



HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN
MUESTRAS DE PLACENTA DE PACIENTES CON
PREECLAMPSIA DEL HOSPITAL DE LA MUJER
AGUASCALIENTES**

TESIS

PRESENTADA POR

Ana Isabel Leyva González

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

ASESOR (ES)

**Dr. Leopoldo Cesar Serrano Díaz
Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales
Dra. Martha Hernández Muñoz**

Aguascalientes, Ags., Febrero del 2021



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO - ESPECIALIDADES MÉDICAS



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 21/01/21

NOMBRE: ANA ISABEL LEYVA GONZÁLEZ ID 8 7 7 1 0

ESPECIALIDAD: GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA LGAC (del posgrado): Embarazos de alto riesgo

TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo práctico

TÍTULO: RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN MUESTRAS DE PLACENTA DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA DEL HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS QUE A LARGO PLAZO PUEDAN REDUCIR COMPLICACIONES DEL EMBARAZO

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las USAC de la especialidad médica
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- NO Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
- SI Cumpe con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estanda, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- SI Cuenta con la aprobación del (la) Jefe de Enseñanza y/o Hospital
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- NO Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos Institucionales

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí x
No

FIRMAS

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Ricardo Ernesto Ramírez Orozco

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Dr. Jorge Prieto Macías

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 109C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 109F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES

**RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN MUESTRAS DE
PLACENTA DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA DEL HOSPITAL DE LA
MUJER DE AGUASCALIENTES**



DR. LEOPOLDO CÉSAR SERRANO DÍAZ
DIRECTOR DEL HOSPITAL DE LA MUJER DE AGUASCALIENTES



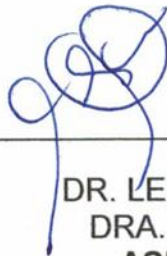
DRA. MARTHA HERNÁNDEZ MUÑOZ
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN



DRA. MARIA DEL CONSUELO ROBLES MARTÍNEZ
PROFESORA TITULAR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN



DR. EDUARDO EMMANUEL VALDEZ MORALES
ASESOR METODOLÓGICO DE TESIS



DR. LEOPOLDO CÉSAR SERRANO DÍAZ
DRA. MARTHA HERNANDEZ MUÑOZ
ASESORES CLÍNICOS DE TESIS





ISSEA
SECRETARÍA DE
SALUD DEL ESTADO
DE AGUASCALIENTES

Contigo al 100

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN

AGUASCALIENTES, AGS. 11 DE NOVIEMBRE DEL 2020.

A QUIEN CORRESPONDA:

EL COMITÉ ESTATAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, BASADO EN LOS ESTATUTOS CONTENIDOS EN EL MANUAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, HA TENIDO A BIEN REVISAR EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN INTITULADO.

“RESPUESTA A PROTEINAS MAL CONFORMADAS EN MUESTRAS DE PLACENTAS DE PACIENTES CON PREECLAMPSIA DEL HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES”

OTORGANDO EL DICTAMEN DE “ACEPTADO” NÚMERO DE REGISTRO: 07 ISSEA-020/07

INVESTIGADOR (S) DE PROYECTO:

Ana Isabel Leyva Gutierrez.

LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN:

Hospital de la mujer.

TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Obtención de grado de Especialidad en Ginecología y Obstetricia.

ASESOR DE TESIS:

Dr. Leopoldo Cesar Serrano Díaz, Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales, Dra. Martha Hernández Muñoz.

ESPERANDO QUE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN REDUNDE EN BENEFICIO A NUESTRA POBLACIÓN, QUEDAMOS A SUS ÓRDENES.

ATENTAMENTE:


DR. JAVIER GÓNGORA ORTEGA
SECRETARIO TÉCNICO
C.C.P.- ARCHIVO



UNIDAD
DE INVESTIGACION
EN SALUD

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Hospital de la Mujer de Aguascalientes, por haber sido mi segunda casa dentro de estos cuatro años de residencia médica, por todas las enseñanzas y experiencia que me ha brindado.

De igual manera, a mi alma mater, la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a la cual le agradezco mi educación, al ser mi casa de estudios desde el bachillerato hasta mi post grado.

De manera muy especial quiero agradecer al doctor Leopoldo César Serrano Díaz, por ser un pilar en mi formación, por tanto cariño y apoyo incondicional, gracias por ser siempre un ejemplo como médico y persona, por compartir conmigo todo su conocimiento, por brindarme siempre una palabra de aliento, pero sobre todo por brindarme su amistad.

Agradezco a todos mis médicos adscritos del Hospital de la Mujer, a la doctora Martha Hernández Muñoz, doctora Consuelo Robles Martínez, doctor Daniel Ely Bravo Aguirre, doctor Antonino Arturo Colón Muñoz, doctor Humberto Mejía Guardado, doctor Luis Antonio Chávez Barba, doctor Ezequiel Sotelo, doctora Hilda Vázquez, doctor Jaime Reyna, doctor Moisés Aguilar Tafolla, doctora Mayela Cuesta Galindo, doctora Patricia Guzmán Ángeles, doctor Luis Miguel Rostro, doctora Claudia Cumplido Mier, doctor Roberto Franco, doctor Sergio Alfredo Ramos Pérez, por haber sido una guía en este camino, por compartir su experiencia y conocimientos en mi preparación. Quiero agradecer por todo su tiempo y paciencia, al doctor Ricardo Javier Vargas Macías y al doctor César Arturo Sánchez Calderón, por brindarme no solo sus conocimientos, sino también su amistad y la oportunidad de poder trabajar a su lado.

Agradezco al doctor Eduardo Emmanuel Vázquez, por todo su tiempo y paciencia hacia mi persona en la elaboración de esta tesis, por resolver todas mis dudas y su amabilidad en cada corrección.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

A mi madre, María Guadalupe Reyes Escamilla, por acompañarme en cada paso que he dado en mi vida, por tanto amor y paciencia, gracias por estar a mi lado desde el cielo, cada día te tuve en mi mente y fuiste mi mayor motor y fuerza para seguir adelante y jamás rendirme.

A mi padre, Álvaro Leyva Flores, gracias por tanto, por siempre apoyar mis sueños, por escucharme pacientemente, por siempre darme un consejo sabio, por enseñarme a siempre ser humilde y responsable, por mostrarme que todo se logra con amor y trabajo constante, gracias por nunca dejar que me rindiera.

A mis queridos hermanos, Juan Ca, Mague, Lili y Sele, sin ustedes jamás hubiera logrado cumplir este sueño, por todo su amor, paciencia, consejos, por siempre preocuparse por mi salud y bienestar.

A mi novio, Erick Alejandro Carranza Loaiza, por ser mi compañero de vida, por darme siempre tu apoyo y cariño, por escucharme con amor, por tener paciencia con mis horarios, por ser gran parte de mis alegrías y ser mi válvula de escape en mis tristezas, siempre serás el amor de mi vida.

A mis compañeros de generación, Gus, Cristy, Toño, Lalo y Adrián, por no dejarme tirar la toalla nunca, por ser mis amigos, compañero y hermanos, agradezco al destino permitirme recorrer este camino a su lado.

A mis residentes de mayor y menor jerarquía y a mis internos, porque todos me enseñaron algo importante, de cada uno de ustedes aprendí, siempre sentí su gran apoyo en todas las guardias, gracias por compartir risas, lágrimas y castigos, sin ustedes no sería esto posible.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	1
Índice de tablas	2
Índice de figuras.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	6
CAPITULO 1	7
1.1 Marco teórico	7
1.2 Antecedentes científicos	23
1.3 Justificación	23
1.4 Planteamiento del problema	25
1.5 Hipótesis	26
1.6 Objetivos.....	27
CAPITULO 2. Material, pacientes y métodos.....	28
2.1 Tipo, diseño y características del estudio	28
2.2 Población de estudio.....	28
2.3 Descripción y operalización de las variables	28
2.4. Selección de la muestra.....	29
2.5 Criterios de selección.....	29
2.6 Recolección de la información	30
2.7 Procedimientos	31
2.8 Análisis estadístico	35

2.9 Consideraciones éticas	35
2.10 Recursos para el estudio	35
2.11 Cronograma de actividades	36
2.12 Difusión de la investigación	37
CAPITULO 3. Resultados	38
CAPITULO 4. Discusión.....	46
CAPITULO 5. Conclusiones.....	49
CAPITULO 6. Glosario.....	50
CAPITULO 7. Referencias bibliográficas	51
CAPITULO 8. Anexos.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los estados hipertensivos del embarazo según sus características clínicas	8
Tabla 2. Clasificación de la Preeclampsia según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.	9
Tabla 3. Signos y síntomas para diagnóstico de preeclampsia con criterios de severidad	10
Tabla 4. Descripción y operalización de las variables.....	28
Tabla 5. Condiciones para la síntesis de cDNA.	32
Tabla 6. Condiciones generales para la reacción de PCR.....	33
Tabla 7. Secuencia de los Oligonucleótidos	34
Tabla 8. Muestras de placenta de pacientes sanas y con preeclampsia	38
Tabla 9. Comparación de características demográficas y obstétricas entre casos y controles	39
Tabla 10. Comparación de antecedente de preeclampsia en embarazos previos	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de sFlt-1 Y sEng13

Figura 2. Vías de plegado proteico y acciones de la UPR16

Figura 3. Respuesta celular ante estrés del retículo endoplásmico18

Figura 4. Activación de ATF622

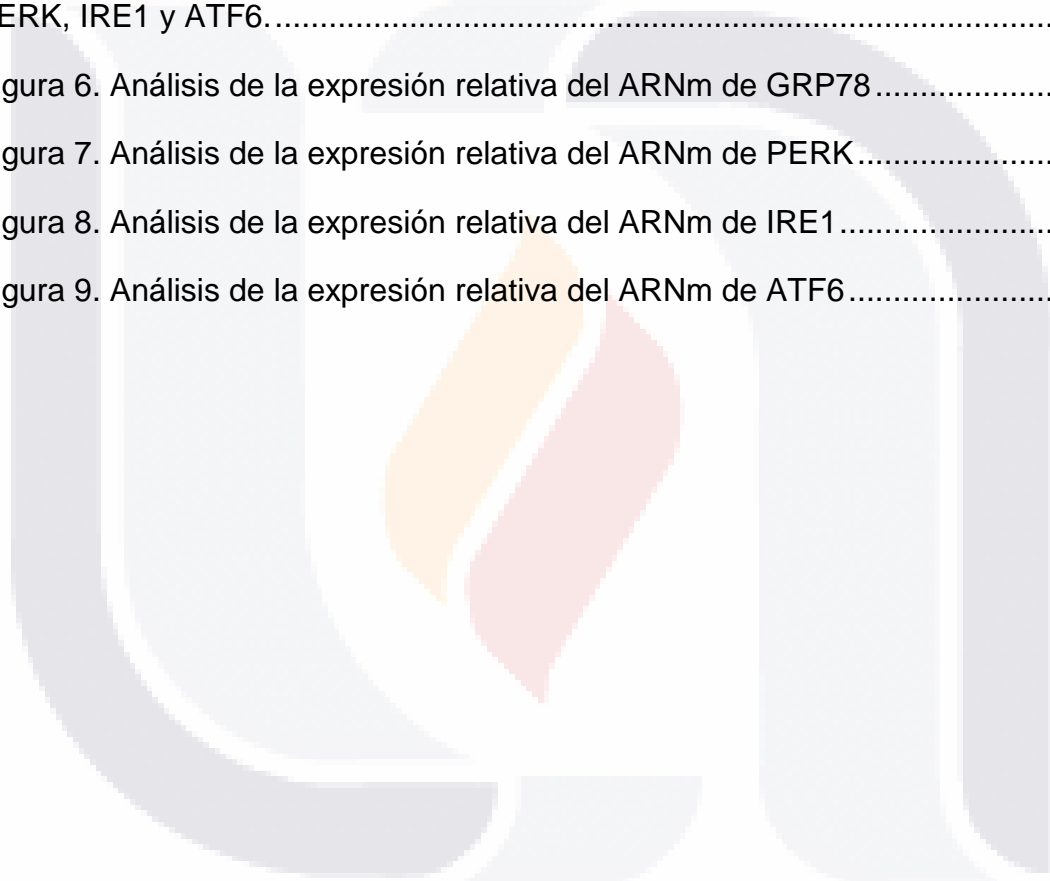
Figura 5. Gel representativo de la amplificación de los transcritos GADPH, GRP78, PERK, IRE1 y ATF6.....41

Figura 6. Análisis de la expresión relativa del ARNm de GRP7842

Figura 7. Análisis de la expresión relativa del ARNm de PERK43

Figura 8. Análisis de la expresión relativa del ARNm de IRE144

Figura 9. Análisis de la expresión relativa del ARNm de ATF645



RESUMEN

Introducción. La preeclampsia es una de las enfermedades más frecuentes en la gestación y una de las principales causas de muerte. Dentro de la fisiopatología de la preeclampsia se ha observado la relación que se puede presentar con el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico, el cual activa respuestas a nivel genético y molecular. **Objetivo.** Determinar la expresión de los genes PERK, GRP78, IRE-1 y ATF-6 de la respuesta a proteínas mal conformadas en muestras de placenta de pacientes con diagnóstico de preeclampsia y controles sanos en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes. **Metodología.** Se realiza un estudio observacional, prospectivo, de casos y controles, entre el mes de mayo del 2019 y febrero del 2020. La expresión de los genes PERK, GRP78, IRE-1 y ATF-6 se realizó a través de amplificación con PCR. Se realizó un muestreo no probabilístico y por conveniencia, con un total de 12 casos y 10 controles. Las variables que se estudian es la expresión de los genotipos para PERK, GRP78, IRE-1 Y ATF-6, en pacientes sanas y con diagnóstico de preeclampsia, edad materna, edad gestacional, gestas y preeclampsia en embarazos previos. **Resultados.** Las pacientes con preeclampsia tuvieron diferencias estadísticamente significativas para el número de gestas (1.9 ± 0.83 versus 1.4 ± 0.49 ; $p= 0.04$) y la edad gestacional (39.3 ± 1.07 versus 36.4 ± 1.73 ; $p=0.0001$). En cuanto la expresión de los transcritos se encontró diferencia significativa en la expresión media de GRP78 (0.6956 ± 0.07623 versus 0.9630 ± 0.05647 ; $p=0.0094$) y en la expresión media de IRE1 (0.7235 ± 0.09937 versus 1.027 ± 0.07116 , $p= 0.0194$), siendo mayor la expresión en las muestras de placentas de pacientes con preeclampsia. **Conclusiones.** En pacientes con preeclampsia se vio una mayor expresión de IRE1 y GRP78, lo que les puede conferir un papel como futuros marcadores de la enfermedad.

Palabras clave: preeclampsia, proteínas mal conformadas, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico.

ABSTRACT

Introduction. Preeclampsia is one of the most frequent diseases in pregnancy and one of the main causes of death. Within the pathophysiology of preeclampsia, the relationship that may occur with oxidative stress and endoplasmic reticulum stress has been observed, which activates responses at the genetic and molecular level. **Objective.** Determine the expression of the PERK, GRP78, IRE-1 and ATF-6 genes of the unfolding protein response in placental samples from patients diagnosed with preeclampsia and healthy controls at Aguascalientes Women's Hospital. **Methodology.** An observational, prospective, case-control study was carried out between May 2019 and February 2020. The expression of the PERK, GRP78, IRE-1 and ATF-6 genes was performed through PCR amplification. Non-probability and convenience sampling was carried out, with a total of 12 cases and 10 controls. The variables studied are the expression of the genotypes for PERK, GRP78, IRE-1 and ATF-6, in healthy patients with a diagnosis of pre-eclampsia, maternal age, gestational age, pregnancies and pre-eclampsia in previous pregnancies. **Results.** The patients with preeclampsia had statistically significant differences for the number of pregnancies (1.9 ± 0.83 versus 1.4 ± 0.49 ; $p = 0.04$) and gestational age (39.3 ± 1.07 versus 36.4 ± 1.73 ; $p = 0.0001$). Regarding the expression of the transcripts, a significant difference was found in the mean expression of GRP78 (0.6956 ± 0.07623 versus 0.9630 ± 0.05647 ; $p = 0.0094$) and in the mean expression of IRE1 (0.7235 ± 0.09937 versus 1.027 ± 0.07116 , $p = 0.0194$), the expression being higher in placental samples from patients with preeclampsia. **Conclusions.** In patients with preeclampsia, a greater expression of IRE1 and GRP78 was seen, which may confer a role as future markers of the disease.

Key words: preeclampsia, malformed proteins, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress.

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia es actualmente una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y perinatal a nivel mundial. En el caso de nuestro país este padecimiento ocupa una de las primeras tres causas de muerte materna.

El Hospital de la Mujer de Aguascalientes es considerado un hospital de alta concentración y se estima se atienden en promedio 10,150 nacimientos anuales, de estos aproximadamente 600 se complican con preeclampsia, hasta el momento sin lograr disminuir su incidencia. Es por este motivo que surge la necesidad de buscar nuevos marcadores que nos permitan identificar pacientes en riesgo para tratar de disminuir su incidencia y su impacto.

Se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos tratando de explicar la etiología de la preeclampsia, sin embargo, a la fecha no se ha establecido de manera concluyente que factores influyen para desencadenar esta enfermedad.

Dentro de la fisiopatología se ha observado la importancia del estrés oxidativo. El estrés oxidativo y la formación de especies reactivas de oxígeno han mostrado conexión con el estrés en el retículo endoplásmico, en el cual se inicia, una acumulación de bases de nucleótidos y proteínas que no pueden ser plegadas de manera adecuada, conociéndose como proteínas mal conformadas. Como respuesta a estas se activan varias vías de transducción de señales en un intento de recuperar la homeostasis.

En el presente documento se analizó la expresión de los genes que activan las diferentes vías de la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas en relación a pacientes sanas y pacientes con preeclampsia.

La realización de este estudio ayudará a identificar si la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas tiene expresión en la preeclampsia, para de esta manera poder encontrar probables marcadores que nos ayuden en un diagnóstico oportuno en un futuro.

CAPITULO 1

1.1 MARCO TEÓRICO

PREECLAMPSIA

La preeclampsia es un trastorno específico de la mujer, multisistémico y de severidad variable que se presenta durante el embarazo posterior a la semana 20 de gestación, el parto o el puerperio. La preeclampsia se caracteriza por presentar hipertensión arterial, según el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG) se define como un aumento de la presión sistólica por encima de 140 mmHg y la diastólica por encima de 90 mmHg, o ambas, medidas en dos ocasiones en al menos 4 horas en mujeres que previamente presentaban presión arterial normal y proteinuria significativa. A pesar de que por lo general se acompaña con proteinuria, algunas pacientes pueden no cursar con ella y el diagnóstico se establece al presentar síntomas de vasoespasmo, epigastralgia, trombocitopenia y alteración en las enzimas hepáticas (ACOG, 2019; IMSS, 2017).

Se considera proteinuria significativa a la presencia de 300 mg o más de proteínas en una recolección de orina de 24 horas o en el uso de métodos cualitativos (Tira reactiva) la medición de 2 ++. Sin embargo, el método cualitativo puede presentar una alta tasa de error (ACOG, 2019).

En la actualidad se añadió dentro de los criterios diagnósticos el índice proteína/creatinina el cual es un parámetro ampliamente utilizado para la detección de proteinuria, con un punto de corte de 0.30 mg/dl y en el caso de México, según la Guía de Práctica Clínica de 0.32 mg/dl (Guadiana et al., 2011; IMSS, 2017).

Su importancia radica en que actualmente, es una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y perinatal. Globalmente, 76 000 mujeres y 500 000 recién nacidos mueren cada año a causa de este padecimiento (Poon et al., 2019).

Según la Organización Mundial de la Salud, alrededor del 73% de las muertes maternas entre el año 2003 y el año 2009 fueron secundarias a causas obstétricas directas. Las tres principales causas son hemorragia, trastornos hipertensivos y sepsis, teniendo la hipertensión un porcentaje del 14% (Say et al., 2014).

En la Tabla 1, se observa la clasificación de los diferentes estados hipertensivos que se pueden presentar en el embarazo, parto o puerperio, dependiendo de las diferencias clínicas que presenten las pacientes (Hernández-Pacheco et al., 2013; Magee et al., 2014).

Tabla 1. Clasificación de los estados hipertensivos del embarazo según sus características clínicas (Hernández-Pacheco et al., 2013; Magee et al., 2014)	
Estado hipertensivo	Características
Hipertensión arterial crónica <ul style="list-style-type: none"> • Con comorbilidades • Con preeclampsia sobreagregada 	<p>Hipertensión que se establece antes del embarazo o se desarrolla antes de la semana 20 de la gestación.</p> <p>Se considera preeclampsia sobreagregada cuando hay desarrollo de uno o más de los siguientes después de las 20 semanas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión resistente • Proteinuria nueva o que empeora • Una o más condiciones adversas • Una o más complicaciones severas <p>Dentro de las comorbilidades que originan hipertensión se puede considerar el hipertiroidismo, enfermedad renal crónica, nefropatía diabética o lupus eritematoso.</p>
Hipertensión gestacional <ul style="list-style-type: none"> • Con comorbilidades • Con preeclampsia sobreagregada 	<p>Se caracteriza por una hipertensión que se presenta posterior a la semana 20 de gestación pero sin presencia de proteinuria significativa.</p> <p>No se extiende más allá de la semana 12 posterior al nacimiento del producto.</p> <p>En este caso también se puede presentar preeclampsia sobreagregada si se presenta en</p>

	semanas posteriores una de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Nueva proteinuria • Una o más condiciones adversas • Una / más complicaciones severas
Preeclampsia	Se considera hipertensión que inicia posterior a la semana 20 de la gestación y se acompaña de proteinuria significativa.
Otras formas hipertensivas <ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión transitoria • Hipertensión de bata blanca • Hipertensión enmascarada. 	En estos casos la elevación de la presión arterial puede deberse a estímulos ambientales o dolor de parto, así como ante la presencia del médico ya que al salir del consultorio vuelve a presentar cifras normales. En el último caso se define como una presión normal dentro del consultorio pero elevada una vez afuera.

A su vez la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) subclasifica a la preeclampsia dependiendo del inicio de la patología y la semana de gestación donde se presente el parto, esta clasificación se muestra en la Tabla 2 (Poon et al., 2019).

Tabla 2. Clasificación de la Preeclampsia según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (Poon et al., 2019).	
Tipo de Preeclampsia	Semanas de gestación dónde se presenta el parto
Preeclampsia de inicio temprano	Parto antes de las 34 semanas de gestación
Preeclampsia de inicio tardío	Parto posterior a las 34 semanas de gestación
Preeclampsia pretérmino	Parto antes de las 37 semanas de gestación
Preeclampsia al término	Parto posterior de las 37 semanas de gestación

En pacientes con preeclampsia de inicio pretérmino y de desarrollo temprano, surge la necesidad de balancear la maduración fetal in útero y de valorar los riesgos para la madre de continuar por más tiempo con la gestación.

Dentro de estos riesgos se incluye la progresión a eclampsia, desprendimiento prematuro de placenta normoinserta y Síndrome de HELLP (Poon et al., 2019).

En la actualidad el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG) clasifica la preeclampsia en preeclampsia con y sin criterios de severidad y se recomienda que a toda mujer embarazada que presente algún trastorno hipertensivo se le clasifique bajo los criterios de este (IMSS, 2017).

Dentro de los criterios de severidad se pueden considerar tanto signos maternos como síntomas, estos se enlistan en la Tabla 3, la cual se presenta a continuación (Hernández-Pacheco et al., 2013).

Tabla 3. Signos y síntomas para diagnóstico de preeclampsia con criterios de severidad (Hernández-Pacheco et al., 2013)

Síntomas	Signos
<ul style="list-style-type: none"> • Cefalea persistente, inusual o de novo • Alteraciones visuales • Epigastralgia o dolor en hipocondrio derecho • Edema agudo de pulmón • Desprendimiento prematuro de placenta normoincerta 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión severa por encima de 160/110 • Elevación de la creatinina sérica por encima de 1.1 mg/dL • Incremento de TGO o TGP por encima de 70 UI/L • Elevación de DHL por encima de 600 UI/L • Disminución plaquetaria por debajo de 100, 000 mm³

Fisiopatología de la preeclampsia

Múltiples mecanismos has sido propuestos en la preeclampsia, incluyendo: isquemia uteroplacentaria crónica, mal adaptación inmune, incremento en la apoptosis y necrosis en el trofoblasto o una respuesta inflamatoria exagerada materna (ACOG, 2019).

La placentación en la pacientes con preeclampsia es frecuentemente anormal, con evidencia de hipoperfusión e isquemia, encontrándose daño endotelial microvascular como lesión clásica de este desorden (Karumanchi, 2016).

Tanto la hipertensión como la proteinuria indican que la diana de la enfermedad es el endotelio. Dentro de los factores predisponentes se encuentran el ser primigestas o multigravidas, factores genéticos, pacientes que presentaron preeclampsia previamente, hipertensión preexistente, enfermedad renal crónica, obesidad, Diabetes Mellitus, trombofilias, cromosomopatías y gestaciones múltiples (Powe et al., 2011).

La causa exacta de la preeclampsia es aún desconocida, pero hay evidencia de que la implantación inapropiada y un desequilibrio subsecuente en los factores circulantes proangiogénicos y antiangiogénicos son considerados la raíz de este desorden (Karumanchi, 2016).

Por lo general la preeclampsia es más frecuente en primigrávidas, esto se debe a un probable mecanismo inmune, en donde la futura madre aun no tolera los antígenos paternos presentes en el líquido seminal. Así que la poca exposición a este se considera como factor de riesgo y esto explica por qué las mujeres que se embarazan con el primer coito o se embarazan con inseminación artificial o con una nueva pareja presentan mayor riesgo de preeclampsia (Redman & Sargent, 2010).

En un embarazo normal, el citotrofoblasto fetal invade las arterias uterinas espirales maternas reemplazando el endotelio. Este proceso complejo resulta en la transformación de vasos sanguíneos de pequeño diámetro y alta resistencia vascular en vasos de baja resistencia y alta capacitancia, asegurando así una distribución adecuada de la sangre materna a la unidad útero-placentaria (Damsky & Fisher, 1998).

La remodelación inadecuada de las arterias espirales ocasionará un medio ambiente hipóxico, este a su vez desencadenará una serie de eventos que

inducen una función endotelial anormal la cual es característica de la preeclampsia. Todo esto modifica el tono y la permeabilidad vascular lo que ocasionará la hipertensión y la proteinuria (Lapidus et al., 2017).

Las células endoteliales a su vez pueden ser activadas de diferentes maneras, por lo que no se puede considerar que solamente un solo factor de manera individual opere durante el curso de la enfermedad (Redman et al., 1999).

En los procesos inflamatorios de manera general, se observa en la superficie de las células endoteliales, un incremento en la expresión de moléculas que favorecen la adhesión de leucocitos, algunas de estas moléculas son la endotoxina, el factor de necrosis tumoral y la interleucina 1; en el desarrollo de la preeclampsia no solo se ha observado una disfunción endotelial si no, también una activación sistémica de células inflamatorias (Redman et al., 1999).

Los mecanismos de invasión y remodelación no están del todo claros. Se ha mostrado que la señalización de la proteína transmembrana NOTCH, la cual sirve como receptor de señales, es vital en este proceso y que su ausencia se asocia con reducción del diámetro vascular y afección a la perfusión placentaria (Hunkapiller et al., 2011).

Dentro de la fisiopatología de la preeclampsia es importante mencionar el papel de factores angiogénicos y antiangiogénicos dado que se ha visto una importante relación entre preeclampsia severa y la restricción del crecimiento intrauterino en paciente con niveles bajos de PIGF y VEGF y niveles elevados de sFlt.1 (Lapidus et al., 2017).

Otro factor proteico relacionado con el desarrollo de la preeclampsia es la endoglina soluble (sEng), que está relacionada con la disminución en la producción de óxido nítrico (Karumanchi, 2016).

Figura 1. Efecto de sFlt-1 Y sEng

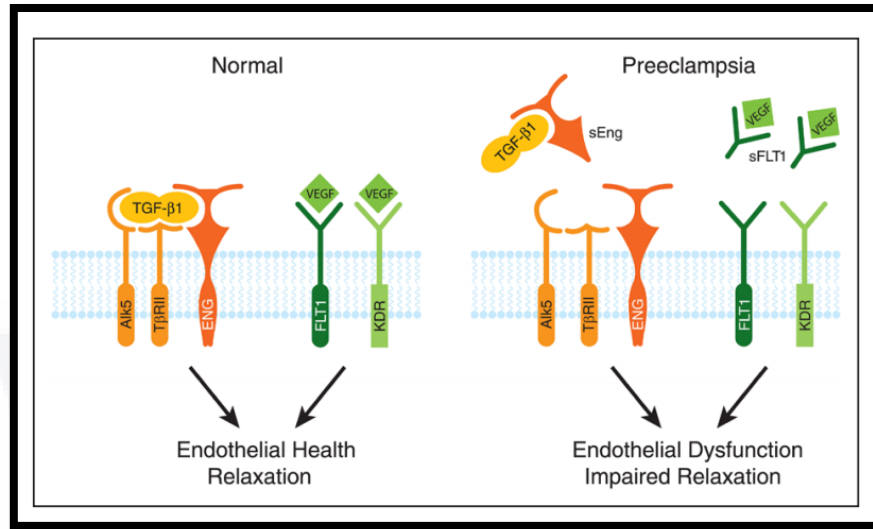


Fig 1. Efecto de sFlt-1 y sEng. En la figura se observa el efecto de sFlt-1 y sEng, los cuales inducen disfunción endotelial al actuar como antagonistas de VEGF y de TGF-b1, al evitar su adecuada unión en su receptor (Karumanchi, 2016).

Óxido nítrico y estrés oxidativo

El óxido nítrico (NO) actúa como un regulador de la presión arterial. Su producción se encuentra incrementada en el embarazo normal y se relaciona con la vasodilatación fisiológica del embarazo. Se cree que su disminución o deficiencia predispone al desarrollo de preeclampsia. Además de que se ha relacionado con hipertensión por vasoconstricción renal, proteinuria, restricción del crecimiento intrauterino y morbilidad fetal (Martín & Carbajal, 2014).

El estrés oxidativo ha sido implicado en la fisiopatología de la preeclampsia, se considera un desequilibrio entre las fuerzas pro oxidativas y las anti oxidativas. Se ha observado que en los embarazos con preeclampsia se encuentra una marcada disminución de la protección anti oxidante y un aumento de formas reactivas de oxígeno como anión superóxido y peroxinitritos los cuales alteran la función vascular (Roggensack et al., 1999).

El estrés oxidativo ocasionado por la mal perfusión placentaria ocasiona la activación de la célula endotelial, además de ser el estímulo de la liberación de citosinas y factores proinflamatorios desde el trofoblasto (Burton & Yung, 2011).

Además el estrés oxidativo puede ocasionar una alteración en la función celular así como derivar en estrés del retículo endoplásmico (Burton & Yung, 2011).

Estrés del retículo endoplásmico: respuesta a proteínas mal conformadas (UPR)

El retículo endoplasmático (RE) es un compartimento subcelular, el cual se encuentra organizado en una serie de túbulos y sacos, que van desde el núcleo hasta la membrana celular, es el principal compartimento involucrado en el plegado y maduración proteica (Burton & Yung, 2011).

Además, se encarga de un gran número de procesos metabólicos como la síntesis de lípidos y es el mayor reservorio de calcio intracelular (Soto & Hetz, 2010).

Las proteínas entran al retículo endoplásmico como cadenas de polipéptidos no plegados, este flujo es variable debido a que se adapta y cambia como respuesta a varios factores como la diferenciación y fisiología celular o el medio ambiente (Ron & Walter, 2007).

En el RE se inicia la maduración proteica, la cual es necesaria para el adecuado plegamiento de las proteínas que son sintetizadas en la vía secretora. La maquinaria de plegamiento proteico en el RE es constantemente desafiada debido a la alta demanda de síntesis de proteínas a la que se enfrenta, lo cual constituye una fuente constante de estrés (Hetz, 2012).

La carga de producción del RE cambia dependiendo de la función de cada célula, siendo mayor en células con una alta actividad secretora, como las células del páncreas o del sincitiotrofoblasto (Burton & Yung, 2011).

Sí la carga de proteínas excede la capacidad de plegamiento del RE, debido a la alta demanda en la producción, se generará una acumulación de proteínas que no son plegadas o son plegadas de manera errónea dentro de la luz del mismo, lo cual alterará la función del organelo ocasionando una condición celular conocida como estrés del retículo endoplásmico (Burton & Yung, 2011; Hetz, 2012).

El acumulo de proteínas mal plegadas, no plegadas o mutadas, causa alteraciones en la regulación celular, la cual gasta gran cantidad de energía en un intento para plegar estas proteínas, esto produce una excesiva cantidad de especies endógenas reactivas a oxígeno (ROS), todo esto actúa como una señal de estrés y altera la homeostasis de RE (Burton & Yung, 2011; Soto & Hetz, 2010).

La eficiencia en el plegado de las proteínas es constantemente ajustada a través de múltiples señales celulares y del ambiente. Ante estas situaciones de estrés las células activan una serie de vías y mecanismos adaptativos complementarios que hacen frente a esta alteración tratando de mantener la homeostasis, a esto se le llama Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR) (Schroder & Kaufman, 2005).

Dentro de las acciones de la UPR para recuperar la homeostasis se encuentran: disminuye la carga en la maquinaria de plegado disminuyendo la cantidad de nuevas cadenas de péptidos que entran al RE, incrementa la capacidad de plegamiento sintetizando más RE, genera más chaperones y remueve las proteínas mal conformadas que han sido acumuladas (Burton & Yung, 2011).

La UPR además traduce información acerca del estatus funcional proteico en el RE hacia el núcleo, sin embargo, cuando las células entran a un estado de estrés irreversible las mismas vías de la UPR eliminan el daño mediante la apoptosis (Woehlbier & Hetz, 2011).

Figura 2. Vías de plegado proteico y acciones de la UPR

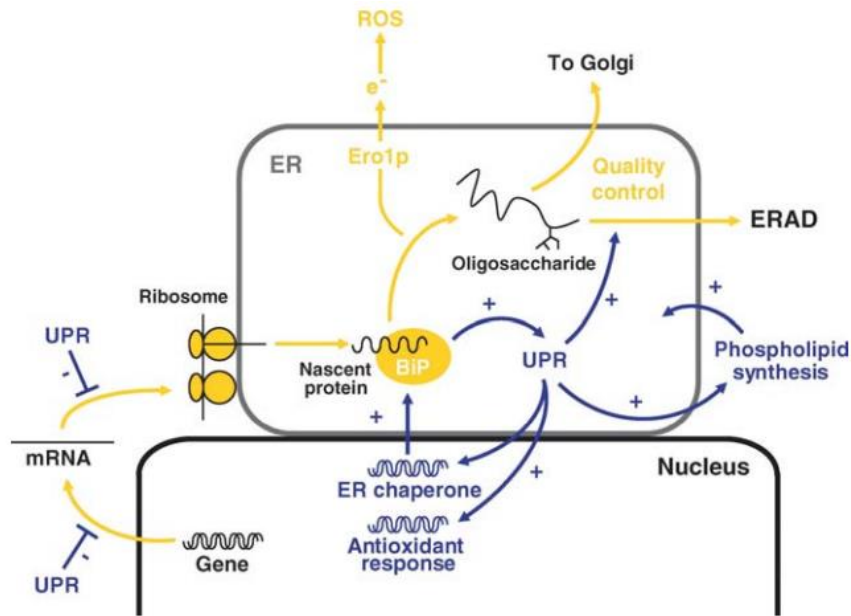


Fig. 2 Vías de plegado proteico y acciones de la UPR. En la imagen se observan algunas de las vías que sigue el plegado proteico, así como algunas de las diferentes acciones que lleva a cabo la UPR en su intento para recuperar la homeostasis (Schroder & Kaufman, 2005).

El estrés sobre el RE de manera crónica ha sido propuesto como una parte clave en la patogénesis de un gran número de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, aterosclerosis, isquemia, desorden de la vía de la serotonina, cáncer, diabetes y desordenes cardiovasculares (Chaudhari et al., 2014).

Vías de la respuesta a proteínas mal conformadas

La UPR se compone de varias vías de transducción de señales en un intento de recuperar la homeostasis y la adecuada función del retículo endoplásmico, estas vías inician en proteínas transmembrana en el RE proximal, principalmente inositol-requiring kinase 1 (IRE1a), factor de activación de transcripción 6 (ATF6) y protein kinase RNA like ER kinase (PERK) (Chaudhari et al., 2014).

Dos diferentes olas de respuesta celular son observadas en diferentes tiempos: en primer lugar, como reacción inmediata se produce la activación de PERK, el cual inhibe, de manera general, la translación de proteínas a través de la fosforilación del factor iniciador de translación 2α (eIF2 α). Además en esta primera ola, se inicia una degradación selectiva de RNA mensajero en el RE gracias a la acción de IRE1 (Hetz, 2012).

Otra de las respuestas celulares que ocurre de manera rápida, es la macroautofagia o simplemente autofagia, la cual es una vía que es inducida por la adaptación ante el estrés metabólico y sirve como control de daños. Durante este proceso las células forman diversas vesículas llamadas autofagosomas, los cuales atrapan organelos, proteínas o porciones del citoplasma y los envían a los lisosomas los cuales degradan este contenido, eliminando el daño (Kroemer et al., 2010).

Por último se realiza una degradación la cual inhibe la translocación de proteínas dentro del retículo endoplásmico, todos estos mecanismos tienen como único fin el reducir la cantidad de proteínas que se encuentran en RE para que los mecanismos de adaptación y reparación sean capaces de recuperar la homeostasis (Hetz, 2012).

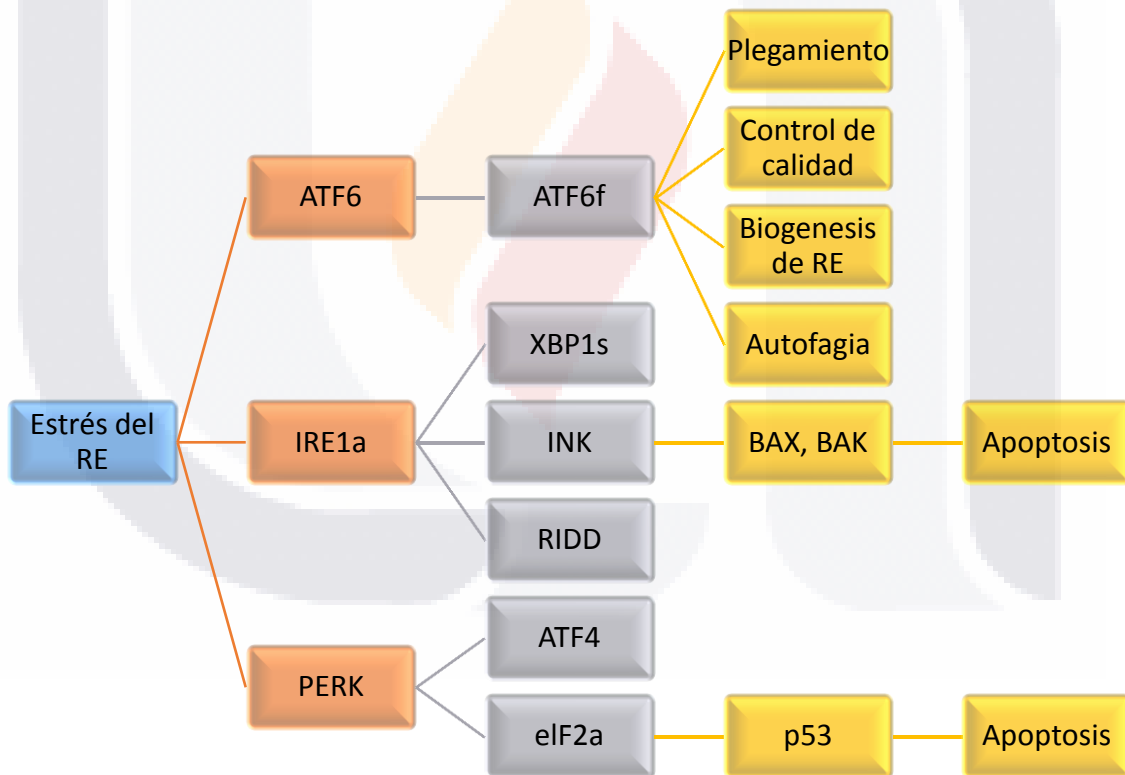
En la segunda ola de eventos, la cual se considera un cambio a largo plazo, ocurre un incremento en la capacidad del retículo endoplásmico para manejar estas proteínas mal conformadas o mal plegadas, en este paso, hay una activación transcripcional en la expresión genética, lo que modificará la función de la maquinaria de plegado (Ron & Walter, 2007).

En caso de que estas respuestas no fueran suficientes y la homeostasis no pueda ser restablecida, se activará un tercer y último mecanismo, el cual desencadenará la muerte celular o apoptosis como recurso para proteger al individuo del daño de estas células, a través de una molécula conocida como CHOP (C/EBP homologous protein) (Li et al., 2014; Hetz, 2012).

Dentro de la maquinaria de la UPR se ha identificado al chaperón conocido como BIP/GRP78, al cual se le considera un importante regulador de las funciones del RE, además de tener un papel clave en el manejo del estrés del mismo (Li et al., 2014).

Este chaperón en condiciones normales se encuentra unido a IRE1 y PERK ocasionando un efecto inhibitor, ante condiciones de estrés BIP libera estos sensores y prefiere la unión a las proteínas que se encuentran mal plegadas, respondiendo ante su acumulación, en cuanto se une a ellas elimina su interacción inhibitoria sobre IRE1 y PERK, activando de esta manera la UPR (Hetz, 2012).

Figura 3. Respuesta celular ante estrés del retículo endoplásmico



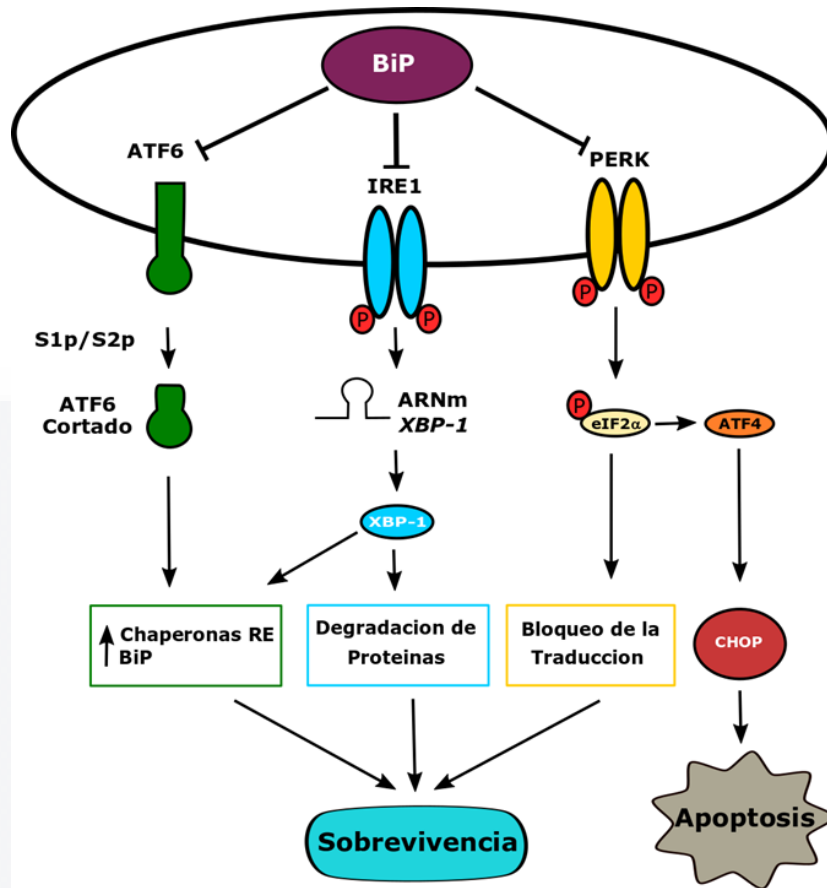


Fig 3. Respuesta celular ante estrés del retículo endoplásmico. En la figura podemos ver las diferentes respuestas que sigue la célula ante una situación de estrés en el retículo endoplásmico a través del tiempo. En primera instancia la atenuación de la síntesis proteica por inhibición de la translación por efecto de PERK, la activación de la autofagia como efecto de IRE1a y la activación de factores de transcripción como efecto de ATF6 para promover la respuesta adaptativa y restaurar la función de plegado. En caso de que el estrés continúe de manera crónica se induce la apoptosis para eliminar las células con daño irreversible, a través de la vía BAK, BAX y CHOP. Además de que estas últimas vías ocasionan la liberación de especies reactivas de oxígeno.

Regulador GRP78 / BiP

Los chaperones del retículo endoplásmico (RE) son indispensables para el adecuado funcionamiento del mismo, uno de los más conocidos es el regulador GRP78 o BiP, esta proteína se encuentra relacionada con múltiples procesos celulares, dentro de los cuales se encuentra el paso de péptidos por la membrana

del retículo, de esta manera ayuda en el plegado y montaje de las diferentes proteínas (Wang et al., 2009).

Una de las funciones más importantes del GRP78 es actuar como un sensor de estrés, dentro de sus acciones se encuentra la activación de la señalización de la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas (Wang et al., 2009).

Una vez que la luz del retículo endoplásmico se encuentra llena por proteínas mal plegadas, estas se unen a GRP78 de manera competitiva, liberando su unión con PERK e IRE1, una pequeña fluctuación en la concentración de proteínas puede generar esta liberación (Schroder & Kaufman, 2005).

Una vez que GRP78 libera PERK e IRE1 se inician las vías de señalización de la respuesta a proteínas mal conformadas, estas vías se dirigen a dos caminos diferentes, la primera a tratar de recuperar la homeostasis celular y la segunda se dirige a la apoptosis de la célula (Wang et al., 2009).

Otra función de GRP78 es la activación del factor ATF6, el cual manda señales que migran dentro del núcleo y actúan como factores de transcripción, lo cual sirve para incrementar la capacidad de plegado, es por estos motivos que GRP78, es un componente crítico del retículo endoplásmico y es requerido para su integridad y la autofagia en caso de ser necesario (Wang et al., 2009).

Inositol-requiring enzyme 1 (IRE-1)

La señal de la Respuesta a Proteínas mal conformadas inicia en proteínas transmembrana del retículo endoplásmico, las cuales poseen una porción luminal que se encargan de censar y vigilar el funcionamiento de plegado del RE y una porción citoplasmática que actúa sobre el sistema de transcripción (Chaudhari et al., 2014).

La primera vía identificada como transductor de estrés, es la iniciada por el gen IRE1, el cual codifica para una proteína transmembrana que a su vez cuenta con un dominio luminal y una porción en el citoplasma con un dominio proteinkinasa (Schroder & Kaufman, 2005).

Ante la presencia de proteínas mal conformadas, IRE1 ocasiona una oligomerización así como una autofosforilación que actuara directamente sobre las proteínas mal conformadas, ocasionando su unión al dominio luminal de IRE1. Posteriormente la autofosforilación en el dominio kinasa activa una función efectora, lo cual inicia la transcripción del factor de mRNA Hac1 o Xbp1, actuando como una endoribonucleasa (Ron & Walter, 2007).

Dentro de los efectos de IRE1 se intenta aumentar la capacidad de plegamiento de las proteínas, para esto una vez que se ha unido al ARNm del factor de transcripción Xbp-1 induce la transcripción de los componentes de control de calidad del RE. Si los intentos de restaurar la homeostasis de ER fallan, IRE1 α deja de empalmar el ARNm de Xbp-1 produciendo la eliminación de un intrón. Alternativamente, IRE1 reprime las respuestas adaptativas y activa la apoptosis a través de RIDD (Regulated IRE1-Dependent Decay) (Chen & Brandizzi, 2014).

PKR-like ER kinase (PERK)

Dentro de los transductores de estrés que se han localizado transmembrana en el retículo endoplásmico se encuentra PERK, este transductor responde a las mismas señales que IRE1, su señalización se dirige a su dominio luminal de la membrana el cual sirve como sensor de estrés, este transductor activa una fosforilación que resulta en la inhibición de la transcripción de proteínas dentro de la célula (Bertolotti et al., 2000).

La fosforilación de PERK se dirige hacia el factor de iniciación de translación eucariótico 2 α (eIF2 α), este factor ocasiona una disminución global de la translación de proteínas lo cual a su vez reduce la síntesis exagerada en el retículo endoplásmico, de manera paradójica la fosforilación de eIF2 α desencadena la activación de ATF4, el cuál es un regulador de la expresión genética en la UPR, con vías que se dirigen a la mejora de la función metabólica, la homeostasis redox y por último puede terminar en apoptosis y autofagia (Woehlbier & Hetz, 2011)

Activating transcription factor-6 (ATF-6)

Dentro de los elementos estudiados que se han encontrado unidos a los promotores que se activan ante la respuesta a las proteínas mal conformadas (GRP78/BIP) se encontró al factor ATF6. Este se considera un transductor de estrés, el cual se encuentra de manera inactiva en la membrana del retículo endoplásmico (Ron & Walter, 2007).

Bajo condiciones de estrés del RE, ATF6 es transportado hacia el aparato de Golgi, donde se adhiere a las proteasas S1P y S2P, las cuales lo cortan, liberando de esta manera una porción que se unirá al ADN iniciando en el núcleo la expresión de genes (Ron & Walter, 2007).

Algunos de estos genes se relacionan con las vías de las proteínas mal conformadas, algunos presentes en su mayoría, están los que codifican las chaperonas GRP78/BIP Y GRP94 así como la PDI. El plegamiento proteolítico de ATF6 induce directamente la activación transcripcional del gen XBP1 y de chaperonas sobre el retículo endoplásmico (Seo et al., 2008).

Figura 4. Activación de ATF6

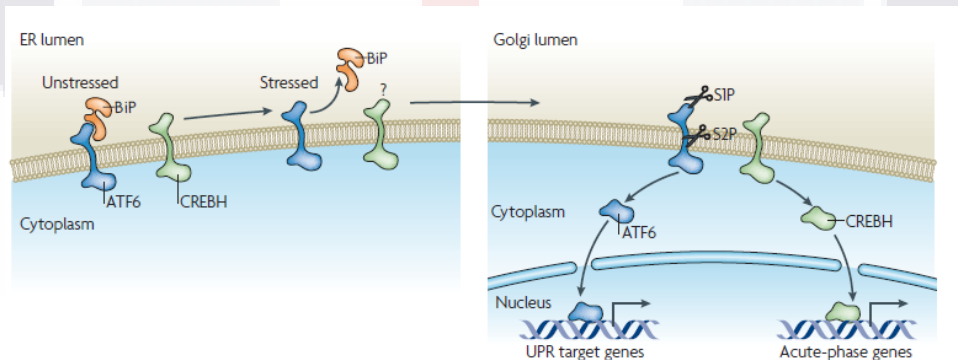


Fig. 4 Activación de ATF6. En la imagen se observa la activación de ATF6, el cual en condiciones sin estrés se encuentra inhibido por BiP, posterior a su activación se observa la proteólisis por parte de S1P y S2P ocasionado cambios en genes diana dentro del núcleo (Ron & Walter, 2007).

1.2 ANTECEDENTES CIENTIFICOS

La disfunción placentaria ha sido implicada en la fisiopatología de la preeclampsia, sobre todo se ha observado en aquellas pacientes que han desarrollado este síndrome de manera temprana (Burton & Yung, 2011).

En los modelos de dos etapas, se cree que debido a la incorrecta implantación placentaria se genera una perfusión deficiente, la cual ocasionara un estrés oxidativo que libera factores dentro de la circulación materna activando a las células del endotelio (Burton & Yung, 2011).

La interacción de formación de especies reactivas de oxígeno en el estrés oxidativo ocasionado así como radicales libres, las alteraciones en la homeostasis del calcio, el colapso mitocondrial e inflamación es un fenómeno común que existe en múltiples desordenes, incluyendo la preeclampsia, y su conexión con el estrés en el retículo endoplásmico es un tema explorado recientemente (Chaudhari et al., 2014).

El estrés en el RE induce inflamación que inicialmente sirve para limitar el daño tisular y a su vez facilitar su reparación, sin embargo, esto depende del estado de la enfermedad y el tipo de estresor. Múltiples enfermedades crónicas inflamatorias como diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis, artritis, cáncer y otras enfermedades metabólicas presentan el estrés sobre el RE como un factor involucrado en la progresión de la enfermedad, mostrando una interconexión entre el estrés en el RE, inflamación y estrés oxidativo que pudiera explicar mecanismos moleculares aún no entendidos en las vías de desarrollo de numerosas enfermedades incluyendo la preeclampsia (Zhang & Kaufman, 2008).

1.3 JUSTIFICACIÓN

Los problemas hipertensivos durante el embarazo como la preeclampsia representan una de las principales causas de muerte materno-fetal a nivel mundial incluyendo a México, encontrándose dentro de las primeras tres causas de muerte materna en nuestro país. Se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos

trata de explicar la etiología de la preeclampsia, sin embargo, a la fecha no se ha establecido de manera concluyente que factores influyen para desencadenar esta enfermedad. Por tal motivo, es importante indagar en mecanismos moleculares como la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas (UPR), la cual se ha visto relacionada en múltiples patologías que presentan procesos inflamatorios y estrés oxidativo, como en la preeclampsia, para de esta manera poder encontrar un blanco terapéutico que pueda ser útil en el tratamiento de esta condición en un futuro, así como identificar probables marcadores que nos ayuden en un diagnóstico oportuno.

1.3.1 Magnitud e impacto

La importancia del estudio de las enfermedades hipertensivas asociadas al embarazo se debe principalmente a que representan la complicación más común de la gestación, hasta en un 15%. Se consideran además una de las principales causas de muerte materna en todo el mundo, ocasionando de 62 mil a 77 mil muertes por año. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que cada siete minutos muere una mujer en el mundo por esta causa. En el caso particular de México, se estima que la preeclampsia representa un total de 34% de todas las muertes maternas (Abalos et al., 2014; Say et al., 2014).

En el siguiente estudio, se busca establecer si existe relación entre la presencia de estrés del Retículo Endoplásmico, la formación de proteínas mal conformadas así como las vías de respuesta genética a estas en muestras biológicas de placentas de pacientes con preeclampsia, para demostrar si estos genes, en un futuro, pueden llegar a ser utilizados como marcadores o factores pronósticos de las pacientes.

1.3.2 Aplicabilidad

Debido al impacto social que genera y a la alta frecuencia de la preeclampsia, los genes estudiados en la presente tesis, serán útiles como factores de riesgo o marcadores, por lo que su aplicabilidad se puede extender a todas las pacientes embarazadas desde el primer trimestre del embarazo.

1.3.3 Factibilidad

La realización del presente estudio es factible ya que se tiene la capacidad, instalaciones, materiales y equipos necesarios en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Por parte del Hospital de la Mujer de Aguascalientes se cuenta con el volumen necesario de pacientes embarazadas.

1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó previamente, la preeclampsia representa la complicación más común de la gestación y se considera una de las principales causas de muerte materna en todo el mundo, ocasionando de 62 mil a 77 mil muertes por año (Abalos et al., 2014; Say et al., 2014).

Dentro de su fisiopatología se ha observado la importancia del estrés oxidativo. Se ha observado que en los embarazos con preeclampsia se encuentra una marcada disminución de la protección anti oxidante y un aumento de formas reactivas de oxígeno como anión superóxido y peroxinitritos los cuales alteran la función vascular (Roggensack et al., 1999).

Este estrés oxidativo y la formación de especies reactivas de oxígeno, así como radicales libres, han mostrado conexión con el estrés en el retículo endoplásmico, en el cual se inicia, como resultado, una acumulación de bases de nucleótidos y proteínas que no pueden ser plegadas de manera adecuada, conociéndose como proteínas mal conformadas o mal plegadas (Chaudhari et al., 2014).

Ante la presencia de estas se inicia una respuesta la cual se compone de varias vías de transducción de señales en un intento de recuperar la homeostasis y la adecuada función del retículo endoplásmico, estas vías inician en proteínas transmembrana en el RE proximal, principalmente inositol-requiring kinase 1 (IRE1a), factor de activación de transcripción 6 (ATF6) y protein kinase RNA like ER kinase (PERK) (Chaudhari et al., 2014).

El Hospital de la Mujer de Aguascalientes es considerado un hospital de alta concentración, en el cual se reciben pacientes de todo el Estado, además de ser el principal centro de recepción de pacientes obstétricas complicadas. Recibe además pacientes de Estados vecinos como Jalisco, Zacatecas y San Luis Potosí. Cada año se estima se atienden en promedio en la última década 10,150 nacimientos anuales y aproximadamente 600 embarazos complicados con preeclampsia.

Es en este sentido y siguiendo esta línea, que se puede llegar a intuir que el estrés del retículo endoplásmico puede estar relacionado con la patogénesis de la preeclampsia, al demostrar la activación de los genes de respuesta a este estrés en las pacientes embarazadas se puede sospechar de un marcador o de un factor de riesgo para el desarrollo de la patología.

En el presente trabajo se propone encontrar una relación en la expresión de los genes que codifican para las respuestas ante las proteínas mal conformadas del sistema UPR (unfolding protein response).

Pregunta de investigación

¿Hay diferencia en la expresión de los genes PERK, GRP 78, IRE-1 y ATF-6 de la respuesta a proteínas mal conformadas entre las muestras de placenta de pacientes sanas y las pacientes con diagnóstico de preeclampsia en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes?

1.5 HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H0):

La expresión de los genes PERK, GRP 78, IRE-1 y ATF-6 de la respuesta a proteínas mal conformadas no es diferente en las muestras de placenta de pacientes con diagnóstico de preeclampsia respecto a las muestras de pacientes sanas en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes.

Hipótesis del trabajo (H1):

La expresión de los genes PERK, GRP 78, IRE-1 y ATF-6 de la respuesta a proteínas mal conformadas es diferente en las muestras de placenta de pacientes con diagnóstico de preeclampsia con respecto a las muestras de pacientes sanas en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes.

1.6 OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la expresión diferencial de los transcritos de los genes PERK, GRP78, IRE-1 y ATF-6 de la respuesta a proteínas mal conformadas en muestras de placenta de pacientes con diagnóstico de preeclampsia y controles sanos en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes.

Objetivos Específicos.

1. Conocer las características demográficas, obstétricas y antecedentes de preeclampsia.
2. Describir las características clínicas-bioquímicas para la clasificación de las pacientes dentro de dos grupos: pacientes con preeclampsia y controles.
3. Extracción del mRNA de las muestras de placentas humanas y síntesis del cDNA de cada una de las muestras.
4. Amplificación del gen GAPDH en cada una de las muestras de placentas por PCR.
5. Amplificación del gen IRE-1 en cada una de las muestras de placentas por PCR.
6. Amplificación del gen ATF-6 en cada una de las muestras de placentas por PCR.
7. Amplificación del gen PERK en cada una de las muestras de placentas por PCR.
8. Amplificación del gen GRP 78 en cada una de las muestras de placentas por PCR.

9. Establecer si hay una relación en la expresión de los genes con respecto a las muestras de placentas humanas sin y con preeclampsia.

CAPITULO 2. MATERIAL, PACIENTES Y MÉTODOS

2.1 TIPO, DISEÑO Y CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, tipo casos y controles.

2.2 POBLACION DE ESTUDIO

Mujeres embarazadas del Hospital de la Mujer de Aguascalientes que ingresaron para resolución del embarazo, se usaron muestras tanto de pacientes sanas para controles así como de pacientes con diagnóstico de preeclampsia.

2.3 DESCRIPCION Y OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable independiente: Expresión de los transcritos de los genes GAPDH, PERK, GRP78, IRE-1 y ATF6.

Variable dependiente: Presencia o no del diagnóstico de preeclampsia.

Variables de caracterización: Edad materna, edad gestacional, gestas, preeclampsia en el embarazo previo. Las variables antes mencionadas se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción y operalización de las variables				
VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO Y CARACTERÍSTICAS DE LA VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Transcritos de GAPDH, PERK, GRP 78, IRE-1 y ATF6.	Combinación de los dos alelos (materno y paterno)	Cuantitativa discreta	N/A	

Preeclampsia	Elevación de las cifras tensionales >140/90 y proteinuria >30 mg/dL	Cualitativa nominal	Sí No	Porcentaje
Edad materna	Tiempo cronológico transcurrido desde el nacimiento hasta la evaluación clínica-bioquímica	Cuantitativa discreta	N/A	Años
Edad gestacional	Semanas de vida intrauterina cumplidas hasta la evaluación clínica -bioquímica	Cuantitativa continua	N/A	Semanas
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

2.4. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestreo:

No probabilístico, por conveniencia.

Tamaño de la muestra:

n: 12 casos y n: 10 controles.

2.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN

a) De inclusión

- Pacientes con diagnóstico de preeclampsia (casos) con documentación de proteinuria (>30 mg/dL) e hipertensión arterial (cifras >140/90 mmHg) detectada en dos ocasiones con al menos cuatro horas de diferencia entre cada toma.
- Controles: pacientes que ingresaron 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.

c) De eliminación:

- Pacientes con muestra de placenta inadecuada o insuficiente para obtención de material genético.

2.6 RECOLECCION DE LA INFORMACION

Instrumentos: se recolectó la información clínica, a través de cuestionarios directos a las pacientes, los cuales se integraron a las historias clínicas de los expedientes, estos se realizaron por los médicos de guardia tanto a las pacientes con embarazos normoevolutivos y sanas así como a las pacientes con diagnóstico de preeclampsia que son ingresadas al área de tococirugía.

Logística: Todas las pacientes ingresaron provenientes del área de urgencias o de consulta externa. En los casos, si se detectaron cifras tensionales mayores de 140/90 mmHg, se corroboraron 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. Se verifica que se trate de embarazo mayor a 20 semanas de gestación. 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 muestras de sangre periférica así como una muestra de orina para estudio y clasificación de la enfermedad hipertensiva. Una vez que se obtuvieron estas muestras, se solicitó un perfil toxémico para la clasificación, en el caso de las pacientes con preeclampsia, posterior a la resolución del embarazo se tomó biopsia de las placentas de aproximadamente 1 cm³, las cuales fueron almacenadas en RNA later a 4° C hasta su análisis en el

laboratorio de biología molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes donde se realizaron estudio de PCR.

2.7 PROCEDIMIENTOS

2.7.1 Obtención del mRNA.

a. Homogeneización del tejido y lisis celular. Se usaron 60 mg a 100 mg de tejido en 1ml de trizol y fue homogeneizado usando un triturador de tejidos IKA T18 digital ultra turrax de acuerdo con el protocolo TRIzol Reagent (GIBCOBRL). Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir una adecuada disociación de los complejos núcleo-proteicos. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol. Los tubos se taparon y fueron agitados vigorosamente con la mano durante 15 segundos. A continuación, las muestras se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación la muestra se separó en 4 fases, una fase inferior roja, una fase de fenol cloroformo, una interfase y una fase acuosa sin color. En esta última fase el mRNA se encuentra exclusivamente.

b. Precipitación de mRNA. La fase acuosa incolora fue transferida a un tubo nuevo estéril. El RNA fue precipitado usando 0.5 ml de isopropanol por cada mililitro de trizol usado en la homogeneización inicial. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugadas a 15000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

c. Lavado del mRNA. El sobrenadante fue removido y el mRNA fue lavado usando 1ml de etanol al 75% por mililitro de trizol usado en homogeneización inicial. La mezcla fue agitada y centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

d. Resuspensión del mRNA. Al final del procedimiento el mRNA se dejó secar al aire durante 5 a 10 minutos. El mRNA fue disuelto en 50µl de agua libre de RNAasas y su concentración fue cuantificada con la ayuda de un

nanodrop (THERMO SC CIENTIFICO) obteniendo un radio a A260/280 > 1.6. El mRNA fue almacenado a -70°C hasta su uso.

2.7.2 Síntesis de ADN complementario (cDNA).

El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado a partir de RNAm total, utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT), utilizando como cebador un oligonucleótido poly (dT) y como molde el ARN monocatenario. Luego de desnaturalizar el RNA, mediante calor, el oligonucleótido poly (dT) es alineado con el extremo poly (dA) del RNAm y actúa como templado para la síntesis 5'-3' de una molécula complementaria al RNA, la cual es un cDNA de hebra simple. El cDNA obtenido corresponde a la totalidad de la población de RNAm presente al inicio de la síntesis.

Para la síntesis del cDNA se utilizó un tubo Eppendorf de 0.2 ml en donde se mezcló 1µg de muestra junto con el oligo dT (50µl), RNA y dNTP's aforando el volumen a 12 µl con agua tratada con DEPC (libre de RNasas). Después, se desnaturalizó el RNA a 65°C durante 5 minutos. Una vez desnaturalizado el RNA, se agrega a la mezcla de reacción buffer 5X, DTT (0.1M) y Transcriptasa reversa (SuperScript II, Invitrogen). Después es incubado a 50°C durante 60 minutos, continuo de una incubación a 85°C por un tiempo de 5 minutos para inactivar la reacción. Las muestras de cDNA son utilizadas en los PCR y almacenadas a -20°C.

Tabla 5. Condiciones para la síntesis de cDNA.			
Protocolo de la reacción. Incubar la mezcla de la reacción completa en un termociclador utilizando el siguiente protocolo.			
Componente	Volumen por reacción (µl)	Etapa	Tiempo-temperatura
5x iScript Mix de Reacción	4	Iniciación	5 min - 25° C
iScript Retro	1	Retro transcripción	20 min – 46° C

transcriptasa			
Agua libre de nucleasas	Variable	Inactivación de RT	1 min – 95 ° C
Templado de RNA (100 fg - 1 µg RNA total)	Variable	Peso opcional	Mantener a 4° C
Volumen total	20		

2.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las condiciones de PCR para la amplificación de cada uno de los transcritos se enlistan en la tabla número 6.

Tabla 6. Condiciones generales para la reacción de PCR.						
Mix de reacción	Condiciones del Termociclador	Componentes				
Buffer PCR (10x) MgCl₂ (50 mM) dNTP's (10 mM) Reverse (10 mM) Taq polimerasa (5u/µl) H2O BM Templado 1.0 µl	-	GAPDH	GRP78	IRE-1	PERK	ATF6
	Ciclos	30	30	30	30	30
	-	Tiempo-Temperatura °C				
	Desnaturalización inicial	5 min – 94° C	5 min – 94°C	5 min – 94°	5 min – 94°C	5 min – 94° C
	Desnaturalización	45 seg – 94°	30 seg – 94°C	1 min – 60°C	30 seg – 94°C	30 seg – 60°C
	Alineamiento	30 seg – 57.5°	30 seg – 62°C	1 min – 60°C	30 seg – 62°C	30 seg – 60°C
	Elongación	1 min - 72°	30 seg – 72°C	1 min - 72°	30 seg – 72°C	30 seg – 60°C
	Alineamiento y conservación del producto	5 min – 72°	5 min – 72°	5 min – 72°	5 min – 72°	5 min – 72°C
	- 4°	- 4°	- 4°	- 4°	- 4°	

Tabla 7. Secuencia de los Oligonucleótidos					
GEN	Forward	Reverse	TM	Ciclos	Producto
GADPH	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	57.5	30	411 PB
BIP	GACGGGCAAAGATGTCAGGA	ATCTGGGTTTATGCCACGGG	62	30	355 PB
ERN 1	CCAGTACATTGCCATCGAGC	TCCAGGGATTCTTTTCTATTC	60	30	654 PB
PERK	TTGTCGCCAATGGGATAG	CAGTCAGCAACCGAAACC	62	30	291 PB
ATF6	AACAAGACCACAAGACCA	AGGAGGAACTGACGAACT	60	30	156 PB

2.7.4 Electroforesis.

Los resultados que se generaron por el método de PCR fueron analizados con una electroforesis en gel de agarosa. El gel que se utiliza en esta técnica se tiñe con bromuro de etidio, el cual es un colorante, que tendrá una facilidad de unión a la doble cadena de DNA intercalándose entre las pares de bases. Esto ayudara al momento del análisis con luz UV. Para la preparación de este gel se utilizaron 1.5 g de agarosa y 1x de buffer TAE.

En cada pozo se colocaron los 12.5 microlitros de la reacción de PCR de cada muestra y 3 microlitros de buffer de carga cyan yellow-blue (INVITROGEN). El gel fue sometido a un voltaje de 80 volts de 30-40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el gel fue analizado bajo luz UV en un analizador digital (DNr Bio-Imaging Systems). La imagen se almaceno en un archivo digital y fue utilizada para realizar un análisis densitometrico, usando el software "Image-J" de libre acceso.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis descriptivo de los datos consistirá en frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas nominales y ordinales. Para las variables cuantitativas descriptivas se recabó la información a través de un formato de recolección el cual posteriormente se vació a hojas de cálculo de Microsoft Excel y posteriormente se realizó el análisis estadístico calculando media, desviación estándar y el valor de P a través de la Prueba de t de Student para encontrar diferencias significativas, tomando como referencia un valor menor a 0.05. Para las variables cualitativas descriptivas se realizó el análisis a través de Chi-cuadrada (X_2).

Para el análisis inferencial, los datos numéricos obtenidos fueron analizados estadísticamente para probar diferencias significativas entre los dos grupos, se usó la prueba de t-Student no paramétrica. Los datos fueron considerados estadísticamente diferentes cuando los valores de P fueron menores a 0.05.

2.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para el estudio no se requirió consentimiento informado específico dado que no se transgredió la integridad de la madre y del feto en la obtención de las biopsias. Los procedimientos están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, se tomó en cuenta la declaración de Helsinki de 1964 (AMN), enmendada en Tokio en 1975; así mismo se cuenta con la autorización del Comité Local de Bioética e Investigación.

2.10 RECURSOS PARA EL ESTUDIO

Recursos humanos: Personal médico, médicos residentes, enfermeras y químicos para la recolección de los datos, diagnóstico de las pacientes y análisis de los datos. Se contó con el apoyo del personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para el estudio de las biopsias.

Recursos materiales: Hojas de máquina, plumas, computadoras personales, tubos de muestras, refrigeradores, hieleras para adecuado transporte de muestras, vehículo de transporte y material dispuesto en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Recursos financieros: Los insumos se proporcionaron por parte del Hospital de la Mujer de Aguascalientes y por parto del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

2.11 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

AÑO 2019

ACTIVIDAD	MES												
		E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Planeación del proyecto	P			X	X								
	R			X	X								
Recolección de las muestras	P					X	X		X	X	X	X	
	R					X	X		X	X	X	X	

AÑO 2020

ACTIVIDAD	MES												
		E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recolección de las muestras	P	X	X										
	R	X	X										
Recolección de datos	P					X	X	X					
	R					X	X	X					
Elaboración de proyecto	P								X	X	X		

de tesis	R								X	X	X		
Recolección de resultados	P										X	X	
	R										X	X	
Elaboración de conclusiones	P										X	X	
	R										X	X	
Entrega de reporte final	P											X	X
	R											X	X

2.12 DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en la investigación pueden abrir un nuevo camino en la investigación futura de la relación de la respuesta a proteínas mal conformadas y la fisiopatología de la preeclampsia, con esto pueden detectarse nuevas dianas terapéuticas, así como abrir camino a nuevos estudios para detectar si la UPR puede servir también como factor pronóstico de la enfermedad.

CAPITULO 3. RESULTADOS

Comparación de las características demográficas y obstétricas entre grupos

Se recabó la información clínica tanto de las pacientes sanas como de las pacientes con preeclampsia a partir del expediente clínico individual. Para cada una de ellas se hizo un registro de datos a través de un formato de recolección el cual se vació en hojas de cálculo de Microsoft Excel y posteriormente se realizó el análisis estadístico calculando media, desviación estándar y el valor de P a través de la Prueba de t de Student para encontrar diferencias significativas, tomando como referencia un valor menor a 0.05.

Tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron un total de 22 pacientes, se analizaron un total de 10 muestras de placenta de pacientes sanas, y un total de 12 muestras de pacientes con preeclampsia, la información recabada así como el número de expediente se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Muestras de placenta de pacientes sanas y con preeclampsia

Muestra	Expediente	Diagnóstico	Muestra	Expediente	Diagnóstico
1	3216-19	Sana	11	6678-19	Preeclampsia
2	4653-19	Sana	12	6280-19	Preeclampsia
3	5202-19	Sana	13	1026-20	Preeclampsia
4	6765-20	Sana	14	7210-19	Preeclampsia
5	4795-19	Sana	15	3145-19	Preeclampsia
6	6098-19	Sana	16	10546-19	Preeclampsia
7	5885-19	Sana	17	7374-19	Preeclampsia
8	10512-18	Sana	18	12730-19	Preeclampsia
9	8150-19	Sana	19	11851-19	Preeclampsia
10	8830-19	Sana	20	7816-19	Preeclampsia
			21	4376-19	Preeclampsia
			22	9367-19	Preeclampsia

Se investigó para cada muestra tanto de pacientes sanas como de pacientes con preeclampsia la edad de la paciente, el número de gestas, el número de partos, cesáreas y abortos, la edad gestacional al momento de la interrupción del embarazo y el antecedente de preeclampsia en embarazos previos.

Al comparar las características demográficas entre ambos grupos, se encontraron diferencias significativas solamente en la edad gestacional (39.3 ± 1.07 versus 36.4 ± 1.73 ; $p=0.0001$) y en el número de gestas (1.9 ± 0.83 versus 1.4 ± 0.49 ; $p= 0.04$). En las demás características obstétricas de las pacientes no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, esta información se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Comparación de características demográficas y obstétricas entre casos y controles

Características	Controles (n=10)	Casos (n=12)	Valor de P
Edad materna	22.7 ± 4.6	24.3 ± 7.2	0.274
Edad gestacional	39.3 ± 1.07	36.4 ± 1.73	0.0001
Gestas	1.9 ± 0.83	1.4 ± 0.49	0.04
Partos	0.5 ± 0.67	0.16 ± 0.37	0.06
Cesáreas	0.3 ± 0.64	0.25 ± 0.43	0.41
Abortos	0.1 ± 0.3	0 ± 0	0.12

Comparación de antecedente de preeclampsia entre los dos grupos

Para ambos grupos se investigó el antecedente de preeclampsia en embarazos previos, encontrando que en el grupo de controles se presentó el antecedente en un 10% y en el grupo de las pacientes con preeclampsia en un 33.33%, al calcular el valor de X_2 se obtiene un resultado de 1.69. Con este valor se calcula el valor de $p = 0.19$, por lo que no se considera estadísticamente significativo.

Tabla 10. Comparación de antecedente de preeclampsia en embarazos previos

Antecedente	Controles (n=10)	Casos (n=12)	Valor de X_2	Valor de p
Preeclampsia en embarazos previos	10% (1)	33.33% (4)	1.69	0.19

Comparación de la amplificación de los transcritos de los genes GRP78, PERK, IRE1 Y ATF6

Para cada una de las muestras de placenta sanas y con preeclampsia se amplificaron los transcritos para el gen de GADPH como control de carga, posteriormente se procedió a la amplificación por RT-PCR de los transcritos de los genes de GPR78, PERK, IRE 1 Y ATF6, obteniendo señal de amplificación con los tamaños esperados para cada uno de los genes analizados. En la figura No. 5 se muestra un gel representativo que abarca 5 placentas sanas y 5 placentas con preeclampsia, se incluyó un control negativo el cual contiene RNA pero no se le agrego la enzima transcriptasa reversa (RT).

Figura 5. Gel representativo de la amplificación de los transcritos GAPDH, GRP78, PERK, IRE1 y ATF6.

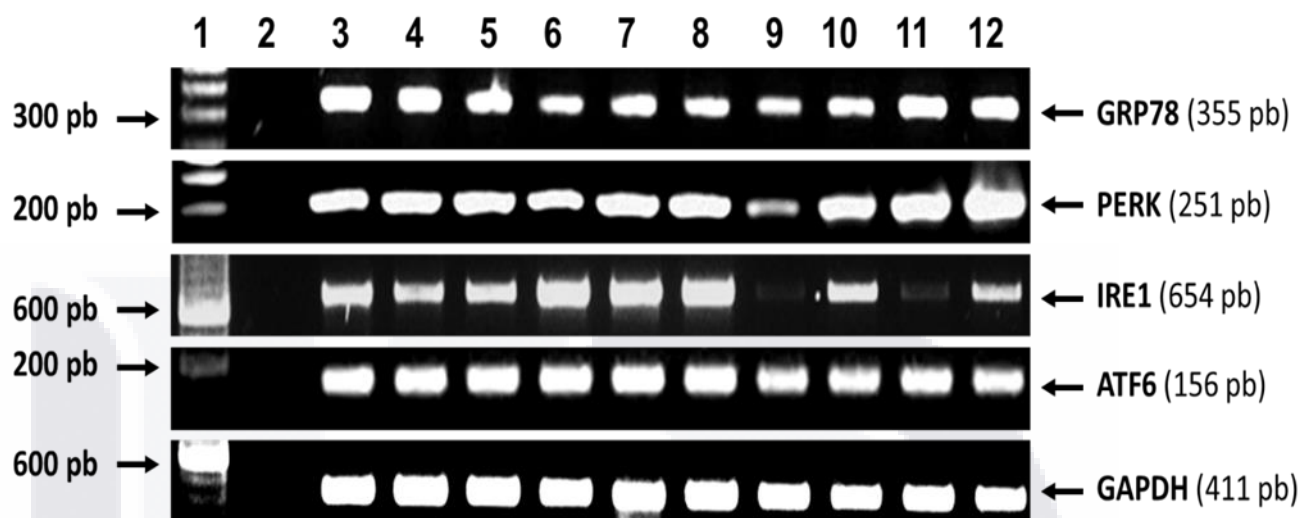


Fig. 5 Gel representativo de la amplificación de los transcritos GAPDH, GRP78, PERK, IRE1 y ATF6. Electroforesis de los productos de PCR amplificados. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de 100 pb. Carril 2: control negativo (sin RT). Carriles 2-7: muestras de placentas sanas. Carriles 8-12: muestras de placenta con preeclampsia.

Análisis densitométrico de la amplificación de los genes GRP78, PERK, IRE1 y ATF6.

Se analizó la expresión de GRP78 en relación con la amplificación de GAPDH tanto en muestras sanas como en muestras de preeclampsia. En la figura 6 se presenta el resumen del análisis densitométrico, la expresión relativa del mRNA de GRP78. Para las muestras sanas la expresión media de GRP78/GAPDH fue de: 0.6956 ± 0.07623 , mientras que la expresión media de GRP78/GAPDH para las muestras con preeclampsia fue de: 0.9630 ± 0.05647 . En este experimento se observa diferencia significativa ($p=0.0094$) con la prueba de t-Student no paramétrica, donde se muestra que GRP78 se expresa en un 40% más que en el tejido sano.

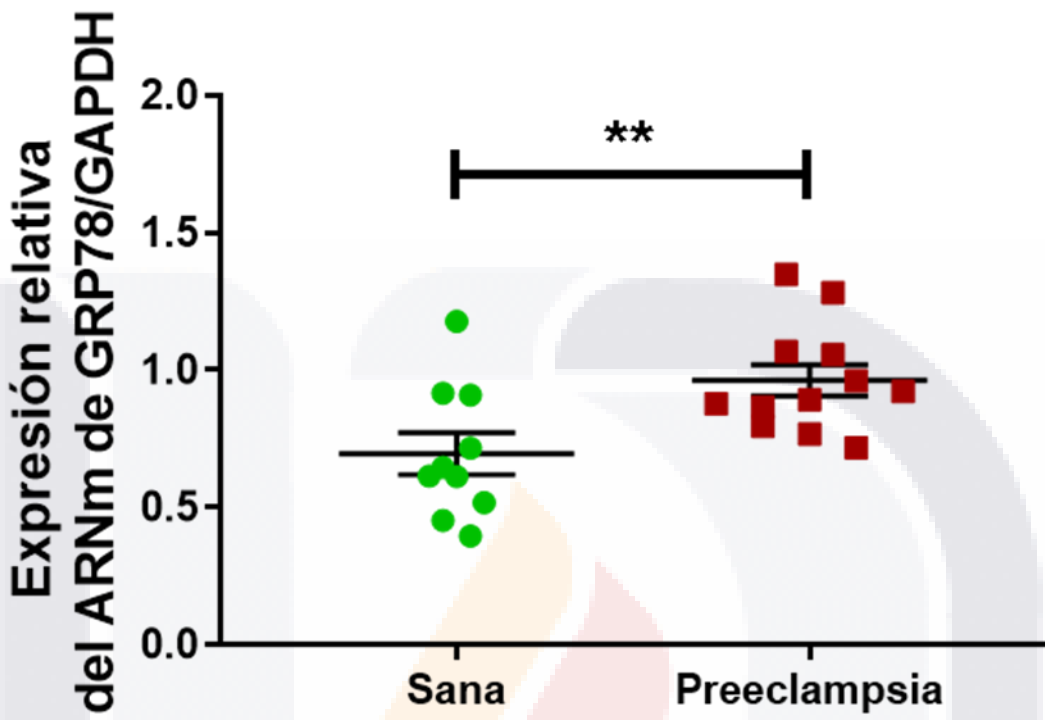


Figura 6. Análisis de la expresión relativa del ARNm de GRP78. Las líneas horizontales en color negro representan la media \pm SEM. Los círculos verdes representan 10 muestras sanas y los cuadrados rojos, representan 12 muestras con preeclampsia, cada uno son experimentos independientes. Se denota diferencia significativa, ** $P < 0.01$, t-Student no paramétrica.

A continuación, se analizó la expresión de PERK en relación con la amplificación de GAPDH tanto en muestras sanas como en muestras de preeclampsia. En la figura 7 se presenta el resumen del análisis densitométrico de la expresión relativa del mRNA de PERK. Para las muestras sanas la expresión media de PERK/GAPDH fue de 0.7502 ± 0.08096 , mientras que la expresión media de PERK/GAPDH para las muestras con preeclampsia fue de: 0.9254 ± 0.07148 . En este experimento no se observa diferencia estadística ($p=0.2030$), t-Student no paramétrica.

Figura 7. Análisis de la expresión relativa del ARNm de PERK

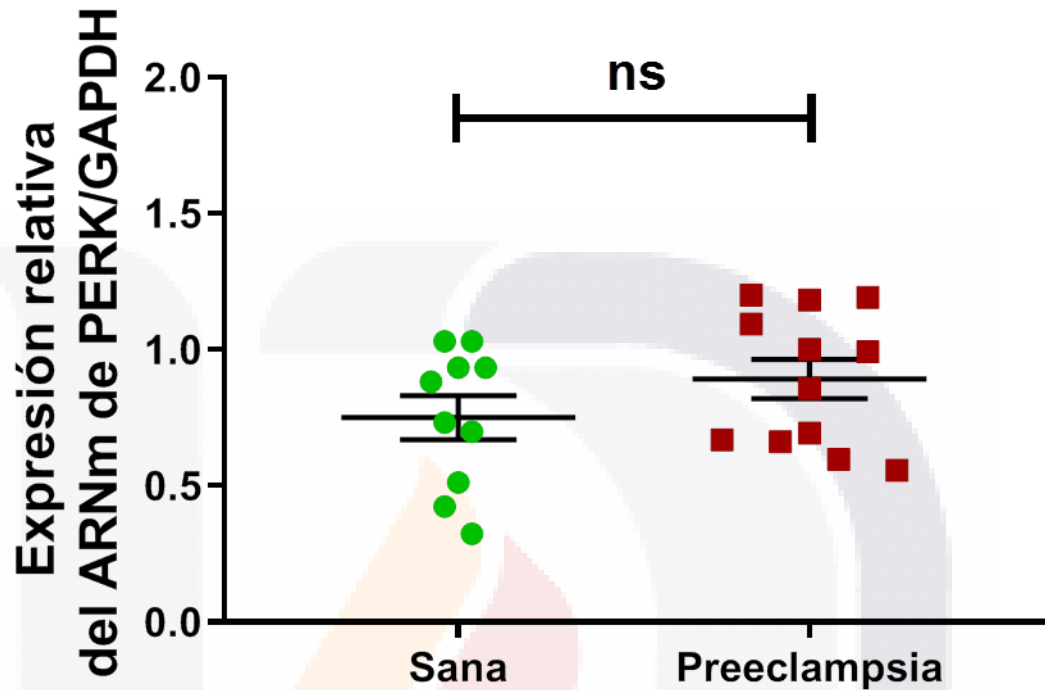


Figura 7. Análisis de la expresión relativa del ARNm de PERK. Las líneas horizontales en color negro representan la media \pm SEM. Los círculos verdes representan 10 muestras sanas y los cuadrados rojos, representan 12 muestras con preeclampsia, cada uno son experimentos independientes, ns= no significativo, $P > 0.05$, t-Student no paramétrica.

Del mismo modo que los experimentos anteriores, se analizó la expresión de IRE1 en relación con la amplificación de GAPDH tanto en muestras sanas como en muestras de preeclampsia. En la figura 8 se presenta el resumen del análisis densitométrico la expresión relativa del mRNA de IRE1. Para las muestras sanas la expresión media de IRE1/GAPDH fue de: 0.7235 ± 0.09937 , mientras que la expresión media de IRE1/GAPDH para las muestras con preeclampsia fue de: 1.027 ± 0.07116 . Este resultado muestra que existe una diferencia significativa

($p=0.0194$) con la prueba de t-Student no paramétrica, en base a este análisis podemos decir que IRE1 se expresa en más de un 40% que en el tejido sano.

Figura 8. Análisis de la expresión relativa del ARNm de IRE1

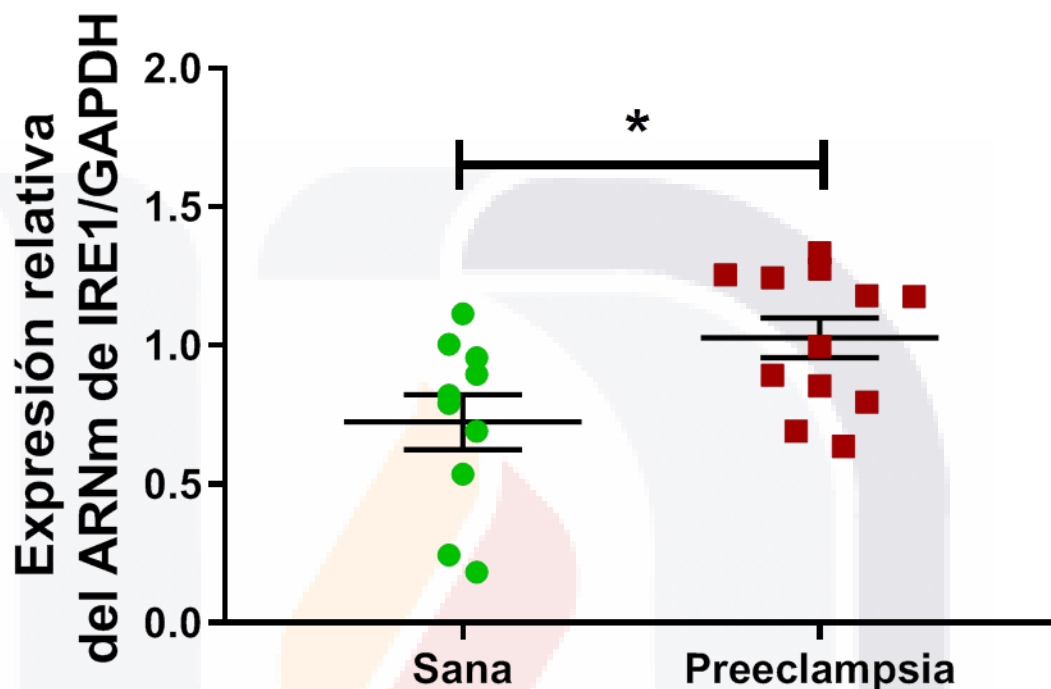


Figura 8. Análisis de la expresión relativa del ARNm de IRE1. Las líneas horizontales en color negro representan la media \pm SEM. Los círculos verdes representan 10 muestras sanas y los cuadrados rojos, representan 12 muestras con preeclampsia, cada uno son experimentos independientes. Se denota diferencia significativa, * $P<0.05$, t-Student no paramétrica.

Finalmente, se analizó la expresión de ATF6 en relación con la amplificación de GAPDH tanto en muestras sanas como en muestras de preeclampsia. En la figura 9 se presenta el resumen del análisis densitométrico la expresión relativa del mRNA de ATF6. Para las muestras sanas la expresión media de ATF6/GAPDH fue de: 0.9598 ± 0.04086 , mientras que la expresión media de ATF6/GAPDH para las muestras con preeclampsia fue de: 0.9294 ± 0.04150 . En este experimento en particular, se analizaron 10 muestras sanas y 10

muestras con preeclampsia, lo anterior debido a que, en 2 muestras de preeclampsia (muestras 10 y 11), el DNA obtenido fue insuficiente para realizar el experimento, sin embargo, esto no fue limitante para el resultado obtenido, pues la tendencia a no presentar diferencia es muy clara ($p=0.6079$). t-Student no paramétrica.

Figura 9. Análisis de la expresión relativa del ARNm de ATF6

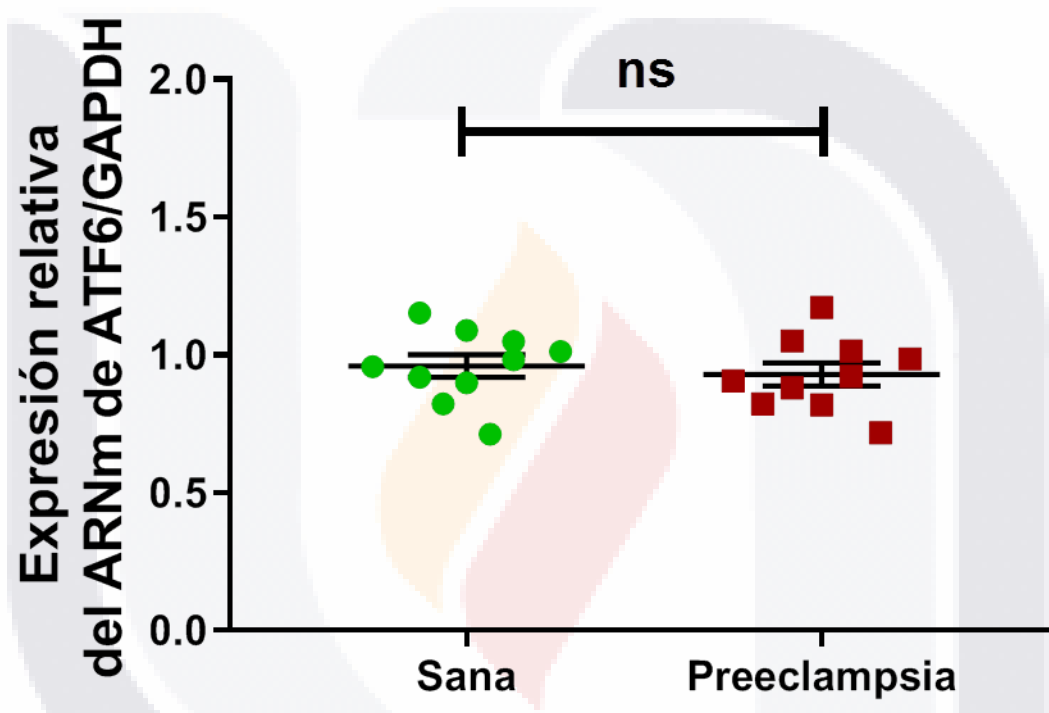


Figura 9. Análisis de la expresión relativa del ARNm de ATF6. Las líneas horizontales en color negro representan la media \pm SEM. Los círculos verdes representan 10 muestras sanas y los cuadrados rojos, representan 10 muestras con preeclampsia, cada uno son experimentos independientes, ns= no significativo, $P>0.05$, t-Student no paramétrica.

CAPITULO 4. DISCUSIÓN

A nivel celular, el mantenimiento del medio interno en equilibrio es fundamental para un estado de salud óptimo, sin embargo, cuando factores internos o externos de estrés se manifiestan sobre las células y tejidos, este equilibrio puede enfrentarse a desregulaciones que pueden conducir al desarrollo de alguna enfermedad que puede afectar a órganos o sistemas. Ante un escenario adverso, las células cuentan con maquinarias y vías de señalización especializadas para restaurar tal equilibrio (Lorenzon-Ojea et al., 2020). Uno de los mecanismos que tienen relevancia en este sentido es la respuesta a proteínas mal plegadas (RPMP) cuyos elementos de respuesta a estrés está conformada por PERK, IRE1 y ATF6, los cuales tienen la función de transducir señales intracelulares, y son regulados por la proteína chaperona GRP78. La activación de estos elementos eventualmente dirige el destino de la célula, ya sea para restaurar la homeostasis o conducir a su muerte, tales eventos dependen de la intensidad del estímulo estresante (Bastida-Ruiz et al., 2017). Los elementos de la UPR están localizados en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Entre las causas de la producción de estrés del RE se encuentran: la acumulación de proteínas mal plegadas, desbalance en la regulación redox y por el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Chaudhari et al., 2014).

En este trabajo estudiamos muestras de placentas de pacientes sanas así como placentas de pacientes que padecían preeclampsia, dentro de las variables descriptivas que estudiamos se encuentra la edad materna, la edad gestacional, el número de gestas, cesáreas, partos y abortos, así como el antecedente de preeclampsia en embarazos previos, encontrando solamente diferencia estadísticamente significativa para el caso de la edad gestacional (39.3 ± 1.07 versus 36.4 ± 1.73 ; $p=0.0001$) y en el número de gestas (1.9 ± 0.83 versus 1.4 ± 0.49 ; $p= 0.04$); en las demás variables estudiadas no encontramos diferencias entre el grupo de pacientes sanas y pacientes que presentaron preeclampsia.

En primer lugar, la edad gestacional al momento de la interrupción en el grupo de pacientes con preeclampsia fue menor que en el grupo de controles, esto

debido a que se considera la interrupción del embarazo como el tratamiento definitivo de la preeclampsia y la recomendación es que en embarazos de 37 semanas o más se realice la interrupción inmediata, en el caso de pacientes con preeclampsia con criterios de severidad y embarazos entre la semana 32 a 36.6, si las condiciones son estables se recomienda la maduración pulmonar y posteriormente la interrupción del embarazo, aun cuando no se ha llegado al término (IMSS, 2017). Es por tal motivo que es más común encontrar edades gestacionales menores en un embarazo complicado con preeclampsia versus un embarazo sano, el cual por lo general llegará a las semanas 39 o 40 de gestación, lo cual coincide a lo observado en nuestro estudio.

En segundo lugar, se observa diferencia en el número de gestas (1.9 ± 0.83 versus 1.4 ± 0.49 ; $p= 0.04$) siendo mayor el número de gestas en el grupo de los controles, se observó, al recabar los datos clínicos, que la mayoría de las integrantes del grupo de pacientes con preeclampsia cursaban con su primer embarazo. Como se mencionó previamente por lo general la preeclampsia es más frecuente en primigrávidas, debido a los diferentes mecanismos inmunes por los que el cuerpo de la mujer atraviesa, creando una baja tolerancia a los antígenos paternos presentes en el líquido seminal, por lo que se considera factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia (Redman & Sargent, 2010).

En relación a la expresión de los transcritos de GAPDH, PERK, GRP 78, IRE-1 y ATF6, hemos encontrado que los genes que producen las proteínas GRP78 e IRE1 se encuentran elevadas de manera significativa en las muestras de placenta con preeclampsia (figuras 6 y 8). GRP78 puede ser expresada en la membrana del RE de los trofoblastos bajo condiciones de hipoxia o estrés, incluso, a GRP78 se le ha atribuido un papel importante en la placentación, además de una actividad agresiva en la actividad invasora de los citotrofoblastos, lo que ha llevado a pensar que GRP78 pudiera ser un marcador de riesgo en la preeclampsia (Castro-Muñozledo, 2013; Laverrière et al., 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En el caso de IRE1, cuando hay aumento de proteínas mal plegadas, IRE1 se oligomeriza y se auto fosforila quedando activo, entonces, tal acción puede llevar por un lado a la generación de un factor de transcripción conocido como XBP1 que promueve la producción de factores relacionadas con el sistema de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (ERAD, por sus siglas en ingles), la cual es encargada de eliminar el exceso de proteínas mal conformadas y por lo tanto reestablecer la homeostasis celular, sin embargo, si el estrés es continuo e intenso, entonces IRE1 puede conducir a la activación de la quinasa del dominio N-terminal c-JUN (JNK, por sus siglas en inglés) lo cual está estrechamente relacionado con la muerte celular por apoptosis (Szegezdi et al., n.d.). Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo, hemos encontrado que la expresión de los transcritos de IRE1 en muestras de preeclampsia se encuentran elevados, por lo que podemos asumir que las vías de señalización dirigidas por este elemento de la UPR se encuentran activas, sin embargo, es necesario indagar hacia que rutas o vías de señalización están siendo dirigidos, es decir, si a una ruta de sobrevivencia o a una ruta de muerte por apoptosis.

Si bien en nuestro estudio se logra comprobar que la activación de la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas se presenta de manera significativa en mayor frecuencia en las pacientes que presentan preeclampsia versus pacientes sanas, cuenta con la limitante de ser una muestra reducida, esto debido a la disponibilidad de recursos para la realización del estudio de biología molecular, sin embargo, creemos que con este estudio se pueden abrir nuevas pautas para próximos estudios con un número mayor de muestra para confirmar nuestras observaciones.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

En este trabajo encontramos diferencias estadísticamente significativas para el caso de la edad gestacional (39.3 ± 1.07 versus 36.4 ± 1.73 ; $p=0.0001$), presentándose la interrupción del embarazo en edades gestacionales menores en el grupo de pacientes con preeclampsia versus el desarrollo de preeclampsia en el grupo de pacientes sanas. Se encontró además diferencia en el número de gestas (1.9 ± 0.83 versus 1.4 ± 0.49 ; $p= 0.04$), ya que la mayoría de las pacientes del grupo de pacientes con preeclampsia se encontraban cursando su primer embarazo, por lo que la primigravidad se podría considerar un factor de riesgo para

En relación a la expresión de los transcritos de los genes de la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas, hemos encontrado que los genes que producen las proteínas GRP78 e IRE1 se encuentran elevados de manera significativa en las muestras de placenta con preeclampsia, en el caso de GRP78 (0.6956 ± 0.07623 , versus 0.9630 ± 0.05647 ; $p=0.0094$) y en el caso de IRE1 (0.7235 ± 0.09937 versus 1.027 ± 0.07116 ; $p= 0.0194$), lo cual les confiere la posibilidad de usarse como marcadores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia.

Aunque nuestros resultados fueron favorables y se probó nuestra hipótesis se recomienda realizar más estudios, con un número de muestra mayor, el cual es el principal punto en contra de nuestra investigación para correlacionar con los presentes hallazgos.

CAPITULO 6: GLOSARIO

Apoptosis: Es el proceso de muerte celular programada con el fin de eliminar células innecesarias o que se encuentran severamente dañadas.

Baumanometro: Instrumento que permite medir la fuerza que ejerce la sangre sobre las paredes arteriales y de esta manera medir la presión arterial.

Epigastralgia: Se refiere a la presencia de dolor en el epigastrio.

Fisiopatología: División de la biología que se encarga del estudio del funcionamiento de un organismo o de un tejido durante el curso de una enfermedad.

Homeostasis: Conjunto de fenómenos de autorregulación, los cuales se dirigen al mantenimiento de una constancia en las propiedades del medio interno de un organismo.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad en una población que se diagnostican en un periodo de tiempo, por ejemplo cada año.

Nucleótido: Compuesto orgánico formado por una base nitrogenada, un azúcar y un ácido fosfórico, el cual conforma los ácidos nucleicos del núcleo celular.

Madurez pulmonar: Grado de preparación del pulmón del feto para respirar sin ayuda al nacer, lo cual depende del surfactante alveolar.

Proteinuria: Presencia de proteínas en la orina. Se presenta como la excreción urinaria de proteínas superior a 150 mg en 24 horas.

Retículo endoplásmico: Red de membranas dentro de la célula a través del cual se mueven las proteínas y otras moléculas.

TRIzol: Reactivo que es empleado para la extracción de ARN y ADN, tanto en tejidos de origen animal como vegetal.

Trombocitopenia: Afección en el organismo el cual cuenta con disminución en las plaquetas, células que se encargan de la coagulación de la sangre.

CAPITULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalos, E., Cuesta, C., Carroli, G., Qureshi, Z., Widmer, M., Vogel, J. P., Souza, J. P., & WHO Multicountry Survey on Maternal. (2014). 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 : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *121 Suppl*, 14–24. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12629>
- ACOG. (2019). *Clinical Management Guidelines for Obstetrician – Gynecologists, Gestational Hypertension and Preeclampsia*. *133*(1), 1–25.
- Bastida-Ruiz, D., Aguilar, E., Ditisheim, A., Yart, L., & Cohen, M. (2017). Endoplasmic reticulum stress responses in placentation - A true balancing act. *Placenta*, *57*, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.004>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. *2*(June), 1–7. [papers://2da1dc00-8ef8-49ed-93f8-79080a9217f1/Paper/p540](https://doi.org/10.1016/j.papers.2000.06.004)
- Burton, G. J., & Yung, H. (2011). Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, *1*(1), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2010.12.002>
- Castro-Muñozledo, F. (2013). Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing. *Molecular Vision*, *19*(April), 1600–1613.
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., & Lefebvre, C. (2014). A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation , and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00213>
- Chen, Y., & Brandizzi, F. (2014). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *NIH Public Access Trends Cell Biol*, *23*(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Damsky, C. H., & Fisher, S. J. (1998). Trophoblast pseudo-vasculogenesis: Faking it with endothelial adhesion receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(5), 660–666. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80043-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80043-4)

Guadiana, D., Martí, J., Garcí, L., Gonza, M., Herna, F. J., & Martí, E. (2011). Evaluación del índice proteína-creatinina en orina aislada para la predicción de proteinuria significativa durante la gestación. *Elsevier*, 54(5). <https://doi.org/10.1016/j.pog.2011.02.009>

Hernández-Pacheco, J. A., Espino y Sosa, S., Estrada Altamirano, A., Nares Torices, M. A., Ortega Castillo, V. M. D. J., Mendoza Calderón, S. A., & Ramírez Sánchez, C. D. (2013). Diagnóstico y Tratamiento de la preeclampsia y eclampsia en el embarazo , parto y puerperio. *Perinatología y Reproducción Humana*, 24, 262–280.

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Publishing Group*, 13(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>

Hunkapiller, N. M., Gasperowicz, M., Kapidzic, M., Plaks, V., & Maltepe, E. (2011). *A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of preeclampsia*. 2998, 2987–2998. <https://doi.org/10.1242/dev.066589>

IMSS. (2017). *Prevención, diagnóstico y tratamiento de la Preeclampsia en segundo y tercer nivel de atención*.

Karumanchi, S. A. (2016). Angiogenic Factors in Preeclampsia From Diagnosis to Therapy. *Hypertension*, 1072–1079. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06421>

Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2), 280–293.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>

- Lapidus, D. A., Lopez, N., & Malamud, J. (2017). Estados hipertensivos y embarazo. *EURONOISE 2006 - The 6th European Conference on Noise Control: Advanced Solutions for Noise Control*, 1–10.
http://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/Consenso_Fasgo_2017_Hipertension_y_embarazo.pdf
- Laverrière, A., Landau, R., Charvet, I., Irion, O., Bischof, P., Morales, M., & Cohen, M. (2009). GRP78 as a marker of pre-eclampsia: An exploratory study. *Molecular Human Reproduction*, 15(9), 569–574.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap037>
- Li, H., Zhu, X., Fang, F., Jiang, D., & Tang, L. (2014). Down-regulation of GRP78 enhances apoptosis via CHOP pathway in retinal ischemia-reperfusion injury. *Neuroscience Letters*, 575, 68–73.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.05.042>
- Lorenzon-Ojea, A. R., Yung, H. W., Burton, G. J., & Bevilacqua, E. (2020). The potential contribution of stromal cell-derived factor 2 (SDF2) in endoplasmic reticulum stress response in severe preeclampsia and labor-onset. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 2, p. 165386). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.012>
- Magee, L. A., Pels, A., Helewa, M., Rey, E., & von Dadelszen, P. (2014). Diagnosis , Evaluation , and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy : Executive Summary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 36(5), 416–438. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30588-0](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30588-0)
- Martín, L., & Carbajal, G. (2014). SIMPOSIO PREECLAMPSIA, VIEJO PROBLEMA AÚN NO RESUELTO: CONCEPTOS ACTUALES. Actualización en la fisiopatología de la preeclampsia. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 321–331.
- Poon, L. C., Shennan, A., Hyett, J. A., Kapur, A., Hadar, E., Divakar, H., McAuliffe,

F., da Silva Costa, F., von Dadelszen, P., McIntyre, H. D., Kihara, A. B., Di Renzo, G. C., Romero, R., D'Alton, M., Berghella, V., Nicolaides, K. H., & Hod, M. (2019). The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 145(S1), 1–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12802>

Powe, C. E., Levine, R. J., & Karumanchi, S. A. (2011). Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: The role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*, 123(24), 2856–2869. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853127>

Redman, C. W. G., Sacks, G. P., & Sargent, I. L. (1999). *Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy*. 499–506.

Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2010). Immunology of Pre-Eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 534–543. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x>

Roggensack, A. M., Zhang, Y., & Davidge, S. T. (1999). Evidence for Peroxynitrite Formation in the Vasculature of Women With Preeclampsia. *Hypertension*, 83–89.

Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>

Say, L., Chou, D., Gemmill, A., Tunçalp, Ö., Moller, A., Daniels, J., Gülmezoglu, A. M., Temmerman, M., & Alkema, L. (2014). Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *The Lancet*, 323–333. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70227-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70227-X)

Schroder, M., & Kaufman, R. J. (2005). THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>

Soto, C., & Hetz, C. (2010). Stressing Out the ER: A Role of the Unfolded Protein Response in Prion-Related Disorders. *Curr Mol Med*, 6(1), 37–43.

Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (n.d.). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7(9), 880–885.

Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., & Lee, A. S. (2009). Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(9), 2307–2316.
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2485>

Woehlbier, U., & Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome : A matter of life and death. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 329–337.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.001>

Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203), 455–462.
<https://doi.org/10.1038/nature07203>

CAPITULO 8: ANEXOS

ANEXO A: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LAS PACIENTES

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
1. Nombre de la paciente:	
2. Número de expediente:	
3. Edad de la paciente:	
4. Edad gestacional al momento de la interrupción:	
5. Número de gestas:	
6. Número de cesáreas:	
7. Número de partos:	
8. Número de abortos:	
9. Antecedente de preeclampsia en embarazos previos:	
10. La paciente cuenta con alguna comorbilidad:	