



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

“Determinación de anticuerpos anti Gonadotropina Coriónica Humana en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.”

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

Presenta:

Dr. Miguel Ángel Domínguez Mena

DIRECTOR:

D.C. María Alicia Díaz y Orea

CO-DIRECTOR:

D.C. Juan Carlos Flores Alonso

Puebla, México, marzo 2017

Esta Tesis fue realizada con el apoyo del Posgrado de la Maestría en
Ciencias Médicas e Investigación

Agradecimientos institucionales:

Al posgrado de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación por el apoyo económico otorgado para la realización de la investigación.

Al CONACyT (beca # 403794).

Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente IMSS

Agradecimientos

- A Dios nuestro Señor: por mantenerme en la existencia y haberme dirigido al estudio y la práctica de la medicina
- A mi esposa e hijos: la razón de mi felicidad y motivos primarios de todos mis esfuerzos y deseos de superación
- A mi madre: ejemplo de vocación médica, maestra y mejor amiga
- A mi padre: por su ejemplo de vida y amor incondicional
- A mi directora de Tesis la DC. Ma. Alicia y mi co-director el DC Juan Carlos, por sus enseñanzas, asesoría, generosidad y paciencia
- A mis compañeros de Maestría por todos los momentos compartidos y su ejemplo de dedicación y esfuerzo

INDICE

RESUMEN	8
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
Antecedentes Generales.....	12
Preeclampsia.....	12
Factores de riesgo.....	13
Fisiopatología.....	16
Teoría inmunológica.....	18
Factores predictores	21
Gonadotropina coriónica humana.....	21
Antecedentes Específicos	26
HCG y preeclampsia.....	26
Autoanticuerpos anti-HCG.....	28
JUSTIFICACIÓN	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
Pregunta de investigación	
HIPÓTESIS	34
Nula.....	34
Alternativa.....	34
OBJETIVOS	34
Objetivo General.....	34
Objetivos Particulares.....	34
MATERIAL Y MÉTODO	35

Diseño del Proyecto.....	36
Tipo y características del estudio.....	36
Definición del universo de trabajo.....	36
Población fuente.....	36
Definición de unidades de observación.....	36
Criterios de inclusión.....	36
Criterios de Exclusión.....	36
Criterios de Eliminación.....	36
Estrategia de muestreo.....	36
Definición de variables y unidades de medición.....	37
Técnicas y procedimientos.....	38
ANALISIS DE LOS DATOS	40
BIOÉTICA	41
LOGÍSTICA	42
Recursos Humanos	
Recursos Materiales	
Recursos Financieros	
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS	64

INDICE DE CUADROS, FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

CUADRO 1: Factores de riesgo para preeclampsia.....	15
CUADRO 2: Acción de la gonadotropina coriónica humana sobre las diferentes células del sistema inmunológico, células endoteliales y embrionarias:	29
CUADRO 3: Publicaciones relacionadas con la presencia de anticuerpos anti gonadotropina coriónica humana en grupos heterogéneos de pacientes.....	31
DIAGRAMA 1: Teoría inmunológica de la preeclampsia.....	20
GRÁFICA 1: Distribución de edades cronológicas.....	44
GRÁFICA 2: Distribución de edades gestacionales.....	45
GRÁFICA 3: Distribución de proteinuria en casos.....	47
GRÁFICA 4: Diferencia de medias en anticuerpos anti-HCG entre casos y controles	49
GRÁFICA 5: Correlación entre densidades ópticas de anticuerpos anti-hCG y concentración de hCG.....	51
TABLA 1: Prevalencia de anticuerpos anti HCG.....	47
TABLA 2: Concentración de anticuerpos anti-HCG.....	48
TABLA 3: Medias de concentración de HCG entre casos y controles.....	50

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La preeclampsia es la más común de las complicaciones médicas durante el embarazo y una de las primeras causas de mortalidad materna en México y el mundo. Su fisiopatología es compleja y una de las teorías más aceptadas es la teoría inmunológica. La Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) es el primer mensajero hormonal producido por el ser humano y vital regulador bioquímico de la relación materno embrionaria. Existe evidencia creciente sobre la importancia de la hCG en la invasión de la decidua endometrial por parte del trofoblasto. Existen reportes de la existencia de anticuerpos naturales contra la hCG en diversos grupos de pacientes. Hasta el momento, no existen reportes sobre la incidencia de estos anticuerpos en mujeres embarazadas y tampoco la comparación de las concentraciones de los mismos entre mujeres con y sin preeclampsia.

MATERIAL Y METODOS: Se realizó un estudio transversal de casos y controles. Se incluyó a una cohorte de 60 primigestas con embarazos de tercer trimestre, 30 casos fueron diagnosticados con preeclampsia y fueron pareadas según edad cronológica y edad gestacional con 30 controles sanas. Se realizó detección y cuantificación de anticuerpos anti-hCG mediante ELISA y posteriormente cuantificación de hCG mediante quimioluminiscencia.

RESULTADOS: La prevalencia de anticuerpos (IgGs) antigonadotropina coriónica humana fue del 78.3% sin diferencia significativa entre casos y controles ($p \leq 0.754$). Se encontró una diferencia significativa en el título de anticuerpos según densidades ópticas entre las medias de casos (0.2340 DO) y controles (0.0993 DO) ($p \leq 0.012$). No se encontró diferencia significativa en las concentraciones de hCG entre grupos ($p \leq 0.772$) ni correlación entre el título de anticuerpos y concentración sérica de hCG.

CONCLUSIONES: La prevalencia de anticuerpos anti-hCG en mujeres mexicanas embarazadas es alta. Existe diferencia significativa en el título de anticuerpos anti-hCG en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.

PALABRAS CLAVE: Preeclampsia, Anticuerpos anti-gonadotropina coriónica humana (anti-hCG).

ABREVIATURAS

BUAP: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CIBIOR: Centro de Investigación Biomédica de Oriente

CONACyT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DO: Densidades Ópticas

FSH: Hormona folículo estimulante

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

HCG: Gonadotropina coriónica humana

HELLP: Hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y trombocitopenia

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

IgG: Inmunoglobulina tipo G

IL-10: Interleucina 10

IL-18: Interleucina 18

IL-27: Interleucina 27

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LH: Hormona Luteinizante

NK: células asesinas naturales

OMS: Organización Mundial de la Salud

PIGF: Factor de crecimiento de origen placentario

SAAF: Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos

SDG: Semanas de gestación

sFlt1: factor 1 de crecimiento endotelial soluble en suero

SSA: Secretaría de Salud

TNF α : Factor de necrosis tumoral Alfa

Treg: Linfocitos T reguladores

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia es una enfermedad propia del embarazo, caracterizada por la elevación de cifras tensionales y proteinuria; es la más común de las complicaciones médicas durante el embarazo y su incidencia ha seguido incrementando a nivel mundial, asociada a morbilidad y mortalidad significativa, es responsable de aproximadamente 50,000 muertes maternas al año a nivel mundial (Duley, 2009). En México, la preeclampsia es la primera causa de mortalidad materna directa y se presenta en un 5 a 10% de los embarazos. La Organización Panamericana de la Salud muestra en datos preliminares del 2015, que en México ésta patología fue la responsable del 23.4% del total de las muertes maternas (Freyermuth et al, 2015).

La preeclampsia tiene una fisiopatología compleja, siendo la causa más temprana reconocida una placentación anormal. La invasión inadecuada de las arterias espirales por el citotrofoblasto ha sido descrita por varios investigadores. Estudios recientes demuestran que la invasión uterina por el citotrofoblasto es, de hecho, una ruta de diferenciación celular única, en donde las células embrionarias adoptan ciertos atributos del endotelio materno que reemplazan. En la preeclampsia, este proceso es defectuoso (Fisher et al, 2009).

La Gonadotropina Coriónica Humana (hCG por sus siglas en inglés) es el primer mensajero hormonal producido en el ser humano y vital regulador bioquímico de la relación materno-embrionaria. Es detectable en sangre materna a las pocas horas posteriores a la implantación y se comporta en gran medida como un agonista de la hormona luteinizante (LH), estimulando la síntesis y secreción de hormonas esteroideas por el cuerpo lúteo, el establecimiento de la circulación

materno fetal y la respuesta inmunitaria de tolerancia materna hacia el aloinjerto que es el embrión y posteriormente la unidad feto-placentaria (Litch et al 2007, Kalkunte et al 2011, Cole et al 2012).

Existe evidencia creciente sobre la importancia de la hCG en la invasión de la decidua endometrial por parte del trofoblasto (Herr et al 2007, Norris et al 2011). Como tal, la hCG promueve la apoptosis de las células endometriales, facilitando así la invasión trofoblástica. En estudios *In vitro*, se ha demostrado que estas mismas células endometriales tratadas con hCG inducen también la apoptosis de células T, reduciendo como consecuencia una posible respuesta celular materna en contra del embrión y su implantación (Kayisli et al., 2003). Se ha inferido que la hCG tiene influencia sobre la implantación reduciendo la secreción de citocinas por parte de las células T y NK, así como también se ha visto que disminuye el reclutamiento de células inmunológicas activadas a la interface materno-fetal (Stahn et al., 2005). Por lo anterior, es muy probable que la hCG sea un importante regulador de la profundidad de la invasión embrionaria y una función defectuosa de la hormona ha sido propuesta como causa de una placentación defectuosa. La resultante isquemia tisular pudiera incrementar el riesgo de preeclampsia y, si es muy severa, originar infertilidad y aborto (Kalkunte et al., 2010).

Varios investigadores han reportado la existencia de anticuerpos naturales contra hCG (Wass et al., 1978, Moyle et al 1995, Housseau et al 1995, Amato et al 2002). Otros, a su vez, han demostrado niveles aumentados de hCG en mujeres con preeclampsia establecida, comparadas con mujeres sin preeclampsia y pareadas según edad gestacional (Reyna-Villasmil et al 2010).

A pesar de lo expuesto anteriormente, no existen estudios que hayan determinado la prevalencia y concentración de anticuerpos anti gonadotropina coriónica humana en mujeres con preeclampsia o la incidencia de preeclampsia en mujeres con autoanticuerpos anti-HCG.

ANTECEDENTES GENERALES

Preeclampsia

El embarazo es el período que transcurre entre la implantación del cigoto en el útero, hasta el momento del parto. Se caracteriza por diversos cambios fisiológicos y, a la vez, representa cierta exposición a entidades patológicas propias y exclusivas de este estado. La preeclampsia es una enfermedad específica del embarazo caracterizada por la presencia de hipertensión arterial sistémica asociada a proteinuria significativa en una mujer previamente sana, que se presenta a partir de la semana 20 de gestación. Ocurre en el 2-8% de los embarazos a nivel mundial, con variaciones en la prevalencia según poblaciones (Ghulmiyyah, 2012).

La preeclampsia es la más común de las complicaciones médicas durante el embarazo y su incidencia ha seguido incrementando a nivel mundial, asociada a morbilidad y mortalidad significativa, es responsable de aproximadamente 50,000 muertes maternas al año (Duley, 2009). Por lo anterior, la reducción de la mortalidad materna por esta causa en un 75% entre el periodo que comprende de

1990 al año 2015 es parte de las metas del milenio del plan de la OMS (Ghulmiyyah, 2012).

En México, la preeclampsia es una de las primeras 2 causas de mortalidad materna, presentándose en un 5 a 10% de los embarazos. La Secretaría de Salud reportó 316 defunciones debidas a esta patología en el 2004, lo que corresponde al 29,5% del total de defunciones maternas (Lineamiento Técnico 2007). Aunado a esto, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2007-2010), reportó que la tasa de morbilidad hospitalaria por preeclampsia afecta principalmente a las mujeres embarazadas de 20 a 24 años con tasas de alrededor de 190 por cada 100 mil mujeres en este grupo de edad en este periodo. La preeclampsia no diagnosticada puede generar complicaciones como la eclampsia, que ponen en peligro la vida de la madre y del niño. Ésta última es caracterizada por convulsiones en la mujer embarazada sin relación con una afección cerebral preexistente, que se presentan entre la semana 20 de gestación y la primera semana del posparto y puede ocasionar la muerte. De 2006 a 2010, la tasa de morbilidad hospitalaria más alta por este padecimiento se ubica en las jóvenes gestantes de 15 a 19 años (en 2006 y 2007, 16 casos de cada 100 mil mujeres de 15 a 19 años; durante 2008 y 2010, 17 casos y en 2009, 18 casos; Gutiérrez et al., 2012).

Factores de Riesgo

Los factores de riesgo identificados para preeclampsia incluyen nuliparidad, gestaciones múltiples, historia previa de preeclampsia, obesidad, diabetes mellitus, patología vascular o de tejido conectivo como el Lupus Eritematoso

Sistémico (LES), el Síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SAAF), edad mayor a 35 años en primer embarazo, tabaquismo y ser de raza afroamericana (Osungbade e Ige, 2011) (Cuadro 1).

Entre mujeres primíparas, existe una disparidad entre los diferentes grupos étnicos, habiendo por ejemplo el doble de riesgo para mujeres afroamericanas comparadas con mujeres caucásicas e incidencias mucho más altas en mujeres hindúes y pakistaníes. (tabla 1) (Osungbade e Ige, 2011). La conexión entre estos factores de riesgo y la preeclampsia es escasamente entendida. Las diferencias entre grupos étnicos sugiere un papel preponderante de factores genéticos en la patogénesis de esta enfermedad.

Factores de Riesgo para Preeclampsia

FACTOR DE RIESGO	OR o RR INTERVALO 95%
SAAF	9.7 (4.3-21.7)
Enfermedad Renal	7.8 (2.2-28.2)
Preeclampsia previa	7.2 (5.8-8.8)
LES	5.7 (2.0-16.2)
Nuliparidad	5.4 (2.8-10.3)
Hipertensión Crónica	3.8 (3.4-4.3)
Diabetes Mellitus	3.6 (2.5-5.0)
Altitud importante	3.6 (1.1-11.9)
Gestación múltiple	3.5 (3.0-4.2)
Historia Familiar de cardiopatía	3.2 (1.4-7.7)
Obesidad	2.5 (1.7-3.7)
Historia Familiar de preeclampsia*	2.3 -2.6 (1.8-3.6)
Edad materna avanzada (>40 años)	1.96 (1.34-2.87)

CUADRO 1. Factores de riesgo identificados en población internacional (Osungbade e Ige, 2011)

SAAF: Síndrome de anticuerpos antifosfolípido

LES: Lupus eritematoso sistémico

*preeclampsia severa en madre o hermanas.

Fisiopatología

La mayoría de las teorías sobre la etiología sugieren que la enfermedad es una cascada de eventos fisiopatológicos desencadenada por una combinación entre una respuesta materna proinflamatoria anormal, activación de células endoteliales/daño endotelial y alteraciones inmunológicas (Steinberg et al, 2012, Aggarwal et al, 2011, Hui et al, 2012). Sin embargo, el gatillo inicial que unifica a todas estas alteraciones vasculares, inmunológicas e inflamatorias permanece desconocido.

Durante el embarazo normal, las vellosidades del citotrofoblasto invaden el tercio interno del miometrio y las arterias espirales pierden su endotelio y la mayor parte de sus fibras musculares. Estas modificaciones estructurales están asociadas a modificaciones funcionales tales como que las arterias espirales se transforman a vasos de baja resistencia y menos sensibles (e incluso insensibles) a sustancias vasoconstrictoras.

La causa fisiopatológica más temprana reconocida en la preeclampsia es una placentación anormal. La invasión inadecuada de las arterias espirales por el citotrofoblasto ha sido descrita por varios investigadores (Elosha et al, 2012). Estudios recientes demuestran que la invasión uterina por el citotrofoblasto es, de hecho, una ruta de diferenciación celular única, en donde las células embrionarias adoptan ciertos atributos del endotelio materno que reemplazan. En la preeclampsia, este proceso es defectuoso. (Fisher, *et al.*, 2009)

Una resistencia arterial uterina incrementada induce una mayor sensibilidad a la vasoconstricción y, en consecuencia, isquemia placentaria crónica y estrés oxidativo. Esta isquemia placentaria crónica causa complicaciones fetales tales

como la restricción de crecimiento intrauterino y muertes *in útero*. En paralelo, el estrés oxidativo induce la liberación de diversas sustancias al torrente circulatorio materno, tales como son radicales libres, lípidos oxidados, citocinas y factor 1 de crecimiento endotelial soluble en suero (sFlt11). Estas anomalías son las responsables de la disfunción endotelial, que ocasiona una mayor permeabilidad vascular, trombofilia e hipertensión, en una respuesta para compensar el flujo disminuido de las arterias uterinas secundario a vasoconstricción periférica (Roberts, 1998).

La disfunción endotelial es la responsable de las manifestaciones clínicas en la madre, como lo son el daño del endotelio hepático (que puede evolucionar hasta síndrome de hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia (HELLP), alteración del endotelio cerebral (trastornos del estado de conciencia y eclampsia), y la ya conocida alteración del endotelio renal (glomeruloendoteliosis) que finalmente disminuye la tasa de filtración glomerular y la proteinuria. Por último, la disfunción endotelial generalizada promueve la anemia microangiopática (hemólisis) y aumento de la permeabilidad vascular e hipoalbuminemia (edema y depleción de volumen intravascular) (Roberts 1998).

El factor crucial es entender que la preeclampsia es, como se mencionó anteriormente, la consecuencia de un defecto en la placentación. Para esto, se han concebido 2 teorías principales y que pareciera están interconectadas; la teoría genética y la teoría inmunológica. (Genbacev, *et al.*, 1999, Colbern, *et al.*, 1994, Mutze, *et al.*, 2008.)

Se han identificado algunos genes que parecieran incrementar la susceptibilidad para presentar preeclampsia. Estos genes interactúan en los

sistemas cardiovasculares y hemostáticos, así como en la respuesta inflamatoria. Incluso, algunos estudios sobre genes candidatos han brindado evidencia de interacción poligénica, incluyendo los genes del angiotensinógeno (1-q42-43), y de la óxido nítrico sintetasa (eNOS) (7q36); otros loci importantes son el 2p12, 2p25, 9p13 y 10q22. (Mutze, *et al.*, 2008, Nilsson, *et al.*, 2004)

Teoría inmunológica

La teoría inmunológica de la preeclampsia describe que este padecimiento es una discapacidad del sistema inmunológico materno para reconocer la unidad fetoplacentaria. Una excesiva producción de células inmunológicas del tipo TH1 lleva al incremento de las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNFa) que, a su vez, induce apoptosis del citotrofoblasto (Genbacev, *et al.*, 1999). Además, el sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) aparentemente juega un papel en la invasión defectuosa de las arterias espirales. Lo anterior se ha demostrado dado que las mujeres con preeclampsia presentan niveles reducidos de HLA-G y HLA-E. (Colbern, *et al.*, 1994) (Figura 1).

En embarazos normales, la interacción entre las células maternas y el trofoblasto se realiza por medio de la secreción de factor de crecimiento vascular y factor de crecimiento placentario por las células asesinas naturales (NK). Niveles altos del factor de crecimiento endotelial soluble en suero (sFlt-1), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PIGF), han sido encontrados en mujeres con preeclampsia (Genbacev, *et al.*, 1999, Colbern, *et al.*, 1994). Concordantemente, ensayos de

sFlt-1, PlGF, endoglina y VEGF, demuestran que éstos pudieran ser predictores importantes en preeclampsia ya que se incrementan de entre 4 a 8 semanas previos al establecimiento de la misma (Ahmed, *et al.*, 2011). Datos recientes demuestran el papel protector de la hemo-oxigenasa 1 y su metabolito, el monóxido de carbono, durante el embarazo, e identifican a la misma como un potencial agente terapéutico en la preeclampsia (Ahmed, *et al.*, 2011).

Otros estudios demuestran que la manifestación clínica de la preeclampsia se combina con marcadores de inmunidad elevada, de ambos tipos: autóloga (anticuerpos anticardiolipina) y alogénica (anticuerpos antitrofoblasto). Consecuentemente, se han encontrado niveles más altos de inmunoglobulinas en estas mujeres (Kestlerova, *et al.*, 2012).

Durante el embarazo normal, existe un cambio hacia la respuesta inmune del tipo Th2, que protege al embrión de la respuesta Th1 (citotóxica) y su producción de interleucina 2, 12, interferón gama y TNF α . Luego entonces, la inflamación pareciera ser el eslabón entre la respuesta inmunológica adaptativa y la ocurrencia de preeclampsia (Fisher, *et al.*, 2009). De hecho, toda la respuesta inflamatoria de preeclampsia pareciera favorecer la preponderancia de las reacciones Th1. Inicialmente se pensó que la preeclampsia era únicamente una reacción vascular proinflamatoria materna, con estudios que demostraron tanto abundancia de marcadores solubles de activación de neutrófilos como aumento de la actividad del complemento. Específicamente, el TNF α e interleucina 6 están aumentados en mujeres con preeclampsia (Colbern, *et al.*, 1994). Sin embargo, el rol de la inflamación como causa (y no consecuencia) se debilita por el fracaso de algunos estudios en la demostración de la relación de un incremento en el estado inflamatorio y los datos clínicos de preeclampsia (como es el caso de mujeres

embarazadas con infecciones severas, inflamación excesiva y altas concentraciones de citocinas que no desarrollan preeclampsia) (Elosha, *et al.*, 2012).

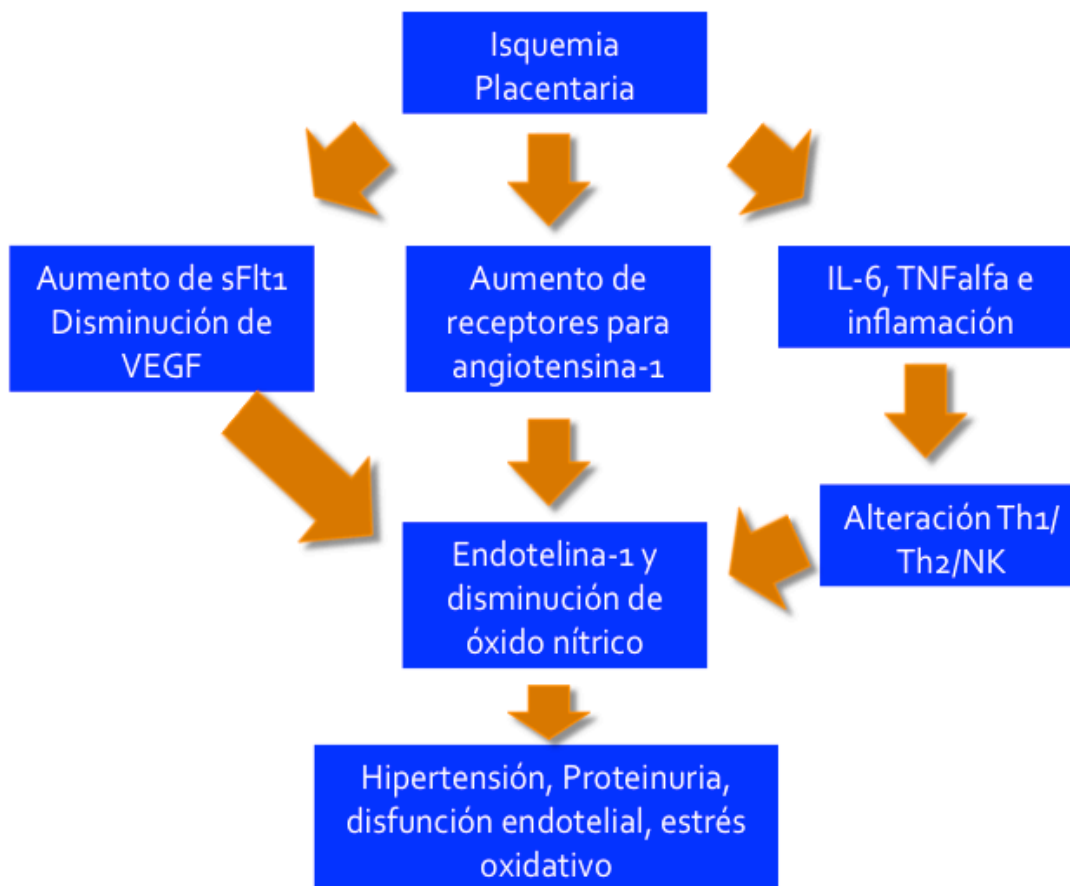


DIAGRAMA 1.- Teoría inmunológica de la preeclampsia

*sFlt1 (Factor de crecimiento endotelial soluble en suero). Th1 (linfocito T cooperador tipo 1). Th2 (linfocito T cooperador tipo 2) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial). IL-6 (interleucina 6). TNFalfa (factor de necrosis tumoral alfa). NK (células natural killer).

Factores predictores

La preeclampsia es, sin duda, una enfermedad para la cual el tamizaje sería óptimo, pues se trata de una enfermedad común, y de importante morbimortalidad materna y neonatal. Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios de tamizaje propuestos en las últimas década, ningún examen ha demostrado la suficiente consistencia o reproducibilidad; y aunque el trabajo de investigación realizado en SFlt-1, PlGF (factor de crecimiento de origen placentario) y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) es prometedor, su valor predictivo positivo en preeclampsia no ha sido evaluado de manera prospectiva. Actualmente, el valor clínico de un examen predictivo para preeclampsia no es del todo claro, dado que aun se carece de alguna maniobra de prevención efectiva. Sin embargo, la evaluación clínica y bioquímica estricta en aquellas mujeres con riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia pudiera disminuir significativamente la incidencia de los efectos adversos perinatales en ambos, madres e hijos (Ghulmiyyah y Sibai, 2012).

Gonadotropina Coriónica Humana

La Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) es el primer mensajero hormonal producido por el ser humano y vital regulador bioquímico de la relación materno-embrionaria. Es detectable en sangre materna a las pocas horas posteriores a la implantación y se comporta en gran medida como un agonista de la hormona luteinizante (LH), estimulando la síntesis y secreción de hormonas esteroideas por el cuerpo lúteo, el establecimiento de la circulación materno fetal

y la respuesta inmunitaria de tolerancia materna hacia el aloinjerto que es el embrión y posteriormente la unidad feto-placentaria. Específica en los humanos, la hCG es una glicoproteína compleja compuesta de dos subunidades glicosiladas y agrupa a todo un subgrupo de moléculas esencialmente similares en estructura peptídica pero con variaciones importantes en lugar de síntesis, glicosilación y probable función biológica. Nuevos descubrimientos en las variaciones estructurales y biológicas de la hormona, así como también la amplia distribución extragonadal de su receptor han abierto un nuevo horizonte en la investigación básica y clínica (Cole et al 2012, Kalkunte et al 2011, Litch 2007).

La hCG es específica de los humanos y los primates antropoides, su estructura completa tiene una masa de 37kDa y sus dos sub-estructuras (cadena alfa y beta) se asocian de forma no covalente. La subunidad alfa contiene 92 aminoácidos y es codificada por un solo gen (CGA) localizado en el cromosoma 6q2.1-23 (Fiddes et al 1981). La subunidad alfa es idéntica a la de otras hormonas hipofisarias, como la hormona luteinizante (LH), la hormona folículoestimulante (FSH) y la hormona estimulante de tiroides (TSH), y contiene dos sitios para la N-glicosilación. En contraste, las subunidades beta son distintas entre si y son las que confieren especificidad a sus diferentes receptores y en consecuencia a la diferencia en su acción biológica. En este caso en específico, la subunidad Beta de la hCG contiene dos sitios para la N-glicosilación y cuatro sitios para la O-glicosilación, contiene 145 aminoácidos y es codificada por seis genes no alélicos, encontrados en el cromosoma 19q13.3 y llamados CGB1, CGB2, CGB2, CGB5, CGB7 y CGB8 (Boorstein 1982). La expresión de la hCG es regulada por hormonas (corticoides, progesterona, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), oxígeno, factores de crecimiento y citocinas como el factor de crecimiento endotelial (EGF), TNFa, activadores del Adenosin monofosfato cíclico (AMPc), por

ligandos del receptor de peroxisoma proliferador activado (PPAR γ) y por el gen homeobox DLX3 (Knofler., 2004).

La síntesis de la hCG se lleva a cabo en el sincitio y citotrofoblasto embrionario y posteriormente en la placenta madura, aunque relativamente nuevas investigaciones han demostrado síntesis extraplacentaria e incluso fetal (Fournier et al., 2015)

La hCG tiene varias formas moleculares, que mientras comparten la secuencia de aminoácidos, difieren una de otra en su estructura y en los detalles de sus cadenas laterales de carbohidratos (Cole, 2012). El peso molecular de los sacáridos acoplados a la hCG puede corresponder hasta un 30% de su peso molecular. Cada uno de los tipos de hCG es producido por un diferente tipo celular y cada una tiene diferentes perfiles biológicos. La hCG y la hCG sulfatada son hormonas producidas por el sinciciotrofoblasto y el gonadotropo pituitario, respectivamente. La hCG hiperglucosilada es producida por el citotrofoblasto placentario y posee efectos autócrinos con un papel preponderante en la reducción de la contractilidad miométrial y la estimulación de la angiogénesis placentaria (Norris et al., 2011).

La unión de la hCG a su receptor (Receptor LH/hCG) activa la vía de la adenil-ciclasa, la fosfolipasa C y los canales iónicos, que a su vez controlan la concentración celular de AMPc, inositol fosfatos y otros segundos mensajeros. El AMPc, a través de la vía de sus cinasas dependientes (PKAs) promueve la fusión del citotrofoblasto y también eleva las concentraciones del RNA mensajero de proteínas específicas que varían enormemente en tipo según la célula diana (Guderman et al., 1992; Keryer et al., 1998).

Además de su bien establecida función en evitar la regresión del cuerpo lúteo, y la estimulación del mismo para la producción ovárica de progesterona, estradiol y estrona durante las primeras seis semanas del embarazo (actuando como un super agonista de LH y mediante la estimulación de las células lúteas a través de su receptor LH/CG, hasta la compensación de la actividad esteroidogénica de la placenta), la hCG tiene un rol preponderante en la promoción de la angiogénesis en el endotelio uterino, la regulación de la invasión y diferenciación trofoblástica, el mantenimiento en la quiescencia miometrial, y la regulación inmunológica mediante la modulación de las células T reguladores (Treg), las células dendríticas, las células NK y los linfocitos B reguladores. Además, la hCG regula la formación del sinciciotrofoblasto en una manera autócrina (Norris et al., 2011) La hCG incrementa la perfusión feto-placentaria por medio de la dilatación de las arterias uterinas (Norris et al., 2011). (Cuadro 2).

La hCG, junto con la LH, podría tener un rol preponderante en el transporte de gametos (masculinos y femeninos), su maduración y la fertilización; así como promover el crecimiento y desarrollo embrionario inicial. De hecho, se piensa que, justo a la llegada del embrión a la cavidad uterina, podría servir como una molécula de comunicación entre el endometrio y el blastocisto (Litch et al 2007, Bourdieck et al., 2013). Siendo el producto inicial de origen embrionario, la hCG es uno de los principales candidatos para dicha relación embrio-miometrial. Las subunidades de hCG se transcriben tan temprano como en el embrión de 8 células (Bonduelle et al., 1988) y el blastocisto a demostrado secretar relativamente altas concentraciones de hormona bioactiva (Lopata 1989). Si esto es cierto, el efecto autócrino y parácrino de la hCG en el endometrio precedería a su función clásica del estímulo del cuerpo lúteo y sería preponderante para la implantación o no-implantación embrionaria.

La hCG promueve una acción inhibitoria anti-macrófago que previene la destrucción o rechazo inmunológico de la unidad feto-placentaria por parte de los tejidos maternos durante el embarazo. La hCG pudiera incluso controlar el crecimiento uterino durante el embarazo, para que este vaya a la par con el crecimiento fetal. Los niveles de hCG caen en las últimas semanas del embarazo para permitir la contracciones inducidas por prostaglandinas y oxitocina (Ambrus et al., 1994). El decremento de la hCG durante el tercer trimestre y, más específicamente las últimas semanas del embarazo, pudiera ser la responsable de la modulación de los receptores miométriales a los uterotónicos, y ser parte fundamental del inicio y la progresión del trabajo de parto normal. (Rao et al., 2015).

Existen estudios que sugieren que la hCG promueve el crecimiento y desarrollo del tejido mamario, a través de su efecto proliferativo intenso sobre las células epiteliales e induciendo diferenciación no reversible hacia células secretoras, las cuales son relativamente inmunes a efectos carcinogénicos y pudiera explicar el factor protector del embarazo para el cáncer de mama (Rao et al., 2004).

La hCG es la responsable de la náusea, vómito, alteración del ciclo sueño/vigilia, etc. durante el embarazo, a través de sus receptores en el sistema nervioso central. Incluso la presencia de receptores vesicales para hCG explicarían la sintomatología urinaria *sui generis* de la mujer embarazada (Rizk et al., 2009).

Se entiende entonces que el embarazo normal es un proceso complejo que requiere de una invasión trofoblástica controlada y de la angiogénesis del

endometrio decidual, así como también de la atenuación de la respuesta inmunológica materna a proteínas halogénicas (Bansal 2010). Esto se logra mediante el incremento en la actividad de las células Treg y en la disminución en la actividad celular Th17. Se ha demostrado que la hCG tiene participación en estas funciones y es secretada por el embrión en desarrollo incluso cuando éste está integrado por tan solo 8 células (Aluvihare et al., 2004; Somerset et al., 2004).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Gonadotropina Coriónica Humana y Preeclampsia

Existe evidencia creciente sobre la importancia de la hCG en la invasión de la decidua endometrial por parte del trofoblasto (Norris et al., 2011, Herr et al., 2007). Como tal, la hCG promueve la apoptosis de las células endometriales, facilitando la invasión trofoblástica. *In vitro*, se ha demostrado que estas mismas células endometriales tratadas con hCG inducen también la apoptosis de células T, reduciendo como consecuencia una posible respuesta celular materna en contra del embrión y su implantación (Kayisli et al., 2003). Se ha inferido que la hCG tiene influencia sobre la implantación reduciendo la secreción de citocinas por parte de las células T y NK, así como también se ha visto que disminuye el reclutamiento de células inmunológicas activadas a la interface materno-fetal (Stahn et al., 2005).

Por lo anterior, es muy probable que la hCG sea un importante regulador de la profundidad de la invasión embrionaria y una función defectuosa de la hormona ha sido propuesta como causa de una placentación defectuosa, aumento de la

isquemia tisular y en consecuencia el establecimiento de preeclampsia (Kalkunte et al., 2010).

La hCG estimula la liberación de VEGF por el endometrio secretor y, a través de él, inhibe la secreción del factor estimulante de colonia de macrófago y el subsecuente reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la implantación (Licht et al., 2007). Aunado a esto, los niveles séricos de hCG se han relacionado inversamente con los niveles de IL-18 cuya acción es también proinflamatoria. Esto realza la importancia de la hCG para reducir la actividad de aquellos factores dañinos para el embrión en la etapa de implantación (Kruse et al., 2000).

En trabajos iniciales, se sugería que la progesterona era la responsable de estimular a las células NK en la proliferación celular en cultivos *in vitro*, sin embargo, la importancia de la hCG ha ganado reconocimiento en este proceso por haberse demostrado que, actuando a través de receptores especiales (receptor de unión a proteína ligado a manosa) en la superficie de las células NK uterinas, se estimula la placentación (Kane et al., 2009). Luego entonces, la hCG juega un papel importante en el mantenimiento del embarazo por medio de la estimulación sobre la diferenciación de aquellas líneas celulares que promueven la tolerancia del feto haploidéptico (Treg) y coordinan la vascularización (células NK) (cuadro 2).

Autoanticuerpos anti-hCG

Anticuerpos naturales contra hCG fueron demostrados por Wass et al., (1978) en mujeres jóvenes, sin embargo, estos anticuerpos se clasificaron con poca afinidad como para ser clínicamente importantes. Moyle et al., (1995) describieron múltiples sitios de acoplamiento de anticuerpos en hCG y la posibilidad de inactivación o disminución de acción biológica por los mismos. Housseau et al., (1995) reportaron anticuerpos contra la subunidad de hCG en pacientes con tumores de vejiga y células germinales de testículo. Su trabajo posterior confirmó que la región inmunogénica se localizaba en los aminoácidos centrales (entre el 20-65) de la subunidad beta. Amato et al., (2002) consideraron a los anticuerpos anti-hCG como la causa de infertilidad secundaria en una mujer con menstruación regular y pérdida gestacional recurrente acompañada de elevados niveles de hCG. Zou et al., (2008) encontraron que el 7% de 236 mujeres con infertilidad primaria o secundaria tenían anticuerpos anti hCG y que estos declinaban posteriormente al tratamiento con dexametasona, vitamina C y D, con mejoría en las tasas de

implantación. Los niveles fueron comparables con aquellos vistos en mujeres con síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SAAF) y anticuerpos antitrofoblasto. No existe consenso sobre la concentración de anticuerpos contra hCG que pudieran ser patológicos, aunque la mayoría de los autores fijan el punto de corte en 50ng/ml como significativo (Zou, 2008) (CUADRO 3).

Acción de la Gonadotropina Coriónica Humana

Tipo de Célula	Acción de hCG	Mecanismo de Efecto	Función Alterada	Autor
Dendrítica	Reducción de presentación de Antígeno y disminución de proliferación	Incremento de indolamina dioxigenasa	Incremento de Th1/Th17	Kayisil, 2003
Treg	Reclutamiento a interface materno-fetal incremento de IL-10	Decremento de Th1/17	Rechazo embrionario/fetal	Sthan, 2005
NK	Reducción de activación de NKs periféricas, Regulación de NKs uterinas	Decremento de ataque fetal, coordinación de la invasión trofoblástica	Placentación anormal, rechazo embrionario	Kalkunte 2010
Trofoblasto extraveloso	Invasión de arterias espirales, apoptosis de células T activadas	Regulación de expresión de fas/fasL	Placentación anormal, células T citotóxicas	Foidart, 2009
Endoteliales	Incremento de la proliferación endotelial, adhesión leucocitaria disminuida	Estimulación de VEGF	Disminución del flujo en lecho placentario incremento de reclutamiento leucocitario	Licht 2007

CUADRO 2.-Acción de la hCG sobre diferentes células del sistema inmunológico, células endoteliales y embrionarias.

Treg (linfocito T regulador), NK (célula natural killer), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial)

Reyna-Villasmil et al., (2010) encontraron niveles aumentados de hCG en mujeres con preeclampsia establecida, comparadas con mujeres sin preeclampsia y pareadas según edad gestacional; (grupo A (n=50 con preeclampsia) 47661mU/ml vs grupo B (n= 50, controles normotensas) 27,459 mU/ml, $p<0.05$). No se tiene conocimiento de la causalidad de este fenómeno y pudiera corresponder a una compensación de un sistema de retroalimentación en presencia de respuesta o actividad disminuida de esta hormona. No existen, a nuestro conocimiento y según nuestro alcance de búsqueda en la literatura médica actual, estudios que hayan determinado la prevalencia de anticuerpos anti hCG en mujeres con preeclampsia, o, por otro lado, la incidencia de preeclampsia en mujeres con autoanticuerpos anti-hCG (*in vivo o in vitro*). El racional del estudio en cuestión radica en que la existencia de anticuerpos anti hCG y su acoplamiento a la misma pudiera repercutir en su afinidad con su receptor (receptor de LH) y/o afectar su biodisponibilidad y, en consecuencia, su acción biológica.

Anticuerpos anti Gonadotropina Coriónica Humana

AUTOR	POBLACIÓN	ESTUDIO	RESULTADO
Wass, 1978	Mujeres jóvenes (infertilidad, núbiles, sanas)	Transversal, comparativo	Anticuerpos anti hCG de baja afinidad, de desconocida importancia clínica. Sin diferencias entre grupos.
Housseau, 1995	Pacientes con tumores vesicales y testiculares	Transversal, descriptivo	Presencia de anticuerpos anti hCG, región inmunogénica central.
Amato, 2002	Paciente con infertilidad secundaria	Descripción de un caso	Concentraciones altas de anticuerpo anti-hCG y altos niveles de hCG
Zou, 2008	Pacientes con infertilidad	Transversal, descriptivo	Anticuerpos anti-hCG en el 7%, remisión con terapia esteroidea.

CUADRO 3. Publicaciones relacionadas con la presencia de anticuerpos anti gonadotropina coriónica humana en grupos heterogéneos de pacientes hCG (gonadotropina coriónica humana).

JUSTIFICACIÓN

En el mundo, la preeclampsia sigue siendo una de las principales causas de morbilidad durante el embarazo y una de las principales razones de mortalidad materna en los países en vías de desarrollo. En nuestro país, complica alrededor de 5-10% de los embarazos.

La hCG tiene un rol preponderante en la promoción de la angiogénesis en el endotelio uterino, la regulación de la invasión y diferenciación trofoblástica, el mantenimiento en la quiescencia miometrial, y la regulación inmunológica mediante la modulación de las células T reguladores (Treg), las células dendríticas, las células NK y los linfocitos B reguladores. La hCG regula a su vez la formación del sinciciotrofoblasto en una manera autócrina.

Partiendo que la teoría inmunológica es una de las más aceptadas sobre el origen de la preeclampsia; entendiendo que la preeclampsia tiene origen en una placentación anormal y el papel preponderante de la hCG en la misma, consideramos biológicamente plausible el buscar alteraciones de tipo inmunológicas que intervengan directamente en el funcionamiento de la hormona, su afinidad al receptor o biodisponibilidad.

En la búsqueda previa de anticuerpos anti-HCG por parte de otros autores, nunca se involucró a pacientes embarazadas y desde luego que no se establecieron comparaciones en embarazadas con y sin preeclampsia. Este estudio generaría nuevo conocimiento relacionado a la etiología inmunológica de la preeclampsia y sentaría precedentes para el reconocimiento de un nuevo biomarcador de la enfermedad que sería útil como tamizaje para toda la población de embarazadas, y facilitar el diagnóstico oportuno y tratamiento de esta

enfermedad; disminuyendo así la mortalidad materna de forma importante en nuestro país y el mundo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La preeclampsia es una de las causas más importantes de morbimortalidad materna, principalmente en países en vías de desarrollo. En México, constituye una de las primeras causas de muerte materna (primera o segunda causa dependiendo de la entidad federativa) contribuyendo aproximadamente al 30% de las muertes maternas totales. Es un síndrome fisiopatológicamente complejo, cuyo origen es la misma invasión trofoblástica. La hCG juega un papel preponderante en la viabilidad embrionaria inicial, la implantación y el establecimiento de la circulación maternofoetal; Existen estudios que demuestran la presencia de autoanticuerpos contra hCG, sin embargo, no existen estudios sobre la presencia de anticuerpos anti hCG en mujeres embarazadas y menos aún en mujeres con preeclampsia. La presencia de anticuerpos anti-hCG o la diferencia de concentración en los mismos pudieran ser parte de la patogénesis de la preeclampsia. Por lo anterior, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe diferencia en la concentración de anticuerpos anti hCG en mujeres con y sin preeclampsia?

HIPOTESIS CIENTÍFICA

Existe diferencia en la concentración de anticuerpos anti hCG en mujeres con y sin preeclampsia.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la concentración de anticuerpos anti hCG entre mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.

Objetivos Particulares

- Determinar la presencia y concentración sérica de anticuerpos anti hCG en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia.
- Comparar la prevalencia de anticuerpos anti hCG en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia
- Determinar la concentración sérica de hCG en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia.
- Comparar la concentración sérica de hCG en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia.
- Correlacionar la concentración de anticuerpos anti-hCG con la concentración de hCG.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Diseño del Proyecto

Tipo y características del estudio:

- El presente es un estudio comparativo, observacional, transversal, prolectivo, homodémico y unicéntrico

Definición del universo de trabajo

Población fuente

- Pacientes embarazadas que acudieron a control prenatal y resolución obstétrica al Hospital General de Cholula (SSA).

Definición de unidades de observación y del grupo control.

Criterios de inclusión

Para ambos grupos de mujeres embarazadas:	
1. Pacientes de entre 15 y 40 años de edad 2. Primigestas con embarazo único 3. > de 25 semanas de gestación 4. Sin comorbilidades diagnosticadas 5. Que aceptaron participar voluntariamente en el estudio, firmando consentimiento informado.	
Para las pacientes con preeclampsia	Para las pacientes sin preeclampsia
1. Pacientes con diagnóstico de preeclampsia según los criterios establecidos en el lineamiento técnico emitido por el gobierno federal 2. Que acudieron para su atención al Hospital General de Cholula (SSA)	1. Acudir a control prenatal y/o resolución obstétrica en el Hospital General de Cholula

Criterios de exclusión para ambos grupos.

- Pacientes con comorbilidades crónicas diagnosticadas durante estancia intrahospitalaria y consignadas en el expediente clínico.
- Pacientes sin resolución obstétrica en el hospital sede.

Criterios de eliminación

- Pérdida de la información.
- Pacientes que decidieron retirarse el estudio.

Estrategia de muestreo

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos presentados del 1ro de enero del 2015 al 29 de febrero del 2016.

Definición de variables y unidades de medición (Anexo 1)

Preeclampsia

- Presencia o ausencia del síndrome (presencia de hipertensión y proteinuria en mujeres embarazadas previamente sanas). Variable Nominal dicotómica.

Anticuerpos anti hCG

- Presencia de anticuerpos tipo IgG anti-hCG en el suero de casos y controles. Variable cuantitativa, continua, expresada en densidades ópticas.

Concentración de hCG

- Concentración sérica de hCG en casos y controles. Variable cuantitativa, continua, expresada en unidades internacionales por mililitro.

Técnicas y Procedimientos

Se estudiaron 60 pacientes en total que cumplieron con los criterios de inclusión y asistieron a consulta externa o de urgencias. A todas las pacientes se les realizó la toma de la presión arterial después de 5 minutos de reposo, mediante esfigmomanómetro mercurial (marca LG medical Desgind LLC) en el brazo izquierdo a la altura del corazón con la paciente sentada. La cámara de aire (globo) cubrió al menos las 3/4s parte de la longitud del brazo y al menos el 80% de la circunferencia del brazo. Se registraron los dos valores (sistólica diastólica); la aparición del primer ruido definió la presión sistólica y el último ruido definió la presión diastólica. El valor de la presión arterial correspondió al promedio de dos mediciones, separadas entre si por 10 minutos. Los resultados se reportaron en milímetros de mercurio.

A todas las pacientes con cifras tensionales sistólicas iguales o mayores a 140mmHg y/o diastólicas iguales o mayores a 90mmHg se les pidió realizaran un vaciado de orina en frasco recolector estéril con técnica de chorro medio o sonda foley e instilación de orina en tira reactiva colorimétrica Combiscreen IISYSPLUS. Posteriormente se realizó la lectura de la tira reactiva en el lector óptico Analyticon CombiScan 500 para determinar la concentración de proteínas en la orina de las pacientes. Los resultados se reportaron en mg/dl. Todas las pacientes con elevación de cifras tensionales y 100mg/dl de proteínas o más, fueron diagnosticadas con preeclampsia.

Una vez teniendo el diagnóstico de preeclampsia, se realizó la toma de muestra de sangre periférica por el personal de enfermería de turno, utilizando un tubo vacutainer estériles sin anticoagulante, el cual fue trasladado en receptáculos especiales con hielo para mantenerse a aproximadamente 4 grados centígrados,

por un lapso no mayor a 30 minutos hasta su llegada al laboratorio de inmunología experimental de la facultad de medicina BUAP. Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto por 10 minutos para posteriormente obtener el suero y alicuotarlo en microtubos de 1.5mL los cuales fueron rotulados y almacenados en un ultracongelador Redco a -70 grados hasta su análisis.

Las muestras hemáticas de los controles fueron obtenidas a posteriori, incluyendo a mujeres embarazadas, sanas (sin proteinuria ni hipertensión) pareadas por edad cronológica y gestacional con aquellas identificadas como casos , a razón de 1 a 1 (un control por cada caso) y siguiendo la metodología previamente descrita.

No existe disponible un Kit comercial para la identificación de anticuerpos anti-hCG específicos, por lo que se realizó la determinación de anti-cuerpos anti-hCG mediante un ELISA “casero” en casos y controles, utilizando como antígeno de captura la hCG, anticuerpo primario el suero de casos y controles y finalmente como anticuerpo de detección una anti-IgG humana acoplada a peroxidasa como anticuerpo secundario, para determinar el complejo antígeno-anticuerpo, se utilizó la tetrametilbencidina, como sustrato. La aparición de un color amarillo, nos indicó una reacción positiva, la cual fue, directamente proporcional a la concentración y fue determinada en un lector de ELISA a 450nm para cuantificar las densidades ópticas de cada muestra (ANEXO 2).

La determinación de concentración sérica de hCG se realizó mediante quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del proveedor (kit Acculite (hCG), cod 875-300). (ANEXO 3).

ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa SPSS versión 22 para:

Estadística descriptiva: frecuencias, media, mediana, porcentajes, rangos

Estadística inferencial: Para la comparación de los grupos evaluados se utilizó Chi cuadrada (diferencia de prevalencia) y T de Student (diferencia de medias) con un valor de $p < 0.05$.

BIOÉTICA

Esta fue una investigación de *riesgo mínimo* según el artículo 17 de la ley general de Salud pues es un estudio prospectivo que emplea el riesgo de datos a través de “procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, colección de excretas y secreciones externas, extracción de sangre por punción venosa en adultos y volumen máximo de 450 ml. en dos meses”

Se apegó a las pautas éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos. ISBN 92 9036 056 9. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 1993, Ginebra, pp.53-56 y los citados en los artículos 100 en los incisos I al VII y en el artículo 101 de la Ley General de Salud en México.

Basado en los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (Helsinki Finlandia junio de 1964 y sus modificaciones posteriores hasta Rio de Janeiro, Brasil, 2013).

Este estudio se apegó a el Reglamento de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de experimentación en seres humanos, así como a las normas e instructivos institucionales en materia de investigación científica, y se realizó hasta que fue aprobado por el Comité Local de Investigación. Se aseguró estricta confidencialidad de la información utilizada, manteniendo en anonimato los nombres de las pacientes, sustituyendo los mismos por un número de registro cronológico.

Para llevar a cabo esta investigación se contó con la autorización de

1. Comité de investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad autónoma de Puebla.
2. Comité local de investigación en Salud del H. General de Cholula (ANEXO 4)

LOGÍSTICA

Recursos Humanos:

Se contó con Investigador Principal, Investigadores Expertos. Personal de enfermería en turno del Hospital General de Cholula, médicos estudiantes de pregrado en laboratorio de inmunología experimental BUAP, y personal del centro de investigación biomédica de oriente.

Recursos materiales:

Instalaciones del laboratorio del hospital general de Cholula, del laboratorio de inmunología experimental de la Facultad de Medicina, BUAP y del Centro de Investigación biomédica de Oriente (IMSS).

Material bibliográfico recopilado.

Papelería, computadora, impresora. Hielera de traslado.

Paquete para análisis estadístico.

Recursos financieros:

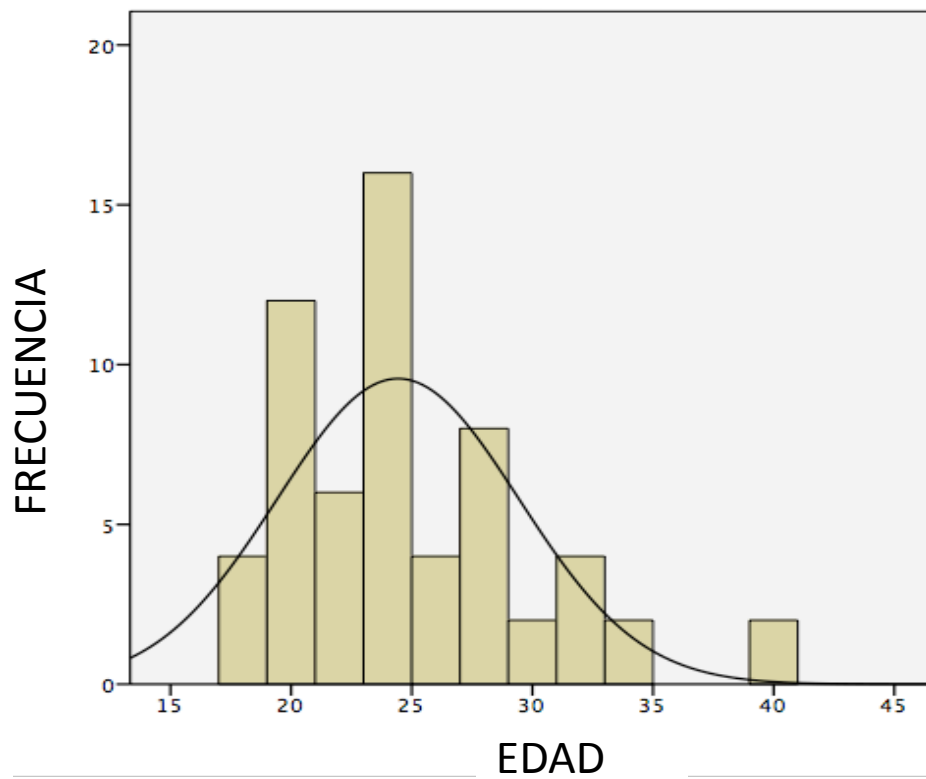
Los propios asignados del laboratorio de Inmunología Experimental de la Facultad de Medicina, BUAP, Fondos asignados de Posgrado de esta Facultad para compra de reactivo y del Centro de Investigación Biomédica de Oriente así como Los propios del investigador.

RESULTADOS

La grupo de estudio estuvo integrado por 60 pacientes en total. Lo conformaron 30 primigestas con preeclampsia pareadas según edad cronológica y edad gestacional con 30 controles sin preeclampsia. El análisis descriptivo de las variables cuantitativas nos proporcionó los siguientes datos:

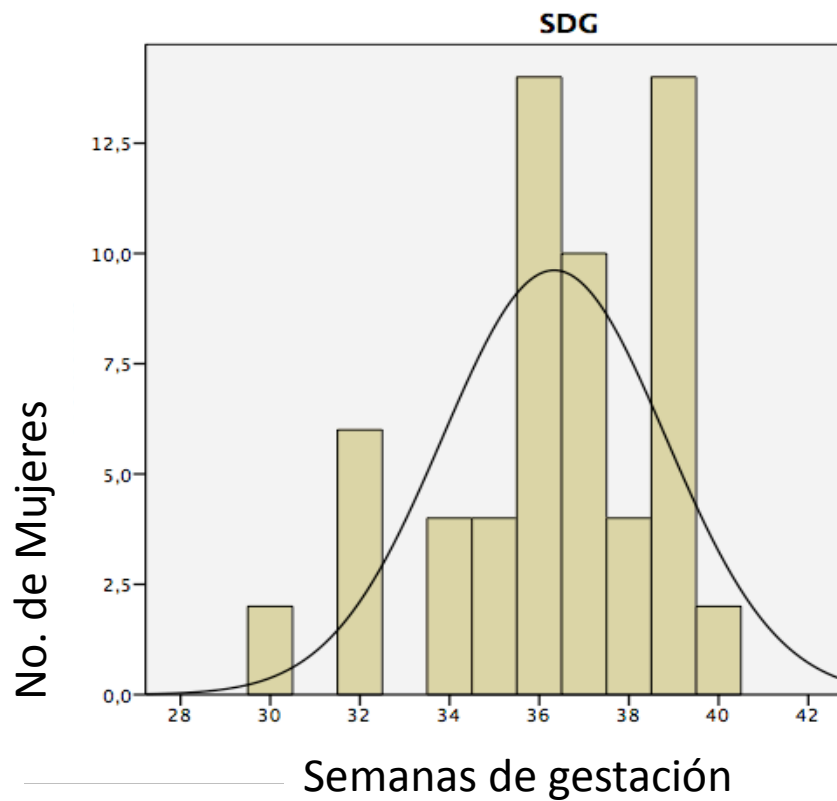
El rango de edad cronológica fue 18 a 39 años (media de 24.4 años +/- 5 años) (Figura 2), con embarazos de entre 30 y 40 semanas de gestación (media de 36.3 +/- 2.4 semanas) (Figura 3). Todas las pacientes diagnosticadas por preeclampsia tuvieron elevación de cifras tensionales y proteinuria, a diferencia de todas las pacientes en el grupo control que tuvieron cifras tensionales dentro de parámetros normales y ausencia de proteinuria según la tira colorimétrica.

Distribución por edades cronológicas



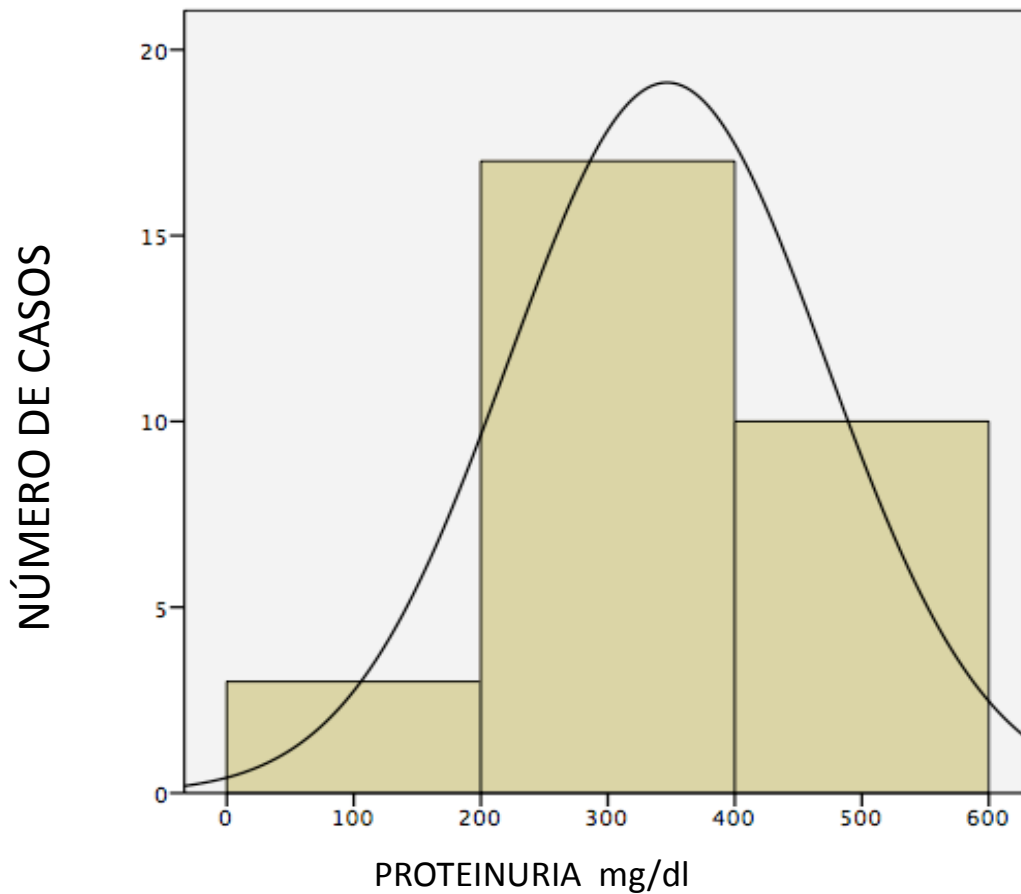
Gráfica 1: nos muestra la distribución de la edad de los 60 pacientes incluidas en el estudio (con una media 24.4 y una DS \pm 5.0)

Distribución por edades gestacionales



Gráfica 2: Muestra las edades gestacionales de las 60 pacientes del estudio.
(con una media 36.3 y una DS \pm 2.48)

Distribución de proteinuria



Gráfica 3. Muestra la distribución de la concentración de proteínas en orina de las 30 pacientes con diagnóstico de preeclampsia. **(con una media 346.67 y una DS \pm 125.212)**

Se encontraron valores positivos de anticuerpos (IgGs) anticonadotropina coriónica humana en el 78.3% de las pacientes estudiadas, sin encontrarse diferencia significativa entre casos y controles.

Prevalencia de anticuerpos anti- HCG

	NEGATIVOS N(%)	POSITIVOS N(%)
CONTROLES	7 (23.4)	23 (76.6)
CASOS	6 (20)	24 (80)
TOTAL	13 (11.7)	47 (78.3)

Chi cuadrada con $p= 0.754$

Tabla 1: muestra el porcentaje de anticuerpos anti hCG positivos y negativos en las pacientes con y sin preeclampsia.

Se realizó el análisis cuantitativo de las densidades ópticas de IgGs anti-hCG entre casos y controles, encontrando diferencia significativa entre las medias (Tabla 2, Gráfica 5).

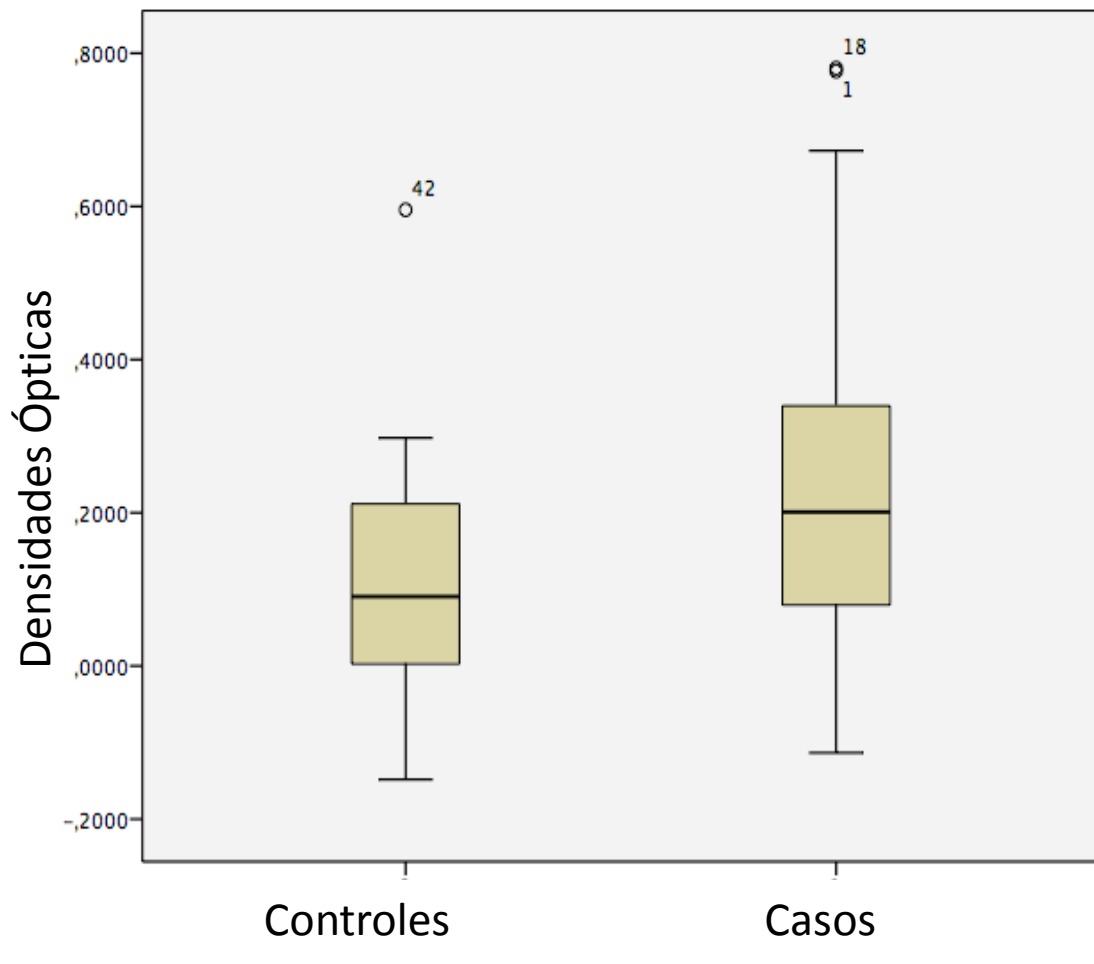
Concentración de anticuerpos anti-hCG en Densidades Ópticas

	DENSIDADES ÓPTICAS
CASOS	0.234 ± 0.240
CONTROLES	0.099 ± 0.155

Diferencia de medias por T de Student de 0.135 (0.030-0.239) $p \leq 0.012$,

TABLA 2. Muestra la diferencia en la concentración de los anticuepros anti-hcg presentes en los casos y controles del estudio medidas EN D.O.

Diferencia de medias en anticuerpos anti-hCG en densidades Ópticas



GRÁFICA 4. Se muestran las diferencias en densidades ópticas de anticuerpos anti-hCG entre casos y controles. Significancia estadística bilateral según T de Student para muestras independientes con $p \leq 0.012$.

Finalmente se determinó la concentración de hCG en ambos grupos mediante quimioluminiscencia sin encontrar diferencia significativa (Gráfica 6).

Medias en concentración de hCG entre casos y controles

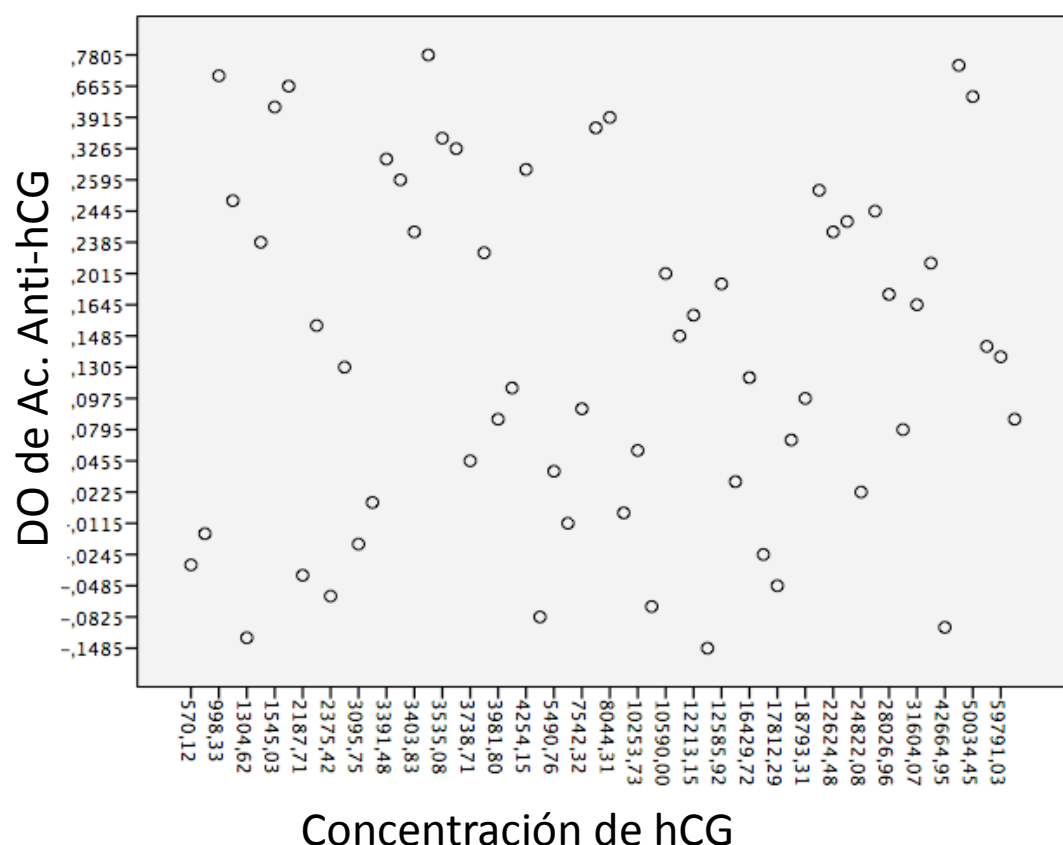
	N	Concentración de hCG en UI/mL
Casos	30	13,687 ± 14,555 UI/mL
Controles	30	14,872 ± 16,926 UI/mL

p 0.72

TABLA 3: No se encontró diferencia significativa en la concentración de hCG entre casos y controles.

Así mismo, se realizó una correlación entre las variables de densidades ópticas de IgGs anti hCG y la concentración de hCG mediante Pearson, sin encontrar significancia estadística ($p > 0.6$) (Figura 7).

Correlación entre densidades ópticas de anticuerpos anti-hCG y concentración de HCG.



Correlación de Pearson, $p \leq 0.6$

GRÁFICA 5: No existió correlación aparente entre la concentración de hCG y las D.O para anticuerpos anti-hCG en casos o controles.

DISCUSIÓN

Nuestra población de estudio estuvo integrada por pacientes primigestas, con embarazos de tercer trimestre. Todos los casos incluidos cumplieron con los criterios diagnósticos vigentes para preeclampsia y fueron pareados con controles de la misma edad cronológica y edad gestacional.

En la población estudiada, se encontró una elevada prevalencia de anticuerpos anti-HCG tanto en casos como en controles, sin existir diferencia de proporciones entre casos y controles. Como se mencionó anteriormente, existen reportes contradictorios sobre la presencia (Wass et al, 1978) o ausencia (Johnson et al, 1985) de anticuerpos anti-HCG en grupos heterogéneos de pacientes (diferencias de edad, etapa reproductiva, enfermedades crónicas, etc). Sin embargo, el presente estudio, es el primero en reportar la presencia de anticuerpos anti-HCG en mujeres embarazadas. Esta prevalencia resulta ser mucho mayor a la reportada anteriormente en mujeres no embarazadas (de 80.0% para los casos y 76.6 para los controles) y pudiera deberse a que la exposición a la hCG en mujeres embarazadas es en concentraciones miles de veces mayor al de las no embarazadas (la concentración de HCG circulante en mujeres no embarazadas debe ser menor a 1 UI/mL y durante el embarazo es común encontrar picos de HCG hasta de 60,000 UI/mL) (Braunstein, 1976). Se entiende también que la producción de anticuerpos es ampliamente dependiente de la concentración del antígeno contra el que se producen. Aunado a esto, estudios clínicos sobre la vacuna anticonceptiva para la formación de anticuerpos anti-HCG han demostrado que si no se otorgan dosis de refuerzo, el título de anticuerpos declina notablemente a los 6 meses después de la exposición, indicando que el proceso es reversible. (Singh et al, 1989). Esto explicaría la diferencia tan grande

encontrada entre las prevalencias de anticuerpos anti-HCG en nuestra cohorte de pacientes, y aquellas descritas en la literatura en mujeres no embarazadas. Cabe resaltar, que nuestra cohorte de pacientes pertenecía al tercer trimestre del embarazo, donde la media de concentración de HCG es significativamente menor al encontrado durante el final del primer trimestre e inicio del segundo. Es decir, la prevalencia y concentración de anticuerpos anti-HCG pudiera ser incluso mayor durante el primer y segundo trimestre del embarazo.

En cuanto al acoplamiento y tipo de anticuerpo, se han identificado y definido 16 regiones antigénicas en la hCG. Cinco epítomos están localizados en hCGa (a1-a5) (hCGa representa la hCG heterodimérica clásica) y siete en hCGh (h1-h5, h7-h9) (hCGh representa la hCG heterodimérica hiperglicosilada). Cuatro epítomos (c1-c4) son conformación-dependientes, y ocurren únicamente en la versión clásica (o heterodimérica) de la hormona. Dos de estos, C1 y C2, se pierden en la hCG desdoblada (nicked). Además, existen otros cuatro epítomos (a6, a7, h6 y h7) que están expuestos únicamente en las subunidades libres. Casi todos los anticuerpos monoclonales de uso clínico reconocen los epítomos peptídicos y no diferencian entre las variantes de hCG dependientes de glicosilación. (Lapthorn et al., 1994, Stenman et., al 2013). El presente estudio se utilizó hCG heterodimérica clásica, y la IgG reconocida pudiera acoplarse a un sitio que englobara ambas subunidades, con la alta posibilidad de afectar la afinidad de la hormona a su receptor.

El receptor de hCG/LH está localizado en las células del cuerpo lúteo ovárico (para la producción de progesterona), en la decidua endometrial (para la comunicación entre el blastocisto y el miometrio), en la vasculatura uterina (para favorecer la angiogénesis), etc. El receptor responde tanto a LH, como a hCG y su

forma hiperglicosilada, pero no a las subunidades libres o fraccionadas (Fournier et al, 2015). Existe evidencia que sustenta que la subunidad alfa tiene un papel de acoplamiento a receptor, mientras que la subunidad beta tiene el papel de delimitar la especificidad al mismo (Boorstein et al, 1982, McFarland et al, 1989)

En nuestro estudio, esto último cobra mayor relevancia dado a que se encontraron diferencias significativas en las concentraciones (por densidades ópticas) de anticuerpos anti-HCG entre casos y controles (p 0.012) y estas concentraciones no correlacionaron con la concentración sérica de hCG.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de hCG en mujeres con y sin preeclampsia. Los hallazgos en estudios previos difieren de forma importante (Reyna-Villasmil et al 2010, Hui et al 2012). La diferencia de hallazgos entre los estudios de ésta índole parece deberse a la diferencia de edades gestacionales entre pacientes y también a que existe una variación diaria en las concentraciones séricas de HCG en una misma paciente (hasta del 20%) (Obiekwe et al, 1983). La limitación de nuestro estudio en este aspecto fue que las determinaciones fueron únicas para cada paciente y se llevaron a cabo en el tercer trimestre. El estudio óptimo para corroborar o negar diferencia significativa debiera ser un estudio longitudinal, con determinaciones seriadas durante todo el embarazo, calculando curva de concentración total de hCG y estableciendo diferencia únicamente al final del embarazo entre casos y controles.

Se sabe que además de su bien establecida función en evitar la regresión del cuerpo lúteo, y la estimulación del mismo para la producción ovárica de progesterona, estradiol y estrona durante las primeras seis semanas del embarazo

(actuando como un super agonista de LH y mediante la estimulación de las células lúteas a través de su receptor LH/CG, hasta la compensación de la actividad esteroidogénica de la placenta), la hCG tiene un rol preponderante en la promoción de la angiogénesis en el endotelio uterino, la regulación de la invasión y diferenciación trofoblástica, el mantenimiento en la quiescencia miometrial, y la regulación inmunológica mediante la modulación de las células T reguladores (Treg), las células dendríticas, las células NK y los linfocitos B reguladores. La hCG regula a su vez la formación del sincitiotrofoblasto en una manera autócrina (Norris, 2011).

Siendo el producto inicial de origen embrionario, la hCG es uno de los principales candidatos para dicha relación embrio-miometrial. Las subunidades de hCG se transcriben tan temprano como en el embrión de 8 células (Bonduelle et al., 1988) y el blastocisto a demostrado secretar relativamente altas concentraciones de hormona bioactiva (Lopata, 1989). Si esto es cierto, el efecto autócrino y parácrino de la hCG en el endometrio precedería a su función clásica del estímulo del cuerpo lúteo y sería preponderante para la implantación o no-implantación embrionaria.

Los hallazgos en diferencia significativa de anticuerpos anti-hCG en mujeres con y sin preeclampsia evidencia diferencias que van acorde con la teoría inmunológica de la preeclampsia, pero también pudieran explicar parte de la fisiopatología de las alteraciones durante la invasión trofoblástica de la enfermedad, pues una mayor concentración de anticuerpos anti hCG en un grupo específico de pacientes (con respuesta inmunológica alterada a las concentraciones repentinas y crecientes de la hormona a nivel endometrial), pudieran interferir con la afinidad de la hormona por su receptor y

secundariamente disminuir el efecto preponderante de la misma en la relación embrio-miometrial y el proceso de implantación.

Evidentemente, las limitaciones propias del estudio (transversal y durante el tercer trimestre) no permiten mayor medida de asociación o causalidad; el estudio ideal tendría que llevarse de forma longitudinal, y durante el periodo de la primera y segunda oleada de invasión trofoblástica e incluso con determinaciones seriadas durante los diferentes trimestres del embarazo.

Cabe resaltar que estos hallazgos evidentemente pudieran ser aún más significativos en una cohorte de pacientes que incluyera mujeres con embarazos previos (exposición previa a concentraciones altas de hCG) o patologías autoinmunes (con formación documentada de auto-anticuerpos y curiosamente mayor riesgo basal para presentar preeclampsia).

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos de este estudio, se puede concluir que:

- La prevalencia de anticuerpos anti-hCG en mujeres embarazadas es elevada; siendo del 78% para las mujeres sin preeclampsia, y del 80% para las mujeres con preeclampsia.
- Existe diferencia significativa en la concentración de anticuerpos anti-hCG en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.
- No existen diferencias significativas en la concentración sérica de hCG entre mujeres embarazadas con y sin preeclampsia en el tercer trimestre de embarazo.
- La concentración de anticuerpos anti-hCG en mujeres con y sin preeclampsia no guarda relación con la concentración sérica de hCG.

El presente estudio proporciona conocimiento nuevo en el rubro de diferencias inmunológicas en pacientes con y sin preeclampsia, evidencia una incidencia alta de anticuerpos anti-hCG durante el embarazo tanto normal como patológico y abre una novedosa y amplia línea de investigación que pudiera conducir al descubrimiento de un nuevo biomarcador temprano, no tan solo de relevancia para el diagnóstico y pronóstico de una de las principales causas de mortalidad materna en nuestro país y el mundo, sino incluso dar pie a futuras posibilidades de profilaxis y tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal P, Chandel M, Jain V, Jha V. (2011) The relationship between circulating endothelin-1, soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in preeclampsia. *J Human Hypertension*. 26(2), 236–241.
- Ahmed A. (2011) New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications. *Thromb Res*. 127(3), 72–75.
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. (2002) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 5(3), 266–271.
- Amato F, Warnes GM, Kirby CA, Norman RJ. (2002) Infertility caused by HCG autoantibody. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 87(3), 993–997.
- Ambrus G, Rao Ch. (1994) Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 135, 2772–2779.
- Angioni S, Spedicato M, Rizzo A. (2001) In vitro activity of human chorionic gonadotropin (hCG) on myometrium contractility. *Gynecol. Endocrinol*. 27(3), 180–184.
- Bansal AS, Bajardeen B, Shehata H, Thum MY. (2011) Recurrent miscarriage and autoimmunity. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 7(1), 37–44.
- Bansal AS. (2010) Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *Am. J Reprod Immunol* 64(5), 307–315.
- Bonduelle, M.L., Dodd, R., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., Williamson, R., Akhurst, R., 1988. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum. Reprod*. 3, 909–914.
- Boorstein WR, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. (1982) Human chorionic gonadotropin beta-subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature*. 300, 419e22.
- Bourdieu A, Bedard D, Rao CV, Akoum A. (2013) Human chorionic gonadotropin regulates endothelial cell responsiveness to interleukin 1 and amplifies the cytokine-mediated effect on cell proliferation, migration and release of angiogenic factors. *Am J Reprod Immunol*. 70, 127–138.
- Braunstein G.D. (1976) Serum Human Chorionic Gonadotropin levels through Normal Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 126, 678-81.
- Carbone F, Procaccini C, De Rosa V. (2010) Divergent immunomodulatory

- effects of recombinant and urinary-derived FSH, LH, and hCG on human CD4+ T cells. *J. Reprod. Immunol.* 85(2), 172–179.
- Colbern GT, Chiang MH, Main EK. (1994) Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 170, 1244–1250.
 - Cole LA. (2012) HCG variants, the growth factors which drive human malignancies. *Am. J. Cancer Res.* 2(1), 22–35.
 - Duley L. (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclampsia,” *Seminars in Perinatology.* 33(3),130–137.
 - Elosha E, Nzerue C, Fulkner M. (2012) Pre-eclampsia: a Revision Article. *Journal of Pregnancy.* 2, 122-129.
 - Fiddes JC, Goodman HM. (1981) The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet.* 1, 3-18.
 - Fisher SJ, McMaster M, Roberts M. Chesley’s (2009) *Hypertensive Disorders in Pregnancy.* Amsterdam, the Netherlands: Academic Press Elsevier;. The placenta in normal pregnancy and preeclampsia. 65, 2259–2268.
 - Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. (2009) Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia – a step forward but not the definitive answer. *J. Reprod. Immunol.* 82(2), 106–111.
 - Fournier T, Guibourdenche J, Evain-Brion D. (2015) Review: hCGs different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta* 36, Supplement 1, *Trophoblast Research.* 29, 60-65.
 - Freyermuth G. Luna M, Muños J. (2015) *Numeralia. Mortalidad Materna en México, Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social (CIESAS), Observatorio de Mortalidad Materna en México (OMM), Organización Panamericana de la Salud en México (OPS), México, 62 pp.*
 - Genbacev O, Diferedico E, McMaster M, Fisher SJ. (1999) Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia. *Hum Reprod.* 14, 59–66.
 - Ghulmiyyah L, Sibai B. (2012) Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Seminars in Perinatology.* 36(1), 56–59.
 - Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. (1992) Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem.* 267, 4479-88.
 - Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. (2012) *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).*

- Herr F, Baal N, Reisinger K et al. (2007) HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta* 28(A), 85–93.
- Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S et al. (2005) Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 54(1), 21–29.
- Housseau F, Rouas-Freiss N, Benifla JL et al. (1995) Reaction of peripheral-blood lymphocytes to the human chorionic gonadotropin " sub-unit in patients with productive tumors. *Int. J. Cancer* 63(5), 633–638.
- Hui D, Okun N, Murphy K, Kingdom J, Uleryk E, Shah P. (2012) Combinations of maternal serum markers to predict preeclampsia, small for gestational age, and stillbirth: a systematic review. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada.* 34(2), 142–153.
- Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. (2006) Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol. Hum. Reprod.* 12(5), 301–308.
- Jin LP, Chen QY, Zhang T, Guo PF, Li DJ. (2009) The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clin. Immunol.* 133(3), 402–410.
- Johnson PM, Cheng HM, Stevens VC, Matangkasombut P. (1985) Antibody reactivity against trophoblast and trophoblast products. *J Reprod Immunol* 8, 347–352.
- Kalkunte S, Nevers T, Norris W et al. (2010) Presence of non-functional hCG in preeclampsia and rescue of normal pregnancy by recombinant hCG. *Placenta* 31, A126.
- Kane N, Kelly R, Saunders PT, Critchley HO. (2009) Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 150(6), 2882–2888.
- Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. (2003) Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas–Fas ligand system. *J. Immunol.* 171(5), 2305–2313.
- Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. (1998) Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 111, 995-1004.
- Kestlerová A, Feyerisi J, Frisová V, et al. (2012) Immunological and biochemical markers in preeclampsia, *Journal of Reproductive immunology* 11, 115-126.
- Knoffler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, et al. (2004) Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene

- during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology*. 145, 85-94.
- Koldehoff M, Katzorke T, Wisbrun NC et al. (2011) Modulating impact of human chorionic gonadotropin hormone on the maturation and function of hematopoietic cells. *J. Leukoc. Biol.* 90(5), 1017–1026.
 - Kruse N, Greif M, Moriabadi NF, Marx L, Toyka KV, Rieckmann P. (1996) Variations in cytokine mRNA expression during normal human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 119(2), 317–322.
 - Inoue T, Kanzaki H, Imai K et al. (2000) Progesterone stimulates the induction of human endometrial CD56+lymphocytes in an in vitro culture system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(4), 1502–1507.
 - Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, et al. (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*. 369, 455–61.
 - Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. (2007) Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol. Cell. Endocrinol.* 269(1–2), 85–92.
 - Lopata, A., Hay, D.L. (1989) The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Hum. Reprod.* 4, 87–94.
 - McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Roseblit N, Nikolics K, et al. (1989). Lutropin- choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*. 245(4917), 494–499.
 - Mao G, Wang J, Kang Y et al. (2010) Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology*. 151(11), 5477–5488.
 - Moodley J. (2004) Maternal deaths associated with hypertensive disorders of pregnancy: a population-based study. *Hypertension in Pregnancy*. 23,(3) 247–256.
 - Moyle R. W. (1995) Model of hCG interaction with LH receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 20-31.
 - Mutze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W. (2008) Genes and the preeclampsia syndrome. *J Perinat Med.* 36, 38–58.
 - Nakashima A, Shima T, Inada K, Ito M, Saito S. (2012) The balance of the immune system between T cells and NKcells in miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.* 67(4), 304–310.
 - Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P. (2004) The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG*. 111, 200–206.
 - Norris W, Nevers T, Sharma S, Kalkunte S. (2011) Review: hCG, preeclampsia

- and regulatory T cells. *Placenta* 32(2), 182–185.
- Obiekwe BC, Chard T. (1983) Placental proteins in late pregnancy: relation to fetal sex. *Br J Obstet Gynaecol* 3, 163 – 164.
 - Osungbade O, Ige O. (2011) Public health perspectives of preeclampsia in developing countries: implication for health system strengthening. *Journal of Pregnancy*. Article ID 481095.
 - Rao A, Daniels K, El-Sayed Y. (2006) Perinatal outcomes among Asian American and Pacific Islander women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 195(3), 834–838.
 - Rao Ch, Li X, Manna SK, Lei ZM, Aggarwal BB. (2004) Human chorionic gonadotropin decreases proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation. *J Biol Chem*. 279, 25503–25510.
 - Reyna-Villasmil E, Mejía-Montilla J, Reyna-Villasmil N, Torres-Cepeda D, et al. (2010) Concentraciones de gonadotropina coriónica humana en pacientes preeclámpicas y embarazadas normotensas sanas. *Prog Obstet Ginecol*. 53(8), 303-307.
 - Rizk DEE, Osman NA, Shafiullah MM, Nagelkerke NJD, Fahim MA. (2009) Effect of human chorionic gonadotropin on in vitro contractions of stimulated detrusor muscle strips of female rats. *J Obstet Gynaecol*. 35, 835–841.
 - Roberts JM. (1998) Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 16, 5–15.
 - Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S et al. (2009) Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal–maternal interface during early human pregnancy. *J. Immunol*. 182(9), 5488–5497.
 - Secretaría de Salud. (2007) Prevención, Diagnóstico y Manejo de la Preeclampsia Eclampsia. Lineamiento Técnico. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.
 - Singh O, Rao LV, Gaur A, Sharma NC, Alam A, Talwar GP. (1989) Antibody response and characteristics of antibodies in women immunized with three contraceptive vaccines inducing antibodies against human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 52, 739–744.
 - Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112(1), 38–43.
 - Stahn R, Goletz S, Stahn R et al. (2005) Human chorionic gonadotropin (hCG) as inhibitor of E-selectin-mediated cell adhesion. *Anticancer Res*. 25(3A), 1811–1816.
 - Steinberg G, Khankin E, Karumanchi S. (2009) Angiogenic factors and preeclampsia. *Thrombosis Research*. 123, 93–99.

- Stenman U, Alfthan H. (2013) Determination of human chorionic gonadotropin. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 27 783–793.
- Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI et al. (2004) An increase in the absolute count of CD56dimCD16+CD69+ NK cells in the peripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Hum. Reprod.* 19(10), 2395–2400.
- Toldi G, Svec P, Vásárhelyi B et al. (2008) Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 87(11), 1229–1233.
- Wass M, McCann K, Bagshawe KD. (1978) Isolation of antibodies to HCG/LH from human sera. *Nature*. 274(5669), 369–370.
- WHO (2011) Recommendations for Prevention and Treatment of Preeclampsia and Eclampsia. WHO Department of Maternal and Child Health.
- Zou SH, Yang ZZ, Zhang P et al. (2008) Autoimmune disorders affect the in vitro fertilization outcome in infertile women]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 14(4), 343–346.

ANEXO 1: VARIABLES DEL ESTUDIO

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA	MEDICIÓN
Preeclampsia	Síndrome multisistémico de severidad variable, específica del embarazo, caracterizada por una reducción de la perfusión sistémica generada por vasoespasmo y activación de los sistemas de coagulación. Se presenta después de la semana 20 de la gestación, durante el parto o en las primeras 6 semanas después de éste. El cuadro clínico se caracteriza por hipertensión arterial $\geq 140/90$ mm Hg y proteinuria.	Los criterios para determinar la preeclampsia fueron: Presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg o presión arterial diastólica > 90 mm Hg en una mujer previamente normotensa, después de la semana 20 de gestación y presencia de proteinuria ≥ 100 en tira colorimétrica CombiScreen IISYUS PLUS y lector en Analyticon combiScan 500.	Nominal	dicotómica	Si/No
Niveles circulantes de anticuerpos anti HCG	Anticuerpos de tipo IgG que reaccionen contra la hormona Gonadotropina Coriónica Humana	Determinación en sangre periférica de la presencia anticuerpos anti HCG (Elisa)	Cuantitativa	Continua	D.O
Niveles circulantes de Gonadotropina Coriónica Humana	La Gonadotropina Coriónica Humana es una hormona producida por la sinciotrofoblasto y posteriormente la placenta durante todo el periodo comprendido entre la fertilización y el alumbramiento.	Determinación cuantitativa de fracción beta de gonadotropina coriónica humana en sangre periférica. (Quimioluminiscencia; Kit Acculite CLIA Microwells. Monobid INC. Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) código de producto 875-300)	Cuantitativa	Continua	UI/mL

ANEXO 2: TÉCNICA DE ELISA PARA DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS TIPO G ANTI hCG

1. Fijación la proteína (HCG) a la placa, a una concentración de 20mcg/ml, poniendo 50mcl por pozo
2. Incubación durante 24hrs a 4 grados centígrados
3. Realización de lavados por triplicado con 250mcl de PBS/Tween (0.5%)
4. Bloqueo de placa con solución de bloqueo 1x (ELISA Assay Diluent A, Biolegend, número de catálogo: 421203), en agitación (500rpm por 30 minutos, a temperatura ambiente)
5. Lavados por triplicado con 250mcl de PBS/Tween (0.5%)
6. Colocación de 100mcl de muestra (sin dilución) (suero paciente) durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación a 500rpm.
7. Realización de lavados por triplicado con 250mcl de PBS/Tween (0.5%)
8. Colocación de anticuerpo secundario (anti Ig-G humano (goat anti-human iGG-HRP, Santa Cruz Cat: SC-2453), acoplado a HRP, a una dilución de 1 a 5000
9. incubación por 1hr a temperatura ambiente y en agitación a 500rpm
10. Realización de 4 lavados con 250mcl de PBS/Tween (0.5%)
11. Revelado con TMB (substrate A Catálogo 78570; Substrato B Catálogo 78571, marca Biolegend.
12. Se para reacción con 50mcl de ácido sulfúrico 1molar (5 minutos)
13. Se realiza lectura de densidades ópticas a una longitud de onda de 450nm, en un lector de microplacas (Synergy 4)

ANEXO 3: DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN SÉRICA DE hCG POR QUIMIOLUMINISCENCIA

KIT: Acculite CLIA Microwells. Monobid INC.

Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) código de producto 875-300

Uso: Determinación cuantitativa de la concentración de Gonadotropina coriónica en suero humano mediante ensayo de quimioluminiscencia en microplacas (CLIA).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Marcado de los pozos de la microplaca para cada una de los calibradores, controles y muestras de paciente para ser procesados por duplicado. Guardado de las tiras de micropozos no utilizadas dentro de la bolsa de aluminio, sellado y almacenado de 2-8°C.
2. Se Pipetearon 0.025 ml (25µl) del suero de referencia adecuado, control o muestra dentro del pozo asignado.
3. Se Adicionaron 0.100ml (100µl) del reactivo trazador hCG a todos los pozos.
4. Se Agitó suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar y luego cubrir.
5. Se Incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Se descartó el contenido de la microplaca por aspiración.
7. Se Adicionaron 350µl del solución de lavado, se decantó y aspiró. Se repitió el procedimiento cuatro (4) veces mas para un total de cinco (5) lavados.
8. Se Adicionaron 0.100 ml (100µl) de reactivo de señal de trabajo a todos los pozos.
9. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante cinco (5) minutos.
10. Se tomó lectura de las unidades relativas de luz, en cada pozo utilizando un lector de microplacas para quimioluminiscencia durante 0.5-1.0 segundos. Los resultados leyeron a los 30 minutos siguientes a la adición del sustrato.

ANEXO 4: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Carta de Consentimiento Informado

Nombre del estudio “Determinación de anticuerpos anti HCG en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.”

A. Patrocinador:

Ninguno.

B. Justificación y Propósito del estudio

Estamos invitando a participar a pacientes en un estudio de investigación que se lleva a cabo por el servicio de ginecología y obstetricia del Hospital General de Cholula (SSA), Laboratorio de Inmunología experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Centro de investigación Biomédica de Oriente (IMSS). Al participar en este estudio usted ayudará a proporcionar datos sobre la presencia o ausencia de anticuerpos que pudieran encontrarse en su sangre y que reaccionarían contra una hormona fundamental en el embarazo, lo cual pudiera estar relacionado con la causa de una enfermedad llamada preeclampsia y que es una de las responsable de la morbimortalidad materna en nuestro país. Estos datos pueden servir para ayudar en la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en el futuro. El estudio tiene como propósito **“Determinar anticuerpos anti HCG en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia”** por lo que pensamos usted pudiera participar en este proyecto ya que reúne las condiciones apropiadas.

Procedimientos En caso de aceptar participar en el estudio, se le solicitarán verbalmente algunos datos que se capturarán en un formato para su estudio posterior y se le realizará exploración física completa, así como toma de presión arterial, una muestra de sangre y orina a su ingreso al hospital. Al final del estudio se realizará la concentración de los datos de todas las pacientes involucradas y se someterá a publicación, con fines exclusivamente científicos.

C. Posibles riesgos y molestias. En este estudio usted únicamente será sometida al riesgo de la toma de muestra de sangre por punción en alguno de sus 2 brazos.

D. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio. A usted no se le pagará, ni tendrá que pagar nada, por ingresar al estudio. Usted no obtendrá ningún beneficio económico. Los beneficios que usted obtiene son conocer algunos datos adicionales sobre su embarazo.

E. Resultados o información nueva sobre alternativas de tratamiento. Si se demostrara con este estudio algún cambio en el seguimiento, diagnóstico o tratamiento de la enfermedad, entonces será usted inmediatamente informada para futuros embarazos.

F. La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración Ante cualquier duda y o aclaración que necesite relacionado con acerca de los procedimientos, riesgos,

beneficios y otros asuntos relacionados con los avances de la investigación y el tratamiento; podrá comunicarse con los investigadores responsables o asociados de esta investigación para lo cual ponemos a su disposición los siguientes datos para su localización. Dr. Miguel Ángel Domínguez Mena. **Teléfono celular 2225669811**. Dra. Alicia Díaz y Orea, Dra en Inmunología e investigadora de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dr. Juan Carlos Flores Alonso Investigador del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (IMSS). Metepec Puebla.

- G. Participación o retiro** La participación en este estudio es totalmente voluntaria. Si usted acepta participar en el estudio, los datos serán procesados y después analizados. Si posteriormente usted no desea que los resultados obtenidos de sus muestras sean utilizados, podrá solicitarlo y entonces esto no influirá en la atención futura que la institución de salud brinde a usted ni a sus familiares. Nadie le negará la atención ni el tratamiento que necesite. Usted no podrá ser identificado por ninguna persona ajena al personal médico, paramédico y científico que participó en este estudio,
- H. Privacidad y confidencialidad.** El equipo de investigadores y su médico en el servicio de ginecología correspondiente resguardarán la información.
- I. Declaración de consentimiento informado:** Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato. Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma del participante

Fecha:

Nombre y firma de la persona que obtiene este consentimiento:

Nombre y firma del testigo 1 (parentesco)

Nombre y firma del testigo 2 (parentesco)