prácticamente, toda mi educación se la debo a esta hermosa casa de estudios.

Agradezco a los médicos adscritos del Hospital de Mujer Aguascalientes, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación. Quiero hacer mención especial al doctor Daniel Ely Bravo Aguirre, doctora Consuelo Robles Martínez, doctor Antonino Arturo Colón Muñoz, doctor, doctor Ezequiel Sotelo Félix, doctor Ricardo Javier Vargas Macías, doctora Hilda Vázquez Delfín, doctora Patricia Guzmán Ángeles, doctor Humberto Mejía Guardado, doctor José Rafael Villafán Bernal y doctora Patricia Negrete, quienes fueron las principales personas que influyeron en mi desarrollo profesional, gracias por todo el tiempo que invirtieron en mí formación.

De manera especial quiero agradecer al doctor Leopoldo Cesar Serrano Díaz, quien durante todo este proceso me brindó su apoyo incondicional, gracias por ser mi ejemplo, gracias por compartir todos sus conocimientos, gracias por enseñarme la importancia de los detalles, y sobre todo gracias por ser mi amigo.

Por último, quiero agradecer a la doctora Martha Hernandez Muñoz por su confianza durante este proceso, por siempre estar pendiente de nuestro bienestar y por ser el ejemplo mas claro de que nunca tenemos que darnos por vencidos, a pesar de tener todo en nuestra contra.

## DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres Ma. De Lourdes Tiscareño Flores y J. Dolores Cornejo Rangel quienes con su amor, paciencia y apoyo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de responsabilidad y humanidad que han hecho de mí la persona y el médico que soy ahora.

A mi futura esposa Rocío Lizeth Rodríguez Mendoza por ser la persona que más influyó en mi decisión de seguir este camino, la persona que me motiva a levantarme cada día y quien me inspira a mejorar cada día. Este largo camino, se hizo más fácil de transitar gracias a su compañía, gracias por ser mi ejemplo de trabajo, esfuerzo y calidad humana y por ser uno de los pilares principales de este logro. Te amo para toda la vida.

A mis hermanos, porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento me han ayudado a cumplir muchas de mis metas hasta el día de hoy. A mi hermana Lulita por estar conmigo durante todo este proceso, siempre pendiente de mi bienestar, gracias por cuidarme tanto. Gordis, May y Cesarín, gracias por estar a mi lado en este importante proceso. A mi hermano Carlitos, aunque no pudiste estar conmigo físicamente, siempre estuviste en mi mente y en mi corazón, hasta el cielo te dedico este logro hermanito.

A mis compañeros de generación, mi Chio, mi compadre Eric, Cesarín, Cama y Dago, quienes con el paso del tiempo se volvieron mis hermanos e hicieron de este proceso algo inolvidable, sin ustedes este camino hubiera sido muy complicado. Gracias por su compañía, por su apoyo en los peores momentos, por tantas risas y momentos felices, gracias por ser los mejores amigos que me pude encontrar.

**ÍNDICE GENERAL**

	Página
Índice general .....	i
Índice de tablas .....	ii
Índice de gráficas o figuras .....	ii
Resumen .....	iii
Abstract .....	iv
Introducción .....	1
CAPÍTULO 1 .....	2
1.1 Marco teórico .....	2
1.2 Justificación .....	14
1.3 Planteamiento del problema .....	15
1.4 Hipótesis .....	17
1.5 Objetivos .....	17
CAPÍTULO 2. Material, pacientes y métodos .....	18
2.1 Tipo, diseño y características del estudio .....	18
2.2 Población en estudio .....	18
2.3 Descripción y operacionalización de las variables .....	18
2.4 Selección de la muestra .....	20
2.5 Criterios de selección .....	20
2.6 Recolección de la información .....	21
2.7 Análisis estadístico .....	25
2.8 Consideraciones éticas .....	26
2.9 Recursos para el estudio .....	26
CAPÍTULO 3. Resultados .....	27
CAPÍTULO 4. Discusión .....	35
CAPÍTULO 5. Conclusiones .....	41
Bibliografía .....	42
Anexos .....	47

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Página
Tabla 1. Clasificación de los estados hipertensivos del embarazo .....	5
Tabla 2. Criterios diagnósticos de preeclampsia .....	7
Tabla 3. Parámetros de los reactivos y condiciones de la amplificación por PCR del segmento de interés del gen BGLAP.....	23
Tabla 4. Comparación de características demográficas y obstétricas entre casos y controles .....	27
Tabla 5. Comparación de antecedentes de importancia entre grupos .....	28
Tabla 6. Comparación de características clínicas y paraclínicas entre casos y controles .....	29
Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles .....	30
Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	31
Tabla 9. Asociación del polimorfismo rs1800247 con preeclampsia en pacientes con y sin obesidad .....	31
Tabla 10. Riesgo de preeclampsia por genotipo en pacientes con y sin obesidad (n=155) .....	32
Tabla 11. Comparación de parámetros clínicos y bioquímicos por alelo/genotipo .....	33

**ÍNDICE DE GRÁFICAS O FIGURAS**

	Página
Figura 1. Proceso de genotipificación del polimorfismo rs1800247.....	24
Figura 2. Verificación de los fragmentos de interés y genotipos del polimorfismo rs1800247 .....	25



## RESUMEN

**Introducción.** Dentro de la fisiopatología de la preeclampsia se han descrito factores genéticos que aumentan la susceptibilidad a la enfermedad. **Objetivo.** Se evaluó la asociación del polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* con el riesgo y severidad de la preeclampsia. **Metodología.** Se realizó un estudio de casos (pacientes con preeclampsia con criterios de severidad) y controles (pacientes con enfermedad hipertensiva descartada) en pacientes embarazadas del Hospital de la Mujer Aguascalientes. El genotipo de cada paciente se determinó con la técnica PCR-RFLP, se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg y se calculó el OR para preeclampsia para cada alelo y genotipo del rs1800247. Como prueba inferencial se utilizó la  $X^2$  y exacta de Fisher, considerando significativa una  $p < 0.05$ . **Resultados.** Se incluyeron 316 pacientes, 91 casos y 225 controles. Las pacientes con preeclampsia tuvieron significativamente mayores niveles de ácido úrico ( $6.1 \pm 1.8$  versus  $4.9 \pm 1.6$  mg/dL), menores de albúmina ( $3.1 \pm 0.8$  versus  $3.5 \pm 0.6$  g/L) y mayores de proteinuria al ingreso ( $299.3 \pm 201.8$  versus  $149.0 \pm 188.7$  mg/dL),  $p < 0.05$ . En mujeres sin obesidad, el genotipo CT se asoció con menor riesgo de preeclampsia (OR=0.14, IC95% 0.002-1.100,  $p = 0.0085$ ). Las portadoras de 1 o 2 alelos C tuvieron menores niveles de presión arterial sistólica ( $118.3 \pm 14.3$  mmHg versus  $133.9 \pm 23.6$  mmHg) y diastólica ( $79.8 \pm 12.9$  versus  $88.11 \pm 16.5$  mmHg) que las portadoras del alelo T ( $p < 0.01$ ). **Conclusiones.** En pacientes con índice de masa corporal normal pregestacional la presencia de uno dos alelos C, confiere protección para el desarrollo de preeclampsia y se asocia con menores cifras de presión arterial sistólica y diastólica.

## ABSTRACT

**Introduction.** Within the pathophysiology of preeclampsia, genetic factors that increase susceptibility to the disease have been described. **Objective.** The association of the rs1800247 polymorphism of the *BGLAP* gene with the risk and severity of preeclampsia was evaluated. **Methodology.** A case study (patients with preeclampsia with severity criteria) and controls (patients with discarded hypertensive disease) was carried out in pregnant patients at Aguascalientes Women's Hospital. The genotype of each patient was determined with the PCR-RFLP technique, the Hardy-Weinberg equilibrium was determined and the OR for preeclampsia was calculated for each allele and rs1800247 genotype. As an inferential test, Fisher's exact X2 was used, considering  $p < 0.05$  as significant. **Results.** 316 patients, 91 cases and 225 controls were included. Patients with preeclampsia had significantly higher levels of uric acid ( $6.1 \pm 1.8$  versus  $4.9 \pm 1.6$  mg / dL), lower albumin ( $3.1 \pm 0.8$  versus  $3.5 \pm 0.6$  g / L) and higher proteinuria at admission ( $299.3 \pm 201.8$  versus  $149.0 \pm 188.7$  mg / dL),  $p < 0.05$ . In women without obesity, the CT genotype was associated with a lower risk of preeclampsia (OR = 0.14, 95% CI 0.002-1.100,  $p = 0.0085$ ). Carriers of 1 or 2 C alleles had lower levels of systolic blood pressure ( $118.3 \pm 14.3$  mmHg versus  $133.9 \pm 23.6$  mmHg) and diastolic ( $79.8 \pm 12.9$  versus  $88.11 \pm 16.5$  mmHg) than carriers of the T allele ( $p < 0.01$ ). **Conclusions** In patients with normal pregestational BMI, the presence of one two C alleles confers protection for the development of preeclampsia and is associated with lower systolic and diastolic blood pressure.

## INTRODUCCIÓN

La preeclampsia constituye una de las principales causas de muerte en nuestro país, conocida como enfermedad de las teorías, en donde a pesar de los estudios y estrategias que continuamente se realizan, hoy por hoy, no se conoce la causa u origen.

El estado de Aguascalientes y en particular el Hospital de la Mujer Aguascalientes no está exento de enfrentarse a esta entidad patológica. En este hospital, se atendieron 8,834 nacimientos en 2019, encontrando que la incidencia de preeclampsia no se ha modificado en comparación a los últimos años, a pesar de todas las acciones que se toman, en torno a la enfermedad.

Debido a lo anterior surge la inquietud de seguir en la búsqueda de nuevos marcadores, que nos permitan actuar y disminuir la incidencia de la enfermedad. Cabe mencionar que, a pesar de no impactar en la incidencia, si se ha impactado en la disminución de la mortalidad en el estado y se ha mejorado en los resultados perinatales.

En el presente documento se analizó la asociación del polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* con el riesgo y severidad de la preeclampsia en pacientes del Hospital de la Mujer Aguascalientes, siendo este el objetivo principal.

La realización del presente estudio contribuirá a estudiar si el polimorfismo de interés en el gen *BGLAP* es un factor genético de susceptibilidad para preeclampsia y/o se asocia con la severidad de la enfermedad. En caso de resultar asociado a esto, se podría incluir como un marcador que ayude a conocer el pronóstico de las pacientes y/o que forme parte de los modelos actuales de predicción de la enfermedad.

## CAPÍTULO 1

### 1.1 MARCO TEÓRICO

Anteriormente la preeclampsia fue definida como un síndrome multisistémico de severidad variable, específico del embarazo, caracterizado por una reducción de la perfusión sistémica generada por vasoespasmo y activación de los sistemas de coagulación. Patología caracterizada por la presencia de hipertensión de inicio reciente y proteinuria significativa de nueva aparición, lo que ocurre con mayor frecuencia después de las 20 semanas de gestación, durante el parto o en el puerperio. Aunque a menudo se acompaña de proteinuria, la hipertensión y otros signos o síntomas de preeclampsia pueden presentarse en algunas mujeres en ausencia de proteinuria. <sup>1,2</sup>

Actualmente, la definición internacionalmente aceptada de preeclampsia es la propuesta por la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP). Según el ISSHP, la preeclampsia se define como el aumento de la presión arterial sistólica a  $\geq 140$  mm Hg y / o el aumento de la presión arterial diastólica a  $\geq 90$  mm Hg en al menos dos ocasiones medidas con 4 horas de diferencia en mujeres previamente sin elevación en las cifras de tensión arterial y está acompañada por una o más de las siguientes condiciones de inicio nuevo en o después de las 20 semanas de gestación: <sup>3</sup>

1. Proteinuria

2. Evidencia de disfunción orgánica materna, que incluye: lesión renal aguda, afectación hepática (alteración en pruebas de funcionamiento hepático) con o sin dolor a nivel de cuadrante superior derecho o dolor abdominal epigástrico; complicaciones neurológicas (eclampsia, estado mental alterado, ceguera, accidente cerebrovascular, clonus, dolores de cabeza severos y escotomas visuales persistentes); o complicaciones hematológicas

(trombocitopenia - recuento de plaquetas  $<150\ 000 / \mu\text{L}$ , coagulación intravascular diseminada, hemólisis); o

3. Disfunción útero-placentaria (como restricción del crecimiento fetal, Doppler de la arteria umbilical anormal o muerte fetal).<sup>3</sup>

Los trastornos hipertensivos del embarazo representan la complicación más común en el embarazo, afectando aproximadamente el 15% de los embarazos y representan casi el 18% de todas las muertes maternas en el mundo, con un estimado de 62 000 a 77 000 muertes por cada año.<sup>4</sup>

En un análisis sistemático realizado por la Organización Mundial de la Salud, se estima que alrededor del 73% de todas las muertes maternas entre 2003 y 2009 se debieron a causas obstétricas directas. La hemorragia representó el 27.1%, los trastornos hipertensivos 14.0% y la sepsis 10.7% de muertes maternas.<sup>5</sup> Se estima que afecta a un 2% a 5% de mujeres embarazadas y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal, especialmente cuando la condición es de inicio temprano. Las mujeres en países de bajos recursos tienen un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia en comparación con aquellas en países de altos recursos.<sup>3</sup>

En América Latina y el Caribe, los trastornos hipertensivos son responsables de casi el 22 - 26%, ocupando el primer lugar de las muertes maternas, mientras que en África y Asia contribuyen al 9% de muertes.<sup>5</sup> Aunque la mortalidad materna es mucho menor en los países de altos ingresos que en los países en desarrollo, el 16% de las muertes maternas pueden atribuirse a trastornos hipertensivos.<sup>6</sup>

A nivel mundial, 76 000 mujeres y 500 000 bebés mueren cada año de este desorden.<sup>3</sup> Los estudios de países industrializados muestran que las mujeres con preeclampsia tienen un 35% más de riesgo de muerte fetal. Los estudios de países menos industrializados muestran que la preeclampsia está asociada con un riesgo doble de muerte fetal y este mayor riesgo se ha mantenido relativamente constante

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

durante las últimas décadas. Las mujeres con preeclampsia grave tienen un riesgo 80 veces mayor de parto prematuro iatrogénico antes de las 33 semanas y un riesgo 40 veces mayor entre las 33 y 36 semanas. Los hijos de madres con preeclampsia tienen un mayor riesgo de puntajes bajos de Apgar, convulsiones febriles, encefalopatía y admisión a la unidad de cuidados intensivos neonatales. <sup>7</sup> De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la incidencia de preeclampsia oscila entre el 2 y 10% del total de embarazos, y su prevalencia es siete veces mayor en los países en vías de desarrollo (2.4%) que en los países desarrollados (0.4%). <sup>8</sup>

Las estimaciones precisas de la incidencia de preeclampsia son difíciles de obtener debido a la falta de estandarización de los criterios de diagnóstico en las bases de datos de la población. Los informes de países industrializados arrojaron estimaciones entre 3 y 5%. Se han reportado estimaciones más altas en algunos estudios, con una incidencia de 8.4% reportada desde el estado de Washington y tasas de 8.7% (preeclampsia leve) y 1.7% (preeclampsia severa) reportada desde Nueva Escocia. Estas variaciones probablemente reflejan ambas diferencias en las características maternas entre poblaciones (como la distribución por edad) y el diagnóstico. <sup>7</sup>

En México, la preeclampsia constituye la principal causa de muerte materna en las instituciones que conforman el Sistema Nacional de Salud. Se presentan 2.1 millones de embarazos cada año y cerca de 250 000 a 300 000 tienen complicaciones, en consecuencia, cada año 30 000 mujeres quedan con secuelas obstétricas que las convierten en discapacitadas. Sin embargo, aunque el 85% de las defunciones maternas son prevenibles, en promedio, aún fallecen anualmente 1000 mujeres. La presencia de complicaciones durante el embarazo como edema, proteinuria y trastornos hipertensivos, son la segunda complicación más frecuente, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI); entre este grupo de morbilidad materna, son prevalentes, la preeclampsia (40%), síndrome de HELLP (3%) y eclampsia (1%). <sup>9</sup>

Tabla 1. Clasificación de los estados hipertensivos del embarazo <sup>3,10</sup>	
Estado hipertensivo	Características
<p><b>Hipertensión Crónica (Preexistente)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Con comorbilidades</li> <li>• Con preeclampsia sobreagregada</li> </ul>	<p>Se define como hipertensión que estaba presente antes del embarazo o que se desarrolla antes de la semana 20 de gestación</p> <p>Se considera con preeclampsia sobreagregada cuando hay desarrollo de uno o más de los siguientes después de las 20 semanas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertensión resistente, o</li> <li>• Proteinuria nueva o que empeora, o</li> <li>• Una o más condiciones adversas o</li> <li>• Una / más complicaciones severas</li> </ul>
<p><b>Hipertensión Gestacional</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Con comorbilidades</li> <li>• Con preeclampsia sobreagregada</li> </ul>	<p>Se define como la hipertensión que se desarrolla por primera vez a las 20 semanas de gestación.</p> <p>La preeclampsia sobreagregada puede aparecer muchas semanas después del inicio de la hipertensión gestacional y se considera cuando hay desarrollo de uno o más de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nueva proteinuria, o</li> <li>• Una o más condiciones adversas o</li> <li>• Una / más complicaciones severas</li> </ul>
<p><b>Preeclampsia</b></p>	<p>Se define por hipertensión gestacional y uno o más de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nueva proteinuria, o</li> <li>• Evidencia de disfunción orgánica materna</li> <li>• Disfunción útero-placentaria</li> </ul>
<p><b>Otros estados hipertensivos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estado hipertensivo transitorio</li> <li>• Efecto hipertensivo de bata blanca</li> <li>• Efecto hipertensivo enmascarado</li> </ul>	<p>La presión arterial elevada puede deberse a estímulos ambientales o al dolor del parto.</p> <p>Presión arterial elevada en la oficina pero es consistentemente normal fuera de la oficina verificado por monitoreo ambulatorio de la presión arterial</p> <p>Presión arterial consistentemente normal en la oficina pero que se eleva fuera de la oficina verificado por monitoreo ambulatorio de la presión arterial</p>

**La preeclampsia se puede subclasificar en:** <sup>3</sup>

1. Preeclampsia de inicio temprano (con parto a  $<34 + 0$  semanas de gestación)
2. Preeclampsia con embarazo prematuro (con parto a  $<37 + 0$  semanas de gestación)
3. Preeclampsia de inicio tardío (con parto  $\geq 34 + 0$  semanas de gestación)
4. Preeclampsia con embarazo de término (con parto a  $\geq 37 + 0$  semanas de gestación).

En la actualidad el Colegio Americano de Ginecólogos y Obstetras (ACOG) integra la clasificación de preeclampsia con y sin criterios de severidad, y es recomendable que, en la mujer con embarazo y trastorno hipertensivo, sea clasificada en base a la presencia o ausencia de criterios de severidad de acuerdo a lo establecido por dicho colegio. <sup>2</sup>

El espectro clínico de la preeclampsia varía desde una forma leve a severa. En la mayoría de las mujeres, la progresión a través de este espectro es lenta, y el diagnóstico de preeclampsia sin datos de severidad debe ser interpretado como una fase de la enfermedad. <sup>2</sup>

En otros, la enfermedad progresa más rápidamente, cambiando de a una forma con datos de severidad en días o semanas. En los casos más graves, la progresión puede ser fulminante, con evolución a eclampsia en cuestión de días o incluso horas. Por lo tanto, el objetivo más importante es la prevención de la morbilidad materna y perinatal. <sup>2</sup>



Tabla 2. Criterios diagnósticos de preeclampsia <sup>3,6</sup>	
Criterios diagnósticos para preeclampsia Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia	Criterios diagnósticos para preeclampsia Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo
<p><b>Presión sanguínea:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presión arterial sistólica de 140 mm Hg o más o presión arterial diastólica de 90 mm Hg o más en dos ocasiones con al menos 4 horas de diferencia después de 20 semanas de gestación en una mujer con presión arterial normal</li> <li>2. Presión arterial sistólica de 160 mm Hg o más o presión arterial diastólica de 110 mm Hg o más. (La hipertensión severa se puede confirmar dentro de un corto intervalo (minutos) para facilitar oportunamente terapia antihipertensiva).</li> </ol> <p><b>Proteinuria:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 300 mg o más por recolección de orina de 24 horas (o esta cantidad extrapolada de una recolección programada), ó</li> <li>2. Relación proteína / creatinina de 0.3 mg / dL o más ó</li> <li>3. Lectura de la tira reactiva de orina de 2+ (se usa solo si no hay otro métodos disponible)</li> </ol> <p><b>En ausencia de proteinuria, hipertensión de inicio reciente con el nuevo inicio de cualquiera de los siguientes:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Trombocitopenia:</b> recuento de plaquetas menor que 100,000 x 10<sup>9</sup> / L</li> <li>2. <b>Insuficiencia renal:</b> concentraciones séricas de creatinina superiores a 1.1 mg / dL o una duplicación de la concentración sérica de creatinina en ausencia de otra enfermedad renal</li> <li>3. <b>Función hepática alterada:</b> concentraciones sanguíneas elevadas de transaminasas hepáticas a dos veces la concentración normal</li> <li>4. <b>Edema pulmonar</b></li> <li>5. <b>Cefalea:</b> de nueva aparición que no responde a la medicación y no se explica por diagnósticos alternativos o síntomas visuales</li> </ol>	<p><b>Hipertensión gestacional acompañada de ≥1 de los siguientes condiciones de nueva aparición en o después de las 20 semanas de gestación:</b></p> <p><b>Proteinuria:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proteína de orina de 24 h ≥300 mg / do orina puntual</li> <li>2. Relación proteína / creatinina ≥0.30 mg / mg</li> <li>3. Tira reactiva de orina prueba ≥1 +</li> </ol> <p><b>Otras disfunciones de órganos maternos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Daño renal agudo:</b> Creatinina ≥90 μmol / L; 1 mg / dL</li> <li>2. <b>Afectación hepática:</b> Alanina aminotransferasa elevada o aspartato aminotransferasa &gt; 40 UI / L. Lo anterior con o sin dolor a nivel de cuadrante superior derecho o dolor epigástrico.</li> <li>3. <b>Complicaciones neurológicas:</b> Incluyendo eclampsia, alteración estado mental, ceguera, accidente cerebrovascular, o más comúnmente hiperreflexia cuando se acompaña de clonus, grave dolores de cabeza y escotomas visuales persistentes.</li> <li>4. <b>Complicaciones hematológicas:</b> trombocitopenia con un recuento plaquetario &lt;150 000 / μL, coagulación intravascular diseminada, hemólisis.</li> <li>5. <b>Disfunción útero-placentaria:</b> Restricción del crecimiento fetal, Doppler anormal de la arteria umbilical o nacimiento de un niño muerto.</li> </ol>

## **Gen *BGLAP***

El Gen *BGLAP* o proteína gamma-carboxiglutamato ósea es un tipo de gen destinado a la codificación de proteínas propio del ser humano. También conocido como OC; BGP; OCN; este gen codifica una proteína ósea (osteocalcina) altamente abundante secretada por osteoblastos que regula la remodelación ósea y el metabolismo energético. La proteína codificada contiene un dominio Gla (gamma carboxiglutamato), que funciona en la unión al calcio y la hidroxapatita, el componente mineral del hueso. Los niveles séricos de osteocalcina pueden correlacionarse negativamente con el síndrome metabólico. <sup>11</sup>

## **Osteocalcina**

El hueso es un tejido dinámico en constante remodelación (reabsorción y formación) y con una alta capacidad de regeneración. Además de proporcionar apoyo al cuerpo, protección para ciertos órganos y permitir la locomoción, el hueso produce moléculas que actúan de manera autócrina, parácrina y endócrina. Una de esas moléculas es la osteocalcina, cuya función endocrina se descubrió hace 10 años. Debido a su extensa secreción durante la mineralización ósea, se sospechaba que la osteocalcina era exclusiva de la fisiología ósea. Sin embargo, a través de estudios realizados en ratones, se aclaró el papel de la osteocalcina en la modulación metabólica. <sup>12</sup>

La osteocalcina es una proteína pequeña (49 aminoácidos) codificada por el gen *BGLAP* sintetizado por los osteoblastos, y está presente en dos formas: carboxilada y subcarboxilada o no carboxilada. Solo la osteocalcina no carboxilada puede señalar como hormona, mientras que la osteocalcina carboxilada no. La osteocalcina no carboxilada y la osteocalcina carboxilada se pueden medir en plasma por separado o como la osteocalcina total, que incluye las dos formas independientemente de su grado de carboxilación, así como fragmentos reconocibles liberados cuando se produce la resorción ósea. Solo el 10-30% de la osteocalcina secretada alcanza la circulación sistémica, mientras que la fracción

restante se incorpora a la matriz ósea. En el hueso, la osteocalcina carboxilada representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Por otro lado, la osteocalcina no carboxilada representa un tercio de la osteocalcina total. La concentración sérica de osteocalcina total se han considerado un marcador bioquímico de osteogénesis que refleja el número y la actividad de los osteoblastos. <sup>12</sup>

La osteocalcina (también conocida como proteína Gla ósea) constituye también una de las proteínas no colágenas más abundantes del hueso, siendo sintetizada por los osteoblastos bajo el control transcripcional de un elemento de respuesta a la vitamina D en el promotor de su gen. Posterior a su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso, pero pequeñas cantidades se liberan a la circulación considerándose un marcador de formación ósea. Su modificación postraduccional mediante una gamma-carboxilación dependiente de vitamina K le permite unirse fuertemente a los iones de calcio de la hidroxapatita. Sin embargo, la fracción infracarboxilada, con menos de 3 residuos carboxilados, tiene una menor afinidad por el hueso. Así, una mayor proporción de osteocalcina infracarboxilada se encuentra en la circulación pudiendo actuar a otros niveles del organismo <sup>13</sup>. El descubrimiento de la interacción de la osteocalcina con el receptor de la familia G del receptor C acoplado al grupo C de 6 miembros (GPCR6A) fue lo que permitió conocer las varias funciones que este péptido cumple en la regulación corporal y la homeostasis. Dentro de las funciones más importantes de esta molécula se encuentran: <sup>12</sup>

- La modulación de la memoria a nivel cerebral
- Actúa a nivel testicular, teniendo relación con la fertilidad
- Está relacionada a la acumulación de grasa en el hígado
- Libera incretinas a nivel intestinal (secreción de insulina por el páncreas y la disminución en los niveles de glucosa en sangre)
- Interviene en la adaptación del músculo al ejercicio

- Tiene efectos sobre la proliferación de células  $\beta$ , la liberación de insulina y secreción de adiponectina.

### **Tejidos diana de osteocalcina**

Se ha demostrado que la activación directa de GPRC6A por la osteocalcina modifica la proliferación de células  $\beta$  y la secreción de insulina.<sup>14,15</sup> En adipocitos cultivados derivados de roedores, se ha demostrado que ucOC aumenta la expresión de adiponectina al aumentar el AMPc a través de la activación de GPRC6A. Esto ocurre gracias a la señalización intracelular de ERK, que conduce a la expresión de Ppar $\gamma$  y a la posterior producción de esta hormona sensibilizante a la insulina.<sup>16</sup>

En el músculo esquelético, la osteocalcina se une al GPRC6A, favoreciendo la absorción y el catabolismo de la glucosa y los ácidos grasos durante el ejercicio. En línea con esto, estimula la liberación de interleucina-6 por el músculo, una molécula que modula la secreción de osteocalcina no carboxilada en el hueso, aumenta la producción hepática de glucosa y estimula la liberación de ácidos grasos del adipocito. Durante el ejercicio aeróbico, los niveles circulantes de osteocalcina no carboxilada se duplicaron cuando la insulina alcanza su punto más bajo. Por contrato, en ratones de edad avanzada, la osteocalcina es necesaria y suficiente para mantener la masa muscular. Por lo tanto, la osteocalcina participa en la adaptación del cuerpo al ejercicio y ayuda a mantener la masa muscular.<sup>14,17</sup>

Se ha establecido en base a varios experimentos, que la osteocalcina es una hormona derivada del hueso que favorece la fertilidad en ratones machos al promover la maduración de las células de Leydig y la producción de testosterona. Esto demuestra que para al menos un género hay un regulador endocrino de reproducción por el esqueleto. También se demuestra la existencia de diferencias importantes en la regulación de la fertilidad entre ratones machos y hembras. Por lo anterior el hueso no se ve clásicamente como un órgano endocrino y mucho menos como una reproducción reguladora. Los resultados en varios estudios fueron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sorprendentes debido a la ausencia de regulación de la fertilidad en las hembras. Por otro lado, se esperaban porque la regla de retroalimentación que se aplica a la mayoría de las regulaciones endocrinas sugería que dado el hecho de que las hormonas esteroides sexuales regulan la masa ósea en ambos sexos, tal regulación de retroalimentación podría existir. En términos más amplios, la existencia de esta función aumenta la importancia de la osteocalcina como hormona. <sup>18</sup>

### **Osteocalcina y aparato cardiovascular**

Uno de los hilos de investigación en relación a la osteocalcina ha sido su interacción con el sistema vascular y su supuesto papel en el proceso de calcificación vascular o aterosclerosis. La osteocalcina no solo es producida por el hueso, sino que también se expresa por las células del músculo liso vascular que muestran un fenotipo similar a los osteoblastos. Se ha demostrado que la osteocalcina estimula la mineralización y diferenciación de las células del músculo liso vascular, en particular a través de la activación de HIF-1 $\alpha$ , suponiendo que la osteocalcina aumenta la utilización de glucosa en las células del músculo liso vascular y promueve la diferenciación osteocondrogénica que resulta en calcificación. <sup>19</sup>

Las células progenitoras endoteliales pueden diferenciarse en células endoteliales y desempeñar un papel en la angiogénesis. Se ha planteado la hipótesis de que las células progenitoras endoteliales positivas para osteocalcina están involucradas en el mecanismo de calcificación al mediar la reparación vascular anormal. Se cree que esto se debe a la activación de genes osteogénicos dentro de las células progenitoras endoteliales. Las células progenitoras endoteliales se consideran parte de la respuesta inicial al daño del vaso sanguíneo; sin embargo, en lugar de promover la reparación normal, expresan un "transcriptosoma osteogénico" que promueve la calcificación. Esto está respaldado por análisis de expresión génica de células CD34 + que muestran la expresión de proteínas relacionadas con la mineralización ósea como Runx2 y BMP-2. Se ha demostrado que OC se expresa mediante placas ateroscleróticas y VSMC, que ya se han diferenciado como parte

del proceso de calcificación, por lo que estudiar la asociación entre las células que expresan osteocalcina y la calcificación podría proporcionar una dirección adicional para futuros estudios. <sup>20,21</sup>

El mecanismo detrás de la calcificación sigue sin resolverse y, por lo tanto, el papel de la osteocalcina, si lo hay, es difícil de identificar. Se ha planteado la hipótesis de que las placas ateroscleróticas pueden promover inicialmente la secreción de osteocalcina, pero eventualmente el mayor nivel de osteocalcina puede suprimir la progresión de la aterosclerosis o calcificación. <sup>22</sup>

El 37% de los estudios realizados en Asia informaron relaciones negativas entre la osteocalcina y la calcificación o la aterosclerosis, en comparación con el 6% de los estudios europeos. Los estudios en ambas poblaciones utilizaron una combinación de puntos finales que miden la calcificación o la aterosclerosis, lo que demuestra que esta variación no afectó esta comparación. En 10 estudios que tenían un tamaño de muestra > 300, 1 informó un resultado positivo, 7 informaron resultados negativos, y los dos restantes no encontraron resultados significativos, por lo que se puede concluir que la etnia puede desempeñar un papel en los resultados contradictorios de los estudios previamente mencionados. <sup>23</sup>

Se realizó un metanálisis proporcionando datos adecuados sobre la concentración de osteocalcina el cual confirmó los resultados del componente cualitativo de esta revisión sistemática. La gran heterogeneidad informada nuevamente cuestiona la confiabilidad de las mediciones de concentración de osteocalcina en suero o plasma, la precisión de los métodos de medición de osteocalcina total y sus formas carboxiladas y subcarboxiladas, y la necesidad de estudios bien definidos con el objetivo principal de evaluar el papel de osteocalcina en calcificación vascular y aterosclerosis. La heterogeneidad presente en el metanálisis puede explicarse aún más por la variedad de poblaciones de estudio (enfermedad renal, diabetes o intolerancia a la glucosa, mujeres posmenopáusicas e hipertensión) y los diferentes métodos empleados para distinguir entre aquellos con y sin calcificación vascular o

aterosclerosis diferentes grados de gravedad en el mismo. Se concluyó, que no se puede establecer una asociación clara entre la osteocalcina y la calcificación vascular o la aterosclerosis de la investigación publicada actualmente disponible.<sup>24</sup>

### **Osteocalcina y preeclampsia**

Durante el embarazo normal, se producen cambios importantes en la homeostasis del calcio materno y el metabolismo óseo, a fin de satisfacer la demanda de calcio del feto para el crecimiento esquelético y la mineralización. Los requerimientos de calcio fetal se pueden cumplir mediante la movilización de calcio del esqueleto materno a través del ajuste del metabolismo del calcio materno mediado por hormonas.<sup>25</sup> Los cambios difásicos resultantes en la histología ósea materna (pérdida temporal de hueso esponjoso al inicio del embarazo restaurada por la gestación a término) son consistentes con los cambios bioquímicos sanguíneos correspondientes: marcadores de resorción ósea aumentados en el primer trimestre, seguidos de marcadores de formación ósea elevados a término.<sup>25,26</sup>

Se piensa que el recambio óseo materno durante la gestación aumenta en los trastornos hipertensivos del embarazo, incluida la preeclampsia y la hipertensión inducida por el embarazo, lo que probablemente conduzca a una mayor reducción de la densidad mineral ósea materna. Sin embargo, los mecanismos exactos que subyacen el efecto del embarazo normal y los trastornos hipertensivos del embarazo sobre el esqueleto materno no se comprenden completamente.<sup>27</sup>

La osteocalcina se sintetiza en el esqueleto por los osteoblastos y 10 a 30% de ella se libera a la circulación, la osteocalcina sérica generalmente refleja la síntesis de osteocalcina por los osteoblastos y la formación de hueso. Estudios han demostrado que los niveles de osteocalcina en suero eran más altos en preeclampsia que en el embarazo normotensivo y que había una correlación significativa entre la osteocalcina y la deoxipiridinolina urinaria en preeclampsia. Se puede concluir que la preeclampsia se caracteriza por un aumento en el recambio óseo.<sup>28</sup>

Se piensa que el factor de crecimiento insulínico (IGF-I), la osteocalcina y la pérdida ósea serían diferentes entre las mujeres con preeclampsia en comparación con las mujeres embarazadas normotensas. Las mujeres con preeclampsia parecen tener una respuesta exagerada al IGF-I en comparación con las mujeres que son normotensas; sin embargo, la fuerte correlación entre IGF-I y osteocalcina en mujeres con preeclampsia sugiere que el IGF-I puede mantener su papel como regulador local de la remodelación ósea, como lo indican las concentraciones de osteocalcina.<sup>29</sup>

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

### Relevancia

Los trastornos hipertensivos del embarazo representan la complicación más común en el embarazo, afectando aproximadamente el 15% de los embarazos y representan casi el 18% de todas las muertes maternas en el mundo, con un estimado de 62 000 a 77 000 muertes por cada año. Se calcula que mueren anualmente en el mundo 50,000 mujeres por preeclampsia, la Organización Mundial de la Salud reporta que cada siete minutos muere una mujer por esta causa. En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, la preeclampsia representa hasta 34% del total de las muertes maternas, por lo que constituye la principal causa de muerte asociada a complicaciones del embarazo.<sup>4,5</sup>

### Trascendencia

La realización del presente estudio contribuyó a estudiar si el polimorfismo de interés en el gen *BGLAP* es un factor genético de susceptibilidad para preeclampsia y/o se asocia con la severidad de la enfermedad. El objetivo es que en un futuro, podamos incluir como un marcador que ayude a conocer el pronóstico de las pacientes y/o que forme parte de los modelos actuales de predicción de la enfermedad.



### **Aplicabilidad**

Ya que la preeclampsia es una de las entidades patológicas que más frecuentemente se presentan en la embarazada, si el marcador genético de interés es útil como pronóstico o factor de riesgo, todas aquellas pacientes con embarazo se podrían beneficiar de la genotipificación de la variante de interés durante los primeros trimestres del embarazo, o incluso antes de lograr un embarazo.

### **Factibilidad**

Realizar el presente estudio es factible porque se tiene la capacidad técnica para realizarlo, se cuenta con instalaciones, material y equipo en el Laboratorio de Biología Molecular y Biomateriales para realizar la genotipificación del polimorfismo de interés sin costo alguno para las pacientes. Así mismo, es importante mencionar que, se tiene acceso a pacientes en volumen suficiente y el tiempo para la realización del estudio.

## **1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los trastornos hipertensivos del embarazo representan la complicación más común en el embarazo, afectando aproximadamente el 15% de los embarazos y representan casi el 18% de todas las muertes maternas en el mundo, con un estimado de 62 000 a 77 000 muertes por cada año. <sup>4</sup>

La preeclampsia es la causa más importante de morbimortalidad materna y perinatal, se estima que mueren al año en el mundo 50,000 mujeres por preeclampsia-eclampsia y en México causa hasta 34% del total de las muertes maternas. <sup>5</sup>

Dado que se ha demostrado que factores genéticos contribuyen a la susceptibilidad de la preeclampsia, es importante contar con el conocimiento de cuáles otros factores genéticos distintos a los encontrados hasta el momento, se asocian con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Incluso, si estos factores se asocian a la severidad de la enfermedad. <sup>30</sup>

En este sentido, el rs1800247 en el gen de la osteocalcina, es un posible candidato como marcador de susceptibilidad a preeclampsia, porque la osteocalcina es una molécula asociada a parámetros cardiovasculares incluyendo el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de la cintura, la presión arterial, la glucosa y los lípidos, que a su vez son factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia. Y porque además, estudios recientes sugieren que se expresa en los vasos sanguíneos y se asocia con riesgo cardiovascular. Además, un estudio previo encontró que el polimorfismo rs1800247 se asoció con hipertensión arterial sistémica; específicamente, los portadores del alelo C tuvieron menor probabilidad de hipertensión en comparación con los portadores del alelo T aún después de ajustar por edad, sexo e IMC (odds ratio (OR) = 0.89, intervalo de confianza (IC) del 95% 0.81-0.97, P = 0.01). Así mismo, se encontró que los portadores del alelo C tuvieron un nivel más bajo de presión arterial diastólica (PAD) ajustado por edad, sexo e IMC en individuos con cifras tensionales elevadas ( $\beta$  = - 0.55, IC 95% - 0.99 a - 0.10, P = 0.02). <sup>31</sup>

No obstante lo anterior, se desconoce hasta el momento si el polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* se asocia con el riesgo de padecer preeclampsia y su severidad, por lo que se plantea la siguiente:

### **Pregunta de investigación**

¿Se asocia el polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* con el riesgo y la severidad de la preeclampsia?

## 1.4 HIPÓTESIS

### Hipótesis de trabajo (H1):

- El genotipo CC del polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* se asocia con menor riesgo y severidad de la preeclampsia.

### Hipótesis nula (H0):

- El genotipo CC del polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* se asocia con mayor riesgo y severidad de la preeclampsia.

## 1.5 OBJETIVOS

### Objetivo General

Analizar la asociación del polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* con el riesgo y la severidad de la preeclampsia.

### Objetivos específicos

- Conocer las características demográficas, obstétricas y antecedentes de preeclampsia.
- Describir las características clínicas-bioquímicas de la preeclampsia (severidad, síndrome de HELLP, eclampsia, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, alanino amino transferasa, aspartato amino transferasa, bilirrubinas, plaquetas).
- Determinar el genotipo de las pacientes (CC, CT, TT) y las controles.
- Evaluar la asociación de los genotipos con la severidad de la preeclampsia y la presión arterial.
- Calcular el equilibrio de Hardy –Weinberg.
- Determinar el OR para preeclampsia según el genotipo.

## CAPÍTULO 2. MATERIAL, PACIENTES Y MÉTODOS

### 2.1 TIPO, DISEÑO Y CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Se realizará un estudio observacional, tipo casos y controles.

### 2.2 POBLACION EN ESTUDIO

Mujeres en edad reproductiva del Hospital de la Mujer Aguascalientes que ingresen al servicio de urgencias con diagnóstico de enfermedad hipertensiva a clasificar.

### 2.3 DESCRIPCION Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

- **Variable independiente:** Genotipos del s1800247; alelos del s1800247.
- **Variable dependiente:** Preeclampsia y grado de severidad.
- **Variables de caracterización:** Edad materna, índice de masa corporal, edad gestacional, estado nutricional, tensión arterial, periodo intergenésico, tabaquismo activo, gestas, preeclampsia en embarazo previo, diabetes gestacional, diabetes pregestacional, sexo de feto, proteinuria.

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO Y CARACTERÍSTICAS DE LA VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE MEDICIÓN
Genotipos	La combinación de los 2 alelos (1 materno y 1 paterno) del rs1800247 ubicado en la posición 156242184..156243317	Cualitativa nominal	CC CT TT	Porcentaje
Alelos	Base púrica o pirimidica presente en la posición 156242184..156243317 del gen BGLAP	Cualitativa nominal	T C	Porcentaje
Preeclampsia	Elevación de las cifras tensionales >140/90 y presencia de proteinuria >30mg/dL.	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Severidad de la preeclampsia	Gravedad de la preeclampsia de acuerdo a los siguientes criterios. No severa: <2 g proteinuria	Cualitativa ordinal	No severa Severa	Porcentaje

	Severa: >2 g proteinuria, o creatinina >1.1 mg/dL			
HELLP	Es una complicación multisistémica del embarazo que se caracteriza por hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y trombocitopenia.	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Eclampsia	Preeclampsia más alteraciones en el estado de alerta o presencia de crisis convulsivas en ausencia de otras causas, posterior a semana 20 o 6 semanas postparto.	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Edad materna	Tiempo cronológico de vida cumplido.	Cuantitativa discreta	N/A	Años
Índice de masa corporal	Relación entre el peso y la altura utilizado para clasificar el peso.	Cuantitativa continua	N/A	Kg/m <sup>2</sup>
Estado nutricional	Clasificación de las pacientes según el IMC	Cualitativa ordinal	Bajo peso: <18.5 Kg/m <sup>2</sup> Peso normal: 18.5–24.9 Kg/m <sup>2</sup>	Porcentaje
Edad gestacional	Semanas de vida intrauterina cumplidas al momento del parto.	Cuantitativa continua	N/A	Semanas
Tensión Arterial	Cantidad de presión que se ejerce en las paredes de las arterias al desplazarse la sangre por ellas	Cuantitativa discreta	N/A	Mm/Hg
Periodo intergenésico	Periodo comprendido desde el nacimiento de un producto a la fecha de última menstruación	Cuantitativa discreta	N/A	Meses
Tabaquismo activo	Inhalación voluntaria de humo de tabaco	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Índice tabáquico	Total de cigarrillos por día x número de años/20 años	Cuantitativa continua	N/A	Número/paquetes/Año
Gestas	Número de embarazos que ha tenido la paciente.	Cuantitativa discreta	N/A	Eventos
Preeclampsia previa	Antecedente personal de preeclampsia	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Diabetes gestacional	Antecedente personal de diabetes gestacional	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Diabetes pregestacional	Antecedente personal de diabetes pregestacional	Cualitativa nominal	Si No	Porcentaje
Proteinuria	Niveles urinarios de proteínas durante la recolección de orina de 24 horas	Cuantitativa continua	N/A	mg/24 horas

## 2.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

### Tipo de muestreo:

- No probabilístico, por conveniencia de casos consecutivos.

### Tamaño de la muestra:

- n=225 casos y n= 91 controles

## 2.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN:

### a) De inclusión

- Pacientes femeninos mayores de 18 años
- Con diagnóstico de preeclampsia (casos) o sin enfermedad hipertensiva del embarazo (controles)
- Que acepten participar en el estudio mediante firma de carta de consentimiento
- Casos: pacientes con preeclampsia, atendidas en el HMA durante el periodo de estudio.
- Controles: pacientes que ingresen para resolución de embarazo, sin antecedentes de preeclampsia, embarazo normoevolutivo.

### b) De no inclusión

- Pacientes con preeclampsia agregada a hipertensión crónica
- Pacientes con hipertensión crónica
- Pacientes con hipertensión gestacional
- Pacientes con diabetes gestacional, DM1 o DM2

### c) De eliminación

- Pacientes con muestra de sangre inadecuada o insuficiente
- Pacientes cuyo material genético sea inadecuado o insuficiente
- Pacientes con información clínica incompleta.

## 2.6 RECOLECCION DE LA INFORMACION

### **Instrumentos**

Se realizó recolección de variables a través de cuestionarios en hojas de Excel en los cuales se ingresaron las mismas; el médico de guardia al detectar el ingreso de una paciente con diagnóstico de enfermedad hipertensiva a clasificar mayor de 18 años se encargó de realizarlo, previa firma de consentimiento informado en el cual se explica la confidencialidad de la información obtenida y los fines de la misma.

### **Logística**

Todas las pacientes ingresaron provenientes del área de urgencias o de consulta externa, siendo ingresadas posteriormente si se detectaron cifras tensionales mayores de 140/90 las cuales fueron corroboradas en al menos 2 ocasiones en ambas extremidades superiores por parte del personal de enfermería, ya sea con baumanómetro digital o de mercurio. En el área de tococirugía se recibieron dichas pacientes las cuales ingresaron con diagnóstico presuntivo de enfermedad hipertensiva a clasificar y pasaron de inmediato a cargo del residente de segundo año; el cual, es el encargado de verificar que se trate de embarazo mayor a 20 semanas. Posteriormente el personal de enfermería realizó una nueva toma de cifras tensionales con un baumanómetro de mercurio, para luego obtener un acceso venoso del cual se obtuvieron 3 tubos de muestra de sangre periférica y 2 tubos extras a las pacientes mayores de 18 años que acepten participar en nuestro protocolo de estudio firmando previamente consentimiento informado, así como una muestra de orina obtenida con sonda de Nelaton y técnica de asepsia. Una vez que se obtuvieron estas muestras, se solicitó un perfil toxémico y las 2 muestras tomadas para el protocolo, fueron llevadas de inmediato al laboratorio, en donde se centrifugaron y separaron en suero y células sanguíneas. El suero obtenido se mantuvo en refrigeración para posteriormente ser trasladado al laboratorio de biología molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes donde se realizaron estudio de PCR.

El residente a cargo proporcionó indicaciones al personal de enfermería donde se especificó la administración de una carga de cristaloides de 300 ml, así como revaloración de cifras tensionales posterior a la misma, reporte de tensión arterial horaria en hoja de enfermería, así como diuresis horaria y control de líquidos.

Posterior a esto el médico residente de cuarto año procedió a llenar el formato de Excel en el cual se encontraban las variables a estudiar. Una vez completadas 6 tomas de cifras tensionales posterior a la carga de cristaloides junto con los estudios de laboratorio se procedió a clasificar la enfermedad hipertensiva, buscando la presencia de cifras tensionales de 140/90 en al menos 2 ocasiones o una cifra aislada de 160/110 mm/Hg, así como presencia de proteinuria (>30mg/dl) en el examen general de orina en ausencia de infección de vías urinarias. Las pacientes que clasificaron como preeclampsia, iniciaron al día siguiente recolección de orina de 24 horas; las pacientes que se descartaron, entraron al grupo de controles.

## **Procedimientos**

### **1. Extracción de ADNg**

Se realizó la extracción de ADN a partir de sangre completa utilizando el método de Miller (Miller et al, 1988) modificado. Se extrajeron 3-5 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA al 10%. Se centrifugó a 5 000 rpm/5min para lograr separar la capa leucocitaria del suero y los eritrocitos, a continuación se transfirieron 600µl de esta capa a un tubo para microcentrífuga de 1.5ml estéril. Se agregó 1 ml de buffer TTS (TrisHCl-Tritón-Sacarosa) y se homogenizó. Enseguida, la muestra se centrifugó a 12 mil rpm/2 min/4°C y se decantó el sobrenadante. El lavado con buffer TTS se repitió hasta que tanto el botón celular como el sobrenadante se observaran hialinos. Decantando el sobrenadante obtenido, se agregaron 570 µl de NaCl 5 mM (homogenizando 2 min sin decantar) + 30 µl de SDS al 10% (homogenizando 15 min sin decantar) + 200 µl de NaCl saturado (homogenizando 20 min sin decantar). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12 mil rpm/25 min/4°C. Simultáneamente,



se prepararon tubos cónicos de 15 ml estériles con 2 ml de etanol absoluto frío; en los que se vertió el sobrenadante obtenido después de los 25 min de centrifugación y se mezcló suavemente, esperando observar una hebra blanquecina de ADN. Se almacenó el tubo a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se transfirió la hebra de ADN con micropipeta a tubo para microcentrifuga de 1.5ml estéril, tratando de eliminar la mayor cantidad de etanol posible. Se lavó con 1.5 ml de etanol al 70%, mezclando por inversión durante 2 min y centrifugando después a 9 mil rpm/10min/4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón a temperatura ambiente. Deshidratado el ADN, se agregaron 300 µl de agua inyectable y se almacenó a -20°C.

## 2. Amplificación por PCR

A partir del ADNg extraído de las diferentes muestras, se realizó una amplificación por PCR de la región del gen *BGLAP* que incluye la región polimórfica para -180 C/T, con base en los primers y las condiciones reportadas por Villafan-Bernal et al. 2014. La secuencia de los primers fueron 5'- CCGCAGCTCCAACCACA -3' para el forward y 5'- CAATAGGGCGAGGAGT -3' para el reverse. La condiciones a las cuales se llevó a cabo la reacción se muestran en tabla 3.

**Tabla 3. Parámetros de los reactivos y condiciones de la amplificación por PCR del segmento de interés del gen BGLAP**

Componentes de la reacción			Condiciones térmicas		
Reactivo	Concentración	Volumen	Etapa de la PCR	Temperatura	Tiempo
Buffer PCR	10x	1.25 µl	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.25 µl	Desnaturalización, hibridación y elongación (30 ciclos)	94°C	30 seg
dNTP's	100 mM	0.5 µl		65°C	
Primers (FWD y REV)	10 µmol	0.15 µl c/u		72°C	
TaqPol	5 U	0.06 µl			
ADN	1ng	1 µl	Extensión final	72°C	2 min
H <sub>2</sub> O	-	8.14 µl			
Volumen total por reacción			Terminación	4°C	∞

La comprobación de la amplificación del fragmento del gen *BGLAP* se realizó a partir de una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 6% (29:1). La corrida electroforética se realiza a 120 V por aproximadamente 2 horas con un marcador de peso molecular de escalera de 50 pb. Se reveló por solución de nitrato de plata.

### 3. Genotipificación por RFLP

De la amplificación por PCR se obtuvo una banda de 253 pb correspondiente a la parte de interés del gen *BGLAP* donde se encuentra el polimorfismo -180 C/T. Se realizó una digestión enzimática con 5 U de la enzima *Hind III* (New England BioLabs, Beverly, MA) durante 60 min a 75°C. El sitio de restricción cohesivo de la enzima *Hind III* es 5'- A|AGCTT▼TTCGA|A -3'; la flecha es la posición -180 en la secuencia del gen. La presencia del alelo polimórfico T crea el sitio de restricción para *Hind III*, por lo cual el amplicón se digiere y genera 2 fragmentos de ADN de 21 y 232 pb. Mientras que la presencia del alelo silvestre C ocasiona que el sitio de corte se pierda y el fragmento no sea digerido, conservando su longitud de 253 pb. Mediante el gel de electroforesis de poliacrilamida al 6%, bajo las mismas condiciones que se mencionan en la sección anterior se pueden observar los fragmentos resultantes y se pueden interpretar los genotipos (Figura 1).

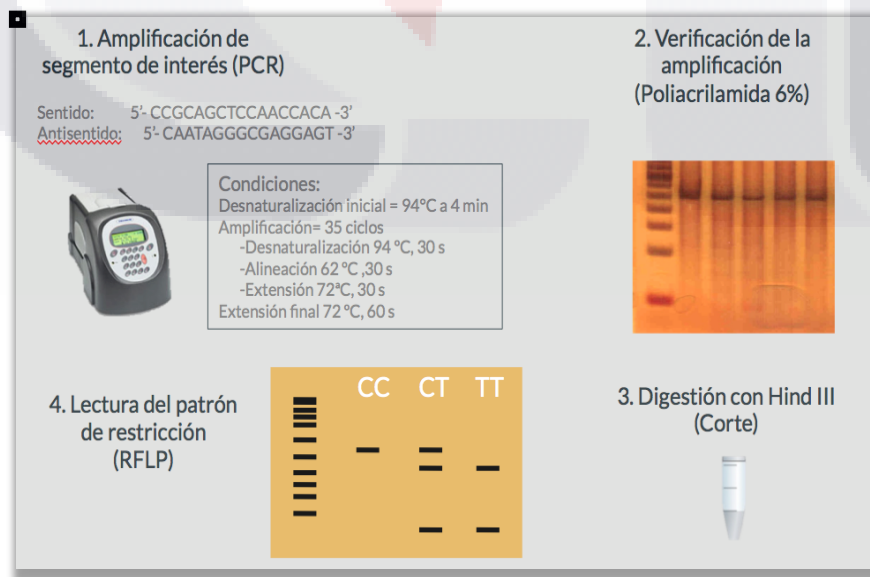
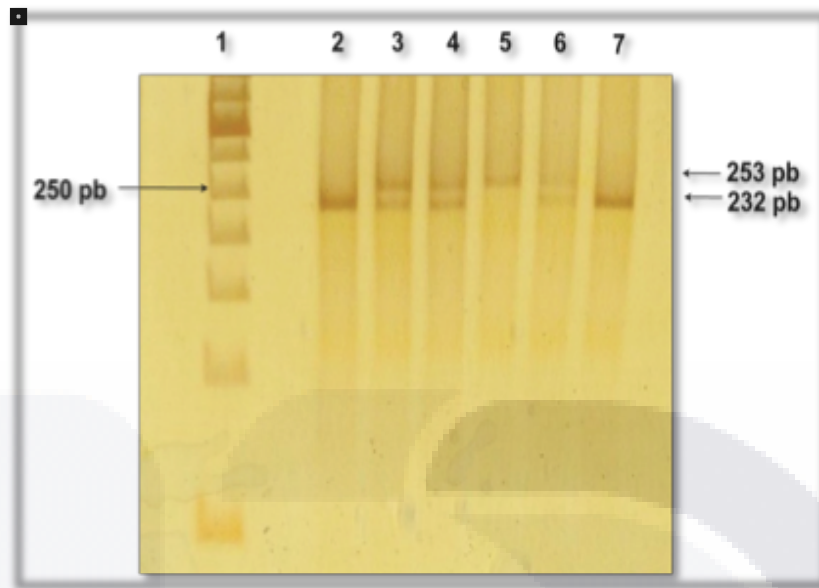


Figura 1. Proceso de genotipificación del polimorfismo rs1800247.



**Figura 2.** Verificación de los fragmentos de interés y genotipos del polimorfismo rs1800247. Gel de poliacrilamida al 6 %, que muestra las bandas esperadas para cada genotipo. Genotipo CC carril 5, genotipo CT carriles 3,4,6 y genotipo TT carriles 2 y 7.

## 2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS v. 25.0 para Mac. El análisis descriptivo consistió en frecuencias y porcentajes para variables cualitativas nominales u ordinales. Para las variables cuantitativas se utilizó la media, la desviación estándar y el rango.

El análisis inferencial se realizó con Chi-cuadrada ( $X^2$ ) para variables cualitativas, específicamente para comparar si existen diferencias significativas en variables cualitativas por genotipos. Para determinar si existen diferencias significativas en variables cuantitativas entre genotipos se utilizó la prueba ANOVA. Una  $p < 0.05$  se consideró significativa.

Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron por conteo directo. El equilibrio Hardy-Weinberg se estimó utilizando la prueba de ajuste  $X^2$ , comparando las frecuencias entre los grupos de casos y controles. Se estimó un Odds ratio (OR) con su correspondiente intervalo de confianza a 95% (IC95%) para determinar la susceptibilidad para preeclampsia por genotipo.

## **2.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Se cuenta con consentimiento informado en donde se plasma que el paciente no pone de ninguna manera en riesgo su salud al proporcionarnos muestras de sangre periférica, el cual deberá estar firmado por testigos y por el mismo paciente con datos completos y legibles con el compromiso de mantener la confidencialidad de los datos. Los procedimientos propuestos están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud clasificándose como riesgo mínimo; así mismo se tomará en cuenta la declaración de Heissinki de 1964 (AMN), enmendada en Tokio en 1975; así mismo se tendrá autorización por el Comité Local de Bioética e Investigación.

## **2.9 RECURSOS PARA EL ESTUDIO**

- Recursos humanos: Personal médico, enfermeras, químicos, pacientes embarazadas o en puerperio.
- Recursos materiales: Hojas de máquina, plumas, computadoras personales, tubos de muestras, refrigeradores, hieleras para adecuado transporte de muestras, vehículo de transporte.

### CAPÍTULO 3. RESULTADOS

#### Comparación de características demográficas, obstétricas y antropométricas entre grupos

Se incluyeron un total de 316 pacientes, 91 casos (con preeclampsia) y 225 controles. Al comparar las características demográficas entre grupos, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad materna, siendo mayor entre las pacientes con preeclampsia que entre los controles ( $25.6 \pm 7.1$  versus  $23.1 \pm 5.5$  años;  $p=0.001$ ). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en características antropométricas ni en obstétricas entre grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de características demográficas y obstétricas entre casos y controles			
Característica	Casos (n=91)	Controles (n=225)	Valor de p
Edad Materna	$25.6 \pm 7.1$	$23.1 \pm 5.5$	0.001
Peso pregestacional	$65.2 \pm 15.3$	$62.9 \pm 13.8$	0.211
Peso al final del embarazo	$76.7 \pm 14.3$	$75.4 \pm 14.5$	0.468
Talla	$1.59 \pm 0.06$	$1.58 \pm 0.07$	0.473
Edad gestacional	$38.1 \pm 2.7$	$38.0 \pm 2.8$	0.611
Gestas	$2.1 \pm 1.2$	$2.1 \pm 1.2$	0.625
Paras	$1.48 \pm 0.9$	$1.74 \pm 1.1$	0.123
Cesáreas previas	$1.45 \pm 0.7$	$1.39 \pm 0.7$	0.582
Abortos	$1.29 \pm 0.7$	$1.21 \pm 0.5$	0.619

#### Comparación de antecedentes de importancia entre grupos

Posteriormente, se evaluaron los antecedentes de importancia entre grupos, encontrando que entre los casos el antecedente de preeclampsia en embarazos previos fue significativamente mayor ( $12.1\%$  versus  $4.9\%$ ;  $p=0.023$ ) y que hubo

mayor porcentaje de mujeres con antecedente de hipertensión en el embarazo actual entre los casos que entre los controles (4.4% versus. 0.4%; p=0.011).

Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en el porcentaje de madres con preeclampsia, de hermanas o abuela con preeclampsia (Tabla 5).

**Tabla 5. Comparación de antecedentes de importancia entre grupos**

Antecedente	Casos (n=91)	Controles (n=225)	Valor de p
Madre de paciente con preeclampsia	7.7(7)	4.0(9)	0.175
Hermana de paciente con preeclampsia	3.3(3)	3.1(7)	1.000
Abuela de paciente con preeclampsia	1.1(1)	0.9(2)	1.000
Preeclampsia en embarazos previos	12.1(11)	4.9(11)	<b>0.023</b>
Diabetes gestacional en embarazos previos	1.1(1)	0.9(2)	1.000
Enfermedad hipertensiva en embarazo actual	4.4(4)	0.4(1)	<b>0.011</b>

**Comparación características clínicas y paraclínicas entre grupos**

Al comparar las características clínicas y paraclínicas entre casos y controles, las pacientes con preeclampsia tuvieron significativamente mayores niveles de presión arterial sistólica y diastólica al ingreso a tococirugía antes y después de una carga inicial de líquidos que se les administra de forma rutinaria 3 mL/Kg de peso (Tabla 6). Así mismo, las pacientes con preeclampsia tuvieron significativamente mayores niveles de ácido úrico (6.1±1.8 versus 4.9±1.6 mg/dL), menores de albúmina (3.1±0.8 versus 3.5±0.6 g/L) y mayores de proteinuria al ingreso (299.3 ± 201.8 versus 149.0±188.7 mg/dL), p<0.05 (Tabla 6).

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en otros parámetros clínicos y bioquímicos entre grupos (Tabla 6).

<b>Tabla 6. Comparación de características clínicas y paraclínicas entre casos y controles</b>			
<b>Característica</b>	<b>Casos (n=91)</b>	<b>Controles (n=225)</b>	<b>Valor de p</b>
N. de cigarros/día	2.75 ± 0.9	5.0 ± 4.4	0.349
Peso estimado	1997.4 ± 879.0	2171.1 ± 1014.1	0.466
Presión sistólica izquierda precarga	156.5 ± 17.0	121.5 ± 18.4	<0.001
Presión sistólica derecha precarga	154.1 ± 19.9	120.5 ± 16.8	<0.001
Presión diastólica izquierda precarga	100.9 ± 14.5	77.4 ± 11.1	<0.001
Presión diastólica derecha precarga	101.4 ± 17.1	79.5 ± 13.4	<0.001
Presión sistólica izquierda postcarga	148.4 ± 19.2	121.3 ± 15.2	<0.001
Presión sistólica derecha postcarga	144.9 ± 20.9	115.2 ± 19.7	<0.001
Presión diastólica izquierda postcarga	97.36 ± 19.7	79.9 ± 19.7	<0.001
Presión diastólica derecha postcarga	93.7 ± 14.0	74.5 ± 10.4	<0.001
Hemoglobina	12.9 ± 1.8	12.6 ± 1.5	0.222
Plaquetas	204.9±80.9	232.9±75.7	0.006
Creatinina	0.70 ± 0.39	0.60 ± 0.24	0.058
Ácido Úrico	6.1 ±1.9	4.9 ±1.6	<0.001
Albúmina	3.1 ± 0.8	3.5 ± 0.7	<b>0.005</b>
DHL	439.9 ± 512.8	466.8 ± 547.7	0.779
TGO	51.0 ± 0.8	41.20 ±119.095	0.739
TGP	43.0 ± 147.7	33.2 ± 83.7	0.662
Bilirrubina total	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.718
Bilirrubina directa	0.2 ± 0.1	0.20 ± 0.1	0.600
Bilirrubina indirecta	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.586
Proteinuria	299.3 ± 201.8	148.9 ± 188.7	<b>0.006</b>

### Frecuencia de genotipos en casos y controles

Posteriormente, se evaluó la frecuencia de cada genotipo entre casos y controles, encontrando que, el alelo T fue el más frecuente y el alelo C fue poco frecuente. Al comparar los genotipos entre casos y controles, el genotipo CC estuvo presente en el 3.4%(n=2) de los casos y en el 1.9% de los controles (n=3; p=0.642), mientras que el genotipo CT estuvo presente en el 13.6% de los casos y en el 17.6% de los controles (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles			
	Casos % (n)	Controles % (n)	Valor de P
<b>Alelo</b>			
T	89.8(106)	89.3(284)	-
C	10.2(12)	10.7(34)	
<b>Genotipos</b>			0.642
CC	3.4 (2)	1.9 (3)	
CT	13.6 (8)	17.6 (28)	
TT	83.1 (49)	80.5 (128)	

### Equilibrio de Hardy –Weinberg

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg, como un indicador de la probabilidad de que la frecuencia genotípica se deba al azar, encontrando que solo el 6.4% podría deberse al azar y que la frecuencia de los genotipos parece ser estable de una generación a otra (Tabla 8), por lo que los resultados podrían ser los mismos de generación a generación.



**Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Genotipos	Observado	Esperado
CC	5	2.4
CT	36	41.1
TT	177	174.4
<b>Var frecuencia alélica:</b>	0.89	218
<b>Valor de Chi- cuadrada</b>	3.41080838	
<b>Valor de P</b>	0.064771	

**OR para preeclampsia según el genotipo**

Posteriormente, se calculó el riesgo para preeclampsia por genotipo considerando como referencia el genotipo TT y como potenciales factores de riesgo o protección los genotipos CT y CC. Esto, se realizó por separado en pacientes con obesidad y con peso normal, dado que se ha encontrado que la osteocalcina se asocia con el IMC y que por sí misma la obesidad es un factor de riesgo para preeclampsia. Se encontró que, en individuos con obesidad, el genotipo CT tendía a asociarse con mayor riesgo de preeclampsia (OR=2.67, IC95% 0.50-14.29). Mientras que, en individuos con peso normal, el genotipo CT se asoció marginalmente con menor riesgo de preeclampsia (OR=0.14, IC95% 0.002-1.100), con un valor de p para la interacción de 0.0085 (Tabla 9).

**Tabla 9. Asociación del rs1800247 con preeclampsia en pacientes con y sin obesidad (n=155)**

Obesidad	Controles	Preeclampsia	OR (95% CI)
T/T	20	10	1.00
C/T	3	4	2.67 (0.50-14.29)
C/C	0	1	---
Sin Obesidad	Controles	Preeclampsia	OR (95% CI)
T/T	67	30	1.00
C/T	16	1	0.14 (0.02-1.10)
C/C	3	0	0.00

Valor de p para la interacción: **0.0085**

Al determinar el riesgo de preeclampsia por genotipo, en presencia o ausencia de obesidad. Se encontró que las portadoras del genotipo CT con peso normal tuvieron significativamente menor riesgo de preeclampsia OR=0.05 (IC95% 0.00-0.58,  $p < 0.001$ ). (Tabla 10).

**Tabla 10. Riesgo de preeclampsia por genotipo en pacientes con y normopeso (n=155)**

T/T	Controles		Preeclampsia	OR (95% CI) para preeclampsia
	O	20	10	1.00 (Ref)
N	67	30	0.90 (0.37-2.14)	
C/T	Controles		Preeclampsia	OR (95% CI) para preeclampsia
	O	3	4	1.00 (Ref)
N	16	1	0.05 (0.00-0.58)	
C/C	Controles		Preeclampsia	OR (95% CI) para preeclampsia
	O	0	1	1.00 (Ref)
N	3	0	0.00 (x-x)	

Valor de p para la interacción: 0.0022

O=obesidad; N=normopeso

### Comparación de parámetros clínicos y bioquímicos por genotipo en pacientes con peso normal

Dado que el alelo C es protector en pacientes con peso normal, se compararon los parámetros clínicos y bioquímicos por genotipos CC+CT versus TT para determinar si existían diferencias significativas entre pacientes con y sin estos alelos, encontrando que las portadoras de 1 o 2 alelos C (CC ó CT) tuvieron significativamente menores niveles de presión arterial sistólica, y presión arterial diastólica que las portadoras del alelo T (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de parámetros clínicos y bioquímicos por alelo/genotipo			
Característica	CC+CT (media ± DS) n=	TT (media ± DS) n=	Valor de p
Presión sistólica izquierda precarga	129.1 ± 20.1	137.1 ± 25.0	0.182
Presión sistólica derecha precarga	125.6 ± 20.2	134.2 ± 26.5	0.168
Presión diastólica derecha precarga	82.4 ± 12.0	90.00 ± 19.3	<b>0.059</b>
Presión diastólica izquierda precarga	79.8 ± 12.9	88.11 ± 16.5	<b>0.038</b>
Presión sistólica izquierda postcarga	118.3 ± 14.3	133.9 ± 23.6	<b>0.003</b>
Presión sistólica derecha postcarga	116.8 ± 20.7	128.5 ± 23.8	<b>0.074</b>
Presión diastólica izquierda postcarga	77.5 ± 12.4	91.1 ± 27.9	<b>0.011</b>
Presión diastólica derecha postcarga	75.56 ± 11.015	85.6 ± 16.9	<b>0.010</b>
Hemoglobina	12.8 ± 1.2	12.6 ± 1.8	0.554
Plaquetas	226.8 ± 86.3	214.1 ± 77.4	0.599
Creatinina	1.00 ± 0.6	0.6 ± 0.3	0.175
Ácido Úrico	4.92 ± 0.833	5.90 ± 1.762	<b>0.055</b>
Albúmina	3.34 ± 0.605	3.18 ± 1.178	0.605
DHL	366.7 ± 172.7	577.5 ± 868.7	0.227
TGO	23.5 ± 5.7	86.3 ± 320.0	0.308
TGP	37.9 ± 48.3	76.2 ± 247.5	0.443

<b>Bilirrubina total</b>	0.36 ± 0.19	0.46 ± 0.6	0.461
<b>Bilirrubina directa</b>	0.15 ± 0.11	0.19 ± 0.15	0.560
<b>Bilirrubina indirecta</b>	0.21 ± 0.1	0.28 ± 0.5	0.509
<b>Proteinuria</b>	300.0 ± 190.3	416.2 ± 173.1	0.262



## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se analizó la asociación del polimorfismo rs1800247 del gen BGLAP con el riesgo y la severidad de la preeclampsia, encontrando diversos hallazgos que merecen discusión.

En primer lugar, los casos tenían mayor edad que los controles. De hecho, la edad es considerado un factor de riesgo previamente conocido para preeclampsia íntimamente relacionado con múltiples complicaciones y comorbilidades en la mujer embarazada. Varios estudios han examinado la asociación entre la edad materna avanzada y la presencia de resultados adversos del embarazo, dentro de los cuales se incluyen aborto espontáneo, muerte fetal, preeclampsia, diabetes gestacional, parto prematuro, entre otros. Khalil y cols. estudiaron la relación de la edad materna con las complicaciones previamente comentadas y concluyeron que la edad materna debe combinarse con otras características maternas y antecedentes obstétricos al calcular un riesgo individualizado ajustado de complicaciones adversas del embarazo. Además, encontraron que la edad materna avanzada es un factor de riesgo para preeclampsia y parto por cesárea, entre otros <sup>32</sup>. Por su parte Lamminpää y cols. observaron que las mujeres de edad materna avanzada presentaron preeclampsia en un porcentaje mayor que las mujeres jóvenes (9,4% vs 6,4%), tuvieron una mayor cantidad de partos pretérmino y fueron más propensas a tener un índice de masa corporal  $> 25$ , así como una mayor incidencia de diabetes gestacional e hipertensión arterial crónica. Concluyeron que las mujeres con edad materna avanzada tenían 1,5 veces más probabilidades de tener preeclampsia en comparación con las mujeres menores de 35 años. Sin embargo, el principal hallazgo del presente estudio fue que entre las mujeres preeclámpicas, los resultados adversos del embarazo fueron más comunes en las mujeres con edad materna avanzada. En otras palabras, la edad materna parecía ser un factor de riesgo obstétrico independiente para el inicio temprano de preeclampsia y el crecimiento fetal alterado <sup>33</sup>. Aun no existen estudios que confirmen esta asociación pero se cree que el mecanismo detrás de este riesgo, puede estar relacionado con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

el envejecimiento de los vasos sanguíneos uterinos <sup>34</sup>. Durante nuestro estudio se encontró que las pacientes con preeclampsia presentan una edad materna mayor que las pacientes control, sin embargo, en promedio la edad de las pacientes con preeclampsia no se encuentra dentro de los parámetros internacionales de edad materna avanzada, aun así, se observó mayor prevalencia. Lo anterior podría hablarnos de la importancia que tiene la interacción de otros factores de riesgo (peso, comorbilidades) para el desarrollo de la enfermedad, lo cual es mencionado por otros autores.

En segundo lugar, el antecedente de preeclampsia en embarazos previos fue significativamente mayor entre los casos y hubo mayor porcentaje de mujeres con antecedente de hipertensión en el embarazo actual. En este sentido, Hernández y cols., realizaron un gran estudio en 763,795 mujeres embarazadas en el que demostraron que el riesgo de preeclampsia fue de 4.1% en el primer embarazo y 1.7% en embarazos posteriores en general. Sin embargo, el riesgo fue del 14.7% en el segundo embarazo para las mujeres con antecedentes de preeclampsia en su primer embarazo y del 31.9% para las mujeres que tuvieron preeclampsia en los dos embarazos anteriores. El riesgo de preeclampsia para mujeres embarazadas sin antecedentes de preeclampsia fue del 1.1%. <sup>35</sup>. En este sentido, nuestro estudio es similar a lo encontrado por Hernández y cols.

En tercer lugar, las pacientes con preeclampsia, como se esperaba tuvieron significativamente mayores niveles de ácido úrico y proteinuria al ingreso, así como menores niveles de albúmina. En la preeclampsia, los niveles de ácido úrico están constantemente elevados, aunque las razones de tal elevación se entienden de manera incompleta. Claramente, la disminución de la filtración glomerular, el aumento de la resorción y la reducción de la secreción en el túbulo proximal juegan un papel importante; sin embargo, estas adaptaciones renales no pueden explicar completamente el grado de hiperuricemia, y otros mecanismos, como la isquemia placentaria, el daño tisular y el estrés oxidativo, los cuales parecen estar involucrados pero aún no están demostrados <sup>36</sup>. Bainbridge y cols. demostraron,

haciendo uso de una monocapa de células endoteliales microvasculares uterinas en un modelo de co-cultivo trofoblasto-endotelial que el ácido úrico, de manera dependiente de la concentración, fue capaz de atenuar la invasión del trofoblasto <sup>37</sup>. En otro estudio, Mulla y cols., observaron que las células trofoblásticas aisladas en primer trimestre del embarazo exhibieron secreción aumentada de IL-1 $\beta$ , cuando se incubaron con ácido úrico, lo que sugiere que el ácido úrico activa el inflammasoma <sup>38</sup>. Una revisión sistemática sobre el ácido úrico y preeclampsia realizada por Thangaratinam y cols. encontró que, el ácido úrico sérico es un mal predictor de complicaciones maternas y fetales en mujeres con preeclampsia <sup>39</sup>. Sin embargo, Hawkins y cols., en un estudio posterior concluyeron que el riesgo de resultado materno adverso y el resultado fetal adverso aumentó con el aumento de la concentración de ácido úrico y tensión arterial elevada, no exclusivamente en la preeclampsia. En las mujeres con hipertensión gestacional, la hiperuricemia corregida en la gestación se asoció con un mayor riesgo de parto pretérmino, pero no con resultado materno adverso. En toda la cohorte de mujeres embarazadas hipertensas (aquellas con preeclampsia o hipertensión gestacional) el riesgo de resultados maternos adversos y resultados fetales adversos aumentó concordantemente con una elevación en los valores de ácido úrico <sup>40</sup>. Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran concordancia con la literatura, encontrando claramente valores en promedio más elevados de ácido úrico en aquellas pacientes con preeclampsia en comparación a los controles; cabe destacar que el promedio de ácido úrico en las pacientes con preeclampsia del estudio, se encuentra fuera de los parámetros normales establecidos para embarazadas, los cuales son considerados como hiperuricemia.

En relación a la proteinuria Maynard y cols., demostraron que el aumento de sFlt1 circulante en pacientes con preeclampsia está asociado con una disminución de los niveles circulantes de VEGF y PlGF libres, lo que resulta en una disfunción endotelial in vitro que puede ser rescatada por VEGF y PlGF exógenos. Además, la administración de sFlt1 a ratas preñadas induce hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular, la lesión clásica de la preeclampsia. Estas observaciones

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sugieren que el exceso de sFlt1 circulante contribuye a la patogénesis de la preeclampsia y al grado de proteinuria <sup>41</sup>. Otro de los parámetros estadística significativos fue el valor de proteinuria el cual se encuentra en un valor promedio representativamente más alto en relación a lo encontrado en las pacientes control, demostrando la importancia de dicho parámetro para el diagnóstico la preeclampsia.

La hipoalbuminemia ha sido considerada un parámetro de importancia en el estudio de la preeclampsia. Aditiawarman estudió el papel de la albúmina y el estrés del retículo endoplásmico en la patogénesis de la preeclampsia y la relación de la albúmina con los cambios de GRP78 y VEGF placentario. Encontró que la hipoalbuminemia fue un factor estresante que indujo la respuesta endoplásmica del retículo al aumentar el GRP78, disminuyendo el VEGF placentario. Las respuestas del estrés del retículo endoplásmico dependen de los niveles de estresor (albúmina) y de la proteína de respuesta al estrés (GRP78) <sup>42</sup>. En este trabajo se observó que aquellas pacientes con preeclampsia presentaron niveles más bajos de albúmina en comparación con las pacientes control, lo que concuerda con lo encontrado en estudios previos.

En relación con la asociación del polimorfismo rs1800247 del gen *BGLAP* con el riesgo y la severidad de la preeclampsia, encontramos que: i) En individuos con peso normal, el genotipo CT se asoció marginalmente con menor riesgo de preeclampsia; ii) que las portadoras del genotipo CT con normopeso tuvieron significativamente menor riesgo de preeclampsia; y que las portadoras de 1 o 2 alelos C (CC ó CT) tuvieron significativamente menores niveles de presión arterial sistólica, y presión arterial diastólica que las portadoras del alelo T. Lo cual demuestra una clara asociación del rs1800247 del gen *BGLAP* con menor riesgo y severidad de la preeclampsia.

El rs1800247 es el polimorfismo de nucleótido sencillo más ampliamente conocido y estudiado del gen *BGLAP*. Solo un estudio previo ha reportado una asociación



directa de este polimorfismo con hipertensión arterial, pero no con preeclampsia en una población china <sup>31</sup>. En tal estudio, Ling et al. evaluaron la asociación del rs1800247 con hipertensión y rasgos relacionados en una cohorte de 5647 participantes. Encontraron que los portadores del alelo C tuvieron una disminución del 11% en el riesgo de hipertensión en comparación con los portadores del alelo T. En el modelo codominante, los portadores del genotipo CC tenían un 20% menos de riesgo de hipertensión en comparación con los portadores del genotipo TT. Además, los portadores del alelo C se asociaron con un nivel más bajo de presión arterial diastólica en la población total, en individuos con cifras tensionales normales e hipertensos recién diagnosticados <sup>31</sup>. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se observó que las portadoras de 1 o 2 alelos C (CC ó CT) con IMC normal pre-gestacional tuvieron significativamente menores niveles de presión arterial sistólica, y presión arterial diastólica respecto a las portadoras del alelo T. También, en concordancia con lo reportado por Ling y cols. encontramos que las portadoras del genotipo CT tuvieron marginalmente menor riesgo de preeclampsia (OR=0.14, IC95% 0.002-1.100) y que las portadoras del genotipo CT con peso normal tuvieron significativamente menor riesgo de preeclampsia OR=0.05 (IC95% 0.00-0.58, p<0.001).

A pesar de que el trabajo de Ling et al. <sup>31</sup>, fue el primero en describir una asociación entre la hipertensión y el rs1800247; este estudio, en nuestro conocimiento, es el primero en asociar este polimorfismo con el riesgo a preeclampsia y las cifras tensionales en pacientes con preeclampsia. Sin embargo, cómo esta variante influye en el inicio y la progresión de la hipertensión, característica en los pacientes con preeclampsia, no está claro.

Debido a que este polimorfismo se encuentra en la región reguladora del gen y genera un cambio de nucleótidos de timina por citosina, posee una funcionalidad potencial y podría alterar la expresión génica, modificando las concentraciones séricas de osteocalcina <sup>31</sup>. Estudios previos han analizado la asociación del rs1800247 con los niveles circulantes de osteocalcina, pero los resultados fueron

contradictorios <sup>43-45</sup>. Como la relación inversa entre las concentraciones de osteocalcina y los niveles de presión arterial <sup>46-50</sup> la asociación del polimorfismo con hipertensión podría estar mediada por su efecto sobre la expresión de osteocalcina. Sin embargo se requieren futuros estudios funcionales para demostrar el papel regulador de rs1800247 en la expresión génica. También es posible que esta variante esté relacionada con uno o más polimorfismos funcionales dentro del gen de la osteocalcina, por lo que mostró asociación con la hipertensión como marcador de esas variantes funcionales.

Las fortalezas de este estudio se centran en la primicia de la asociación del rs1800247 con el riesgo a preeclampsia y las cifras tensionales en pacientes con preeclampsia, así como las mediciones demográficas, de antecedentes, clínicas y bioquímicas completas de los pacientes. Por otro lado, algunas limitaciones también deben abordarse. Una de ellas corresponde al reducido tamaño de la muestra. Además no se logró genotipificar a todos los participantes, por lo cual reconocemos la posibilidad de sesgo de selección. Además, se requiere incrementar el número de muestra y la cantidad de participantes genotipificados en este estudio y se necesitan estudios de replicación en otras poblaciones para confirmar nuestras observaciones.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En la totalidad de pacientes no se encontró asociación significativa del polimorfismo rs1800247 con el riesgo y la severidad de la preeclampsia. Sin embargo, se encontró una interacción significativa de la obesidad con los genotipos.

Específicamente, en pacientes con IMC normal pregestacional la presencia de uno dos alelos C, confiere protección para el desarrollo de preeclampsia y se asocia con menores cifras de presión arterial sistólica y diastólica. Por lo que, este polimorfismo parece tener trascendencia como un factor protector para preeclampsia en mujeres con IMC normal pregestacional, lo que pudiese implicar que sea un marcador protector en mujeres con IMC normal antes del embarazo.

Se recomienda una valoración prospectiva de los presentes hallazgos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría de Salud. Atención integral de la preeclampsia en el segundo y tercer niveles de atención. (2008).
2. Secretaría de Salud. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la Preeclampsia en segundo y tercer nivel de atención. 09/03/2017.
3. Poon, L. C. *et al.* The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 145, 1–33 (2019).
4. Abalos, E. *et al.* Pre-eclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG* 121 Suppl, 14–24 (2014).
5. Say, L. *et al.* Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. *Lancet Glob. Heal.* 2, 323–333 (2014).
6. ACOG. Clinical Management Guidelines for Obstetrician – Gynecologists. *Obstet. Gynecol.* 133, 168–186 (2019).
7. Hutcheon, J. A., Lisonkova, S. & Joseph, K. S. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 391–403 (2011).
8. De Jesús-García, A. *et al.* Características clínicas, epidemiológicas y riesgo obstétrico de las pacientes con preeclampsia-eclampsia TT - Clinical, epidemiological and obstetric risk characteristics of patients with preeclampsia-eclampsia. *Rev. enferm. Inst. Mex. Seguro Soc* 26, 256–262 (2018).
9. INEGI. “Estadísticas a propósito del día de la madre” datos nacionales. [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/%0Daproposito/2016/madre2016\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/%0Daproposito/2016/madre2016_0.pdf).
10. Magee, L. A., Pels, A., Helewa, M., Rey, E. & von Dadelszen, P. Canadian Hypertensive Disorders of Pregnancy Working G. Diagnosis, evaluation, and

- management of the hypertensive disorders of pregnancy. *Pregnancy Hypertens.* 4, 105–145 (2014).
11. BGLAP bone gamma-carboxyglutamate protein [ Homo sapiens (human) ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/632>.
  12. Diaz-Franco, M. C., Franco-Diaz de Leon, R. & Villafan-Bernal, J. R. Osteocalcin-GPRC6A: An update of its clinical and biological multi-organic interactions (Review). *Mol. Med. Rep.* 19, 15–22 (2019).
  13. García-Martín, A., Reyes-García, R., Ávila-Rubio, V. & Muñoz-Torres, M. Osteocalcina: Nexo de unión entre homeostasis ósea y metabolismo energético. *Endocrinol. y Nutr.* 60, 260–263 (2013).
  14. Mera, P., Laue, K., Wei, J., Berger, J. M. & Karsenty, G. Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. *Mol. Metab.* 5, 1042–1047 (2016).
  15. Pi, M. *et al.* Evidence for osteocalcin binding and activation of GPRC6A in  $\beta$ -cells. *Endocrinology* 157, 1866–1880 (2016).
  16. Otani, T. *et al.* Signaling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cell. Signal.* 27, 532–544 (2015).
  17. Mera, P. *et al.* Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 23, 1078–1092 (2016).
  18. Karsenty, G. & Oury, F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 521–526 (2014).
  19. Idelevich, A., Rais, Y. & Monsonego-Ornan, E. Bone Gla protein increases HIF-1 $\alpha$ -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, (2011).
  20. Yoder, M. C. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, (2012).
  21. Dhore, C. R. *et al.* Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1998–

- 2003 (2001).
22. Kanazawa, I., Yamaguchi, T. & Sugimoto, T. Relationship between bone biochemical markers versus glucose/lipid metabolism and atherosclerosis; a longitudinal study in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 92, 393–399 (2011).
  23. Namba, S. *et al.* Effects on bone metabolism markers and arterial stiffness by switching to rivaroxaban from warfarin in patients with atrial fibrillation. *Heart Vessels* 32, 977–982 (2017).
  24. Millar, S. A., Patel, H., Anderson, S. I., England, T. J. & O’Sullivan, S. E. Osteocalcin, vascular calcification, and atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, (2017).
  25. Namgung, R. & Tsang, R. C. Bone in the pregnant mother and newborn at birth. *Clin. Chim. Acta* 333, 1–11 (2003).
  26. Ulrich, U. *et al.* Bone remodeling and bone mineral density during pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.* 268, 309–316 (2003).
  27. Briana, D. D., Boutsikou, M., Boutsikou, T. & Malamitsi-Puchner, A. Relationships between maternal novel adipocytokines and bone biomarkers in complicated by gestational hypertensive disorders and normal pregnancies. *J. Matern. Neonatal Med.* 26, 1219–1222 (2013).
  28. Kumtepe, Y., Aksoy, H. & Ingec, M. Bone turnover in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 88, 323–324 (2005).
  29. Sowers, M., Scholl, T., Grewal, J., Chen, X. & Jannausch, M. IGF-I, osteocalcin, and bone change in pregnant normotensive and pre-eclamptic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5898–5903 (2001).
  30. Kar, M. Role of biomarkers in early detection of preeclampsia. *J. Clin. Diagnostic Res.* 8, 1–5 (2014).
  31. Ling, Y. *et al.* ORIGINAL ARTICLE A common polymorphism rs1800247 in osteocalcin gene is associated with hypertension and diastolic blood pressure

- levels : the Shanghai Changfeng study. 1–6 (2016) doi:10.1038/jhh.2016.16.
32. Khalil, A., Syngelaki, A., Maiz, N., Zinevich, Y. & Nicolaides, K. H. Maternal age and adverse pregnancy outcome: A cohort study. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 42, 634–643 (2013).
  33. Lamminpää, R., Vehviläinen-Julkunen, K., Gissler, M. & Heinonen, S. Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008. *BMC Pregnancy Childbirth* 12, 2–6 (2012).
  34. Carolan, M. The graying of the obstetric population: implications for the older mother. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* 32, 19–27 (2003).
  35. Hernández-Díaz, S., Toh, S. & Cnattingius, S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: Prospective cohort study. *BMJ* 339, 34 (2009).
  36. Bellomo, G. Serum uric acid and pre-eclampsia: An update. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 10, 701–705 (2012).
  37. Bainbridge, S. A. *et al.* Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 297, 440–451 (2009).
  38. Mulla, M. J. *et al.* Uric Acid Induces Trophoblast IL-1 $\beta$  Production Via the Inflammasome: Implications for the Pathogenesis of Preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 542–548 (2011).
  39. Thangaratinam, S., Ismail, K. M. K., Sharp, S., Coomarasamy, A. & Khan, K. S. Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pre-eclampsia: A systematic review. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113, 369–378 (2006).
  40. Hawkins, T. L. A. *et al.* Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: A retrospective cohort study. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 119, 484–492 (2012).
  41. Maynard, S. E. *et al.* Excess placental soluble fms-like. *Methods* 111, 649–658 (2003).

42. Aditiawarman. The role of albumin and endoplasmic reticulum in pathogenesis Preeclampsia. Changes of GRP78 and placental VEGF in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens. An Int. J. Women's Cardiovasc. Heal.* 4, 247 (2014).
43. Kim, J. G. *et al.* Relationship of osteocalcin and matrix Gla protein gene polymorphisms to serum osteocalcin levels and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Menopause* 13, 467–473 (2006).
44. McGuigan, F. *et al.* Osteocalcin gene polymorphisms influence concentration of serum osteocalcin and enhance fracture identification. *J. Bone Miner. Res.* 25, 1392–1399 (2010).
45. Sowers, M. F. *et al.* Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1411–1419 (1999).
46. Polgreen, L. E. *et al.* Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity* 20, 2194–2201 (2012).
47. Chen, L. *et al.* Osteocalcin, glucose metabolism, lipid profile and chronic low-grade inflammation in middle-aged and elderly Chinese. *Diabet. Med.* 30, 309–317 (2013).
48. Tan, A. *et al.* Low serum osteocalcin level is a potential marker for metabolic syndrome: Results from a Chinese male population survey. *Metabolism.* 60, 1186–1192 (2011).
49. Bae, S. J. *et al.* The association between serum osteocalcin levels and metabolic syndrome in Koreans. *Osteoporos. Int.* 22, 2837–2846 (2011).
50. Oosterwerff, M. M., Van Schoor, N. M., Lips, P. & Eekhoff, E. M. W. Osteocalcin as a predictor of the metabolic syndrome in older persons: A population-based study. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 78, 242–247 (2013).



**ANEXOS**

**Hoja de captura de datos**

**Datos de identificación**

Procedencia	Nombre	Apellido Paterno	Apellido materno	Fecha de inclusión
-------------	--------	------------------	------------------	--------------------

**Socio demográficos y Antropométricos**

Edad materna	Estado de origen	Teléfono	Pertenece a alguna etnia	Peso	Talla
--------------	------------------	----------	--------------------------	------	-------

**Obstétricos y personales patológicos**

Edad gestacional	Duración último período intergenesico	Fumadora No. Cigarros/ día	Madre con preeclampsia	Gestas	Parto
Cesáreas	Abortos	Óbito	Preeclampsia en embarazo previo	DG en embarazo previo	DM1
DM2	DG actual	Trombofilias	Nefropatía	Enfermedades autoinmunes	Otros

**Ecografía de segundo trimestre**

Edad gestacional	Peso estimado	Sexo del feto	Líquido amniótico Pool mayor	Grosor de placenta
------------------	---------------	---------------	------------------------------	--------------------

**Ecografía de tercer trimestre**

Edad gestacional	Peso estimado	Sexo del feto	Líquido amniótico Pool mayor	Grosor de placenta
DBP mm	CC mm	CA mm	FL mm	

**Características de preeclampsia**

Sistólica 1 al diagnostico	Sistólica 2 al diagnostico	Diastólica 1 al diagnostico	Diastólica 2 al diagnostico	Cefalea
Acufenos	Fosfenos	Epigastralgia	Edema	Reflejos
Hemoglobina	Plaquetas	Creatinina	Ácido Úrico	Albumina
DHL	TGO	TGP	BT	BI

BD	Proteinuria en tira de orina	Proteinuria 24 horas.	HELLP	Preeclampsia sin criterios de severidad
Preeclampsia con criterios de severidad	Eclampsia	UCIO	Días estancia en UCIO	Días hospitalización.
Muerte materna	Causa de muerte materna	Otras complicaciones.		



**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

<b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	
<b>Nombre del estudio</b>	<b>Asociación del polimorfismo rs1800247 del gen <i>BGLAP</i> con el riesgo y severidad de la preeclampsia en pacientes del Hospital de la Mujer Aguascalientes</b>
<b>Lugar y fecha</b>	Aguascalientes, Aguascalientes ___ de ___ de 201_.
<b>Justificación y objetivo del estudio</b>	La realización del presente estudio contribuirá a estudiar si el polimorfismo de interés en el gen <i>BGLAP</i> es un factor genético de susceptibilidad para preeclampsia y/o se asocia con la severidad de la enfermedad. En caso de resultar asociado a esto, se podría incluir como un marcador que ayude a conocer el pronóstico de las pacientes y/o que forme parte de los modelos actuales de predicción de la enfermedad.
<b>Procedimientos</b>	Su participación consistirá en contestar algunas preguntas, permitir que se le tome la presión, donar una muestra de sangre en tubo rojo y morado así como una muestra de orina. Posteriormente se extraerá el suero de dichas muestras de sangre para Extracción de ADNg, Amplificación por PCR, Genotipificación por RFLP
<b>Posibles riesgos y molestias</b>	Usted no experimentará alguna molestia al ser entrevistado, solamente tendrá dolor en el sitio de punción, para la extracción de sangre de su vena.
<b>Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio</b>	Ya que la preeclampsia es una de las entidades patológicas que más frecuentemente se presentan en la embarazada, si el marcador genético de interés es útil como pronóstico o factor de riesgo, todas aquellas pacientes con embarazo se podrían beneficiar de la genotipificación de la variante de interés durante los primeros trimestres del embarazo, o incluso antes de lograr un embarazo.
<b>Información sobre resultados y alternativas de tratamiento</b>	No se entregarán resultados por escrito, pero si se le detecta algún problema se le ofrecerán opciones de tratamiento y se le acompañará durante el mismo.
<b>Participación o retiro</b>	El paciente conserva su derecho a seguir participando en el estudio o a retirarse del mismo en cualquier momento que lo desee o considere conveniente, sin repercusión alguna sobre la atención médica brindada por el centro de salud.
<b>Privacidad y confidencialidad</b>	Todos los datos obtenidos en el estudio serán guardados en la más estricta privacidad y manejados en forma totalmente confidencial.
<b>Colaboradores:</b>	José Rafael Villafán Bernal; Francisco Javier Serna Vela.
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante o sobre el proyecto podrá dirigirse con Dr. José Rafael Villafán Bernal: jrwillafan@correo.uaa.mx o Dr. Francisco Javier Serna Vela. Correo electrónico: serna@issea.gob.mx	
Nombre y firma del <b>paciente</b> que participa en el estudio	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
Nombre, relación y firma	Nombre, relación y firma