BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

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

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE LINFOCITOS TH 17 Y T REGULADORES EN MUJERES EMBARAZADAS CON Y SIN PREECLAMPSIA"

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN CLINICA

Presenta:

Dolores Guillermina Martínez Marín.

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Irma del Carmen Zamora Ginez.

Diciembre de 2015.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES DON MARIANO MARTÍNEZ†

Y DOÑA LOLITA MARIN†

Inspiración y ejemplo de grandeza en todos los sentidos.

A MI HERMANO MARIANO EZEQUIEL†

Quien instaba superación permanente.

A MIS HIJOS KARLA Y FERNANDO

Personas que forman parte del sentido de mi vida, motivos de perseverancia en la lucha diaria y en quienes imprimir ejemplo, que espero sea favorable.

A MI HERMANO BETO Y SU ESPOSA LUPITA

Por su compañía y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por haberme permitido llegar a esta etapa de mi vida.

A MIS COMPAÑEROS "MAGNIFICOS" LA FAMILIA DE ALUMNOS DE LA GENERACION DE MAESTRIA 2013 – 2015.

Por el afecto, la complicidad y camaradería que nos ha unido durante esta travesía llamada "Maestría en Ciencias"

AL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, HOSPITAL GENERAL REGIONAL NUMERO 36, TRABAJADORES Y PACIENTES OBSTETRICAS.

Elementos imprescindibles en este logro.

A LOS RESIDENTES DE LA ESPECIALIDAD DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DEL HOSPITAL GENERAL REGIONAL 36.

Por las atenciones que me brindaron en la elaboración de esta tesis.

A MIS ASESORES DE TESIS.

Por darme su tiempo, conocimientos y paciencia sin límites.

A LOS DOCENTES DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS BUAP.

Por su enseñanza desinteresada.

A ESOS PERSONAJES CALLADOS E INVISIBLES QUE HAN CONTRIBUIDO DE ALGUNA MANERA A LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Esta tesis se realizó gracias a la beca para estudios de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y la beca de la Comisión Nacional Mixta de Becas del Instituto Mexicano del Seguro Social con No. de matrícula 10739321.

El desarrollo experimental de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero para infraestructura recibido por el Centro de Investigación Biomédica de Oriente CTFIS/1ORD/12/2011.

CONTENIDO

	Pag.
Resumen……	***6***
Antecedentes generales……	***8***
Antecedentes específicos……..	***14***
Justificación……...	***25***
Definición del problema……	***26***
Hipótesis……	***27***
Objetivos……	***27***
Bioética……....	***28***
Material y métodos……...	***28***
Resultados ……..	***32***
Discusión……....	***52***
Conclusiones……..	***56***
Bibliografía……	***57***
Anexos……	***60***

RESUMEN

Introducción: La preeclampsia (PE) es un síndrome mediado por inmunidad, por lo general se desarrolla en el tercer trimestre del embarazo y se caracteriza por una excesiva respuesta inflamatoria sistémica materna, es un trastorno de causa desconocida que afecta el embarazo humano en aproximadamente 7-10%. Aunque se han propuesto una variedad de defectos inmunes y vasculares para explicar la etiología de esta enfermedad, se acepta que un defecto en el control de las células T efectoras, por las células T reguladoras conllevan al rechazo, originando hipertensión materna y las condiciones clínicas asociadas. La tolerancia inmune materna hacia el desarrollo del feto semi-alogénico presente en el embarazo sano se ve comprometida en PE. Algunos investigadores han planteado la hipótesis de un perfil predominio de Th1 / Th2 es decir Th17 / Treg en condiciones inflamatorias crónicas. La sobre regulación de la inmunidad Th17 puede inducir el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes, tal sería el caso de la preeclampsia-eclampsia

Objetivo: Comparar los niveles circulantes de linfocitos Th 17 y T reguladores en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.

Material y métodos: Estudio comparativo, observacional, transversal prospectivo, homodémico y unicéntrico; casos y controles. Se incluyeron para este estudio 54 pacientes embarazadas de la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social, 27 pacientes con preeclampsia (casos) cuyo diagnóstico se sustentó en el Lineamiento técnico 2007. Secretaria de salud. México DF; prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia y 27 pacientes normotensas sanas (controles) pareadas por edad gestacional, relación 1/1. Se colectaron datos clínicos mediante entrevista directa y consulta del expediente clínico, se obtuvieron muestras de sangre periférica para inmunofenotipar células T reg y Th17. La lectura se realizó mediante citometría de flujo en el laboratorio de inmunología especializada del Centro de Investigación Biomédica de Oriente. Los datos obtenidos fueron tratados con estadística descriptiva e inferencial

Resultados: No se observaron diferencias significativas entre los casos y los controles en edad (27.1 ±4.74 y 28.72±4.21 años, respectivamente; p=1.00) y edad gestacional de ingreso al estudio (36.5±3.48 y 36.5 ±3.45 semanas de gestación, respectivamente; p=1.00). Los valores de tensión arterial sistólica fueron de 156.9 ±13.03 y 111.4 ±9.42 mm Hg, para los pacientes y controles, respectivamente (p=0.0001). Mientras que para la tensión arterial diastólica los valores fueron 102.7 ±8.91 y 68.07 ±6.94 mm Hg, para los pacientes y controles, respectivamente (p=0.0001). Los resultados principales de esta investigación son dos: la expresión de células CD4+CD25+RORγ+ con proporción 9.75 para ambos grupo, y la expresión de células CD4+CD25+FoxP3+ 53.46 para los casos y 43.05 para los controles con una significancia estadística de 0.0006

Conclusiones: No se observan diferencias significativas en los niveles circulantes de linfocitos Th 17 en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia. Se observan diferencias significativas en los niveles circulantes de linfocitos Treg 17 en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia. Siendo mayores estos niveles en las pacientes con preeclampsia.

INTRODUCCION

La preeclampsia es un síndrome mediado por inmunidad por lo general se desarrolla en el tercer trimestre del embarazo y se caracteriza por una excesiva respuesta inflamatoria sistémica materna con la activación de ambos brazos del sistema inmunitario innata y adaptativa. La tolerancia inmune materna hacia el desarrollo del feto semi-alogénico presente en el embarazo sano se ve comprometida en PE. Los neutrófilos, monocitos, y células asesinas naturales activadas inician la inflamación, que induce la disfunción endotelial, y las células T activadas pueden apoyar mecanismos inadecuados de tolerancia materna. Una característica importante de la inflamación sistémica en preeclampsia eclampsia es la ausencia del fenotipo Th2 de manera asimétrica que el embarazo sano y por lo tanto el predominio de un fenotipo Th1 en preeclampsia-eclampsia.

Las células T reguladoras (T_{regs}) son mediadores de la tolerancia inmune materna hacia el desarrollo fetal. El factor de transcripción FoxP3 ha sido ampliamente utilizado como marcador intracelular para identificar este subgrupo. Los T_{regs} modulan las funciones de otras células T (tanto CD4 + y CD8 +), Principalmente a través de la secreción de citoquinas, incluyendo IL-10 y TGF-b y se cree que la menor proporción de Treg puede contribuir a la inflamación sistémica exagerada en la preeclampsia eclampsia.

Los linfocitos Th17 son un subconjunto recientemente descubierto de linfocitos T CD4 + que producen IL-17 su descubrimiento ha llevado a algunos investigadores a plantear la hipótesis de un perfil predominio de Th1 / Th2 es decir Th17 / Treg en condiciones inflamatorias crónicas. La sobre regulación de la inmunidad Th17 puede contribuir a la presencia enfermedades o reacciones inflamatorias crónicas como el rechazo del injerto, y también puede inducir trastornos alérgicos e inducir el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes, tal sería el caso de la preeclampsia-eclampsia. El objetivo de este estudio fue comparar los niveles de linfocitos Th17 y T reguladores circulantes en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.

ANTECEDENTES GENERALES

En la preeclampsia como en todos los grandes síndromes obstétricos, existe una placentación profunda defectuosa, resultado de las respuestas adaptativas de la unidad materno-fetal a agresiones patológicas. La medicina perinatal, se encuentra actualmente en una etapa en donde sólo puede ser identificado el síndrome clínico como tal, y no la etiología de la enfermedad. Está bien establecido que la placentación en los seres humanos está asociada con un proceso de remodelación vascular único, que implica la remodelación fisiológica de las arterias espirales durante la gestación.

En la placentación profunda durante el embarazo, se completa la transformación de los segmentos de la decidua y miometrio de aproximadamente 100 arterias espirales.

La placentación defectuosa profunda fue descrita por primera vez en Preeclampsia y Restricción del Crecimiento Intrauterino (RCIU) y se caracterizó por la ausencia o remodelación incompleta del segmento deciduo-miometrial de las arterias espirales *(Brosens 2011).*

La preeclampsia es una respuesta a las alteraciones tempranas en la resistencia vascular útero placentaria; y la presión arterial alta es un síntoma de la enfermedad y no la causa.

Las 2 principales características de este gran síndrome obstétrico llamado preeclampsia son: **a)** Tener una fase subclínica larga**. b)** Ser la manifestación clínica tardía de un proceso fisiopatológico crónico *(Brosens 2011).*

Esta larga fase subclínica ofrece una oportunidad para la detección precoz de la enfermedad definida en la escala molecular y celular con el fin de detectar su etiología y prevenir el impacto permanente de su aparición clínica *(Brosens 2011).* En este rubro en especial es necesario desarrollar marcadores tempranos de la enfermedad no solo para su tratamiento sino antes de la aparición del espectro clínico de la enfermedad *(OMS 2012).*

Clasificación de los estados hipertensivos del embarazo

Los estados hipertensivos del embarazo pueden ser clasificados de distintas maneras una de estas clasificaciones se menciona a continuación:

CLASIFICACIÓN DE LOS ESTADOS HIPERTENSIVOS DEL EMBARAZO
Hipertensión gestacional
Preeclampsia/ Eclampsia
Preeclampsia agregada a hipertensión crónica
Hipertensión crónica

(Lineamiento Técnico SSA 2007)

A su vez la preeclampsia se divide en leve y severa de acuerdo a sus características clínicas y de laboratorio.

Se considera a una mujer embarazada con mayor riesgo de desarrollar síndrome de Preeclampsia-Eclampsia (PE) cuando existe:

1. Hipertensión crónica o enfermedad renal preexistente (15 – 40%)
2. Diabetes mellitus preexistente (10 – 35%)
3. Enfermedades del tejido conectivo como lupus (10 – 20%)
4. Trombofilias congénitas o adquiridas (10 – 40%)
5. Obesidad (10 – 15%)
6. Edad mayor a 40 años (10 – 20%)
7. Embarazo gemelar (8 – 20%)
8. Embarazo triple (12 – 34%)
9. Antecedente de preeclampsia (11 – 22%)
10. Embarazo por semen de donador y donación de oocito (10 – 35%)
11. *Primigestas. (12 - 25%)*

(Lineamiento Técnico SSA 2007, Grill 2009)

En un estudio de casos y controles realizado en Sinaloa, en el que se incluyeron pacientes con preeclampsia (casos: n = 196) y normotensas (controles: n = 470), se analizó la asociación de la preeclampsia con la frecuencia de diversos factores de riesgo como son el nivel socioeconómico, tabaquismo, alcoholismo, antecedentes ginecoobstétricos (compañeros sexuales, embarazos, partos, abortos, control prenatal, método anticonceptivo utilizado) y preeclampsia en embarazo previo. De los factores de riesgo estudiados y que se asociaron significativamente con preeclampsia fueron: alcoholismo (RM: 5.77; IC 95%: 1.48-22.53), nivel socioeconómico bajo ($p < 0.05$), tipo de método anticonceptivo ($p < 0.005$), primigravidez y antecedente de preeclampsia en el embarazo previo (RM: 14.81; IC 95%: 1.77-123.85; $p = 0.0006$) (Morgan-Ortiz F 2010).

El factor de riesgo más fuerte para la aparición de preeclampsia es la primiparidad ya que 75% de los casos aparecen en primigestas (Reyna Villasmil 2009).

Diagnóstico clínico y de laboratorio preeclampsia eclampsia.

El diagnóstico de PE tiene sus bases en la presencia y combinación de datos clínicos y de laboratorio.

Los criterios para determinar la preeclampsia leve son los siguientes:

- 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.
- Proteinuria ≥ 300 mg en una recolección de orina de 24 horas o ≥ 30 mg/dl en dos muestras de orina tomadas al azar, con diferencia de seis horas entre cada una, en un lapso no mayor de siete días. Sin evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasmo persistente.

Para considerar el diagnóstico de preeclampsia severa es necesaria la presencia de uno o más de los siguientes criterios:

- Tensión arterial ≥ 160 o 110 mm Hg en, por lo menos, dos tomas con un mínimo de diferencia de seis horas entre cada una.
- Proteinuria ≥ 2 g en orina de 24 horas.
- Oliguria: diuresis < 500 ml en 24 horas.

- Creatinina sérica ≥ 1.2 mg/dl.
- Trastornos cerebrales severos persistentes o alteraciones visuales.
- Edema agudo pulmonar.
- Dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho del abdomen.
- Disfunción hepática (aspartato aminotransferasa ≥ 70 UI/L).
- Trombocitopenia (< 100 000 mm3).
- Coagulación intravascular diseminada.
- Cianosis.
- Restricción del crecimiento intrauterino debido a insuficiencia uteroplacentaria *(Lineamiento Técnico SSA 2007)*

Tratamiento de la preeclampsia leve y severa.

El tratamiento de la preeclampsia leve es controversial. La mayoría de la información está basada en estudios observacionales y opiniones de expertos. En pacientes con preeclampsia leve y en el segundo trimestre del embarazo debe considerarse el manejo expectante, en la preeclampsia severa el manejo es multidisciplinario.

El único tratamiento definitivo de la preeclampsia es la interrupción oportuna del embarazo, que debe efectuarse cuando la paciente se encuentre hemodinámicamente estable y con personal calificado presente *(Romero-Arauz 2012).*

INMUNOLOGIA DEL EMBARAZO

El sistema inmune juega un papel importante en la perpetuación de la especie, al permitir los procesos de reproducción desde la fecundación hasta el parto *(Saito 2010).*

Una característica fundamental del sistema inmune es proteger al huésped contra los patógenos. Esta función depende de la capacidad del sistema inmune innato para coordinar la migración celular, para vigilar, reconocer y responder a los microorganismos invasores. Durante el funcionamiento normal del embarazo, la decidua humana contiene un elevado número de células del sistema inmune; tales como macrófagos, células asesinas naturales (NK) y células T reguladoras (Treg). El 70% de

los leucocitos deciduales son las células NK, entre el 20 – 25% corresponde a los macrófagos y 1,7% son células dendríticas (CD).

Del sistema inmune adaptativo, las células B están ausentes, pero los linfocitos T constituyen aproximadamente el 3-10% de las células inmunes en la decidua. Durante el primer trimestre, las células NK, células dendríticas y los macrófagos infiltran la decidua y se acumulan alrededor del trofoblasto invasor. La supresión de cualquiera de ellos: macrófagos, células NK o CD tiene efectos deletéreos. Algunos estudios han demostrado que, en ausencia de las células NK, las células trofoblásticas no son capaces de llegar a la vascularización del endometrio lo que conduce a la terminación de la embarazo. Estos estudios sugieren que las células NK son críticas para la invasión normal del trofoblasto en el útero *(Mor 2010).*

Existe la propuesta ampliamente aceptada de que el embarazo es un estado inmunológico con fenotipo "Th2" o anti-inflamatorio. Esta hipótesis postula que durante el embarazo se producen citocinas anti-inflamatorias, cuyo desbalance daría lugar a complicaciones del embarazo como abortos. Si bien muchos estudios han confirmado esta hipótesis, un número similar de estudios argumentó en contra de esta noción (revisado en Armenta-Martínez 2011).

La razón de estos resultados contradictorios puede deberse a excesiva simplificación de observaciones formuladas durante el embarazo. Anteriormente el embarazo era evaluado como un evento único, cuando en realidad tiene tres fases inmunológicas distintas que se caracterizan por diferentes procesos biológicos.

a) **La implantación y la placentación**: durante esta primera etapa, el blastocisto tiene que atravesar el epitelio de revestimiento del útero para implantarse, dañar el tejido endometrial para invadir; posteriormente el trofoblasto sustituye al endotelio y al músculo liso vascular de los vasos sanguíneos maternos para asegurar un adecuado suplemento de sangre feto-placentario. Es necesario un ambiente inflamatorio para garantizar la reparación adecuada del epitelio uterino y la eliminación de los desechos celulares. Así, el primer trimestre del embarazo es una fase proinflamatoria.

b) **La segunda fase inmunológica** del embarazo es, en muchos sentidos, el tiempo óptimo para la madre. Este es un periodo de rápido crecimiento y desarrollo del feto. La madre, la placenta y el feto son simbióticos, y la función inmunológica predominante es la inducción de un estado antiinflamatorio.

c) **Durante la última fase inmunológica** del embarazo, el feto ha completado su desarrollo, todos los órganos son funcionales y preparados para el mundo externo. Ahora empieza el proceso de periparto, lo que se logra a través de la inflamación renovada, el parto se caracteriza por un influjo de células del sistema inmune en el miometrio que promueve el recrudecimiento de un proceso inflamatorio. Este entorno pro-inflamatorio promueve la contracción del útero, la expulsión del feto y la expulsión de la placenta.

Por lo tanto el embarazo es una condición pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, dependiendo del escenario de gestación *(Ernerudh 2011; Mor 2010).*

Linfocitos T y embarazo.

Existen múltiples estudios con datos sobre la actividad de los linfocitos T en el embarazo pero con resultados contradictorios, algunos autores reportan cambios en las subpoblaciones de linfocitos T periféricos durante el embarazo (Satner-Nanan 2009, Hu 2008).

Los linfocitos T más estudiados en el embarazo son los linfocitos T reguladores (T_{reg}) con fenotipo CD4+CD25+, se les ha propuesto como moduladores de la respuesta inmunológica de la madre. Durante el primer trimestre de embarazo existe un incremento de células T_{reg}, su principal función es la regulación del proceso de implantación. En abortos espontáneos se ha observado una disminución en el número de las células T_{reg} en la decidua comparada con los niveles observados en los embarazos normales. Mahmoud y otros investigadores observaron que durante el 1er. trimestre existe una disminución en los niveles de células B (CD19+) y un aumento de los linfocitos T (CD4+) y para finales del 3er trimestre ambas subpoblaciones de linfocitos están disminuidas en sangre periférica (Mor 2010).

Por lo anterior podemos establecer que las células inmunes son de suma importancia para el desarrollo de la decidua y el trofoblasto, así como para la formación de los vasos por los cuales se alimentará el feto, tanto de nutrientes como de oxígeno, y que el papel de estas células es generar un ambiente "inflamatorio" propicio y equilibrado para la unión del blastocisto y posterior invasión del trofoblasto. Este ambiente inflamatorio debe suprimirse una vez que el trofoblasto este implantado.

También es importante establecer que no es posible simplificar los cambios en el patrón de citocinas de acuerdo a las diferentes etapas de la gestación. Actualmente se ha establecido que existe un balance de las citocinas Th1/Th2, el cual es regulado entre otros factores por los niveles hormonales y la pérdida de este equilibrio se asocia con pérdida fetal, y desarrollo de preeclampsia entre otros problemas. Por lo que debe considerarse que para la evolución normal de un embarazo debe existir un balance entre las citocinas proangiogénicas y antiangiogénicas para generar un ambiente viable para el desarrollo de la gestación *(Mor 2010).*

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

La preeclampsia considerada como una enfermedad autoinmune.

Algunos de los posibles mecanismos moduladores de la tolerancia inmunológica durante el embarazo normal son:

- Equilibrio entre citocinas Th1/Th2 (proinflamatorias/antiinflamatorias)
- Expresión de moléculas no clásicas del complejo principal de histocompatibilidad: HLA-E, HLA-G.
- Alteraciones en el metabolismo del triptófano a través de la indolamina 2,3 dioxigenasa (2,3 IDO).
- Linfocitos T reguladores (Treg CD4+CD25+FoxP3+).
- Células NK.

La pérdida de uno varios de estos mecanismos de tolerancia al semialoinjerto fetal puede estar implicada en la génesis de la preeclampsia *(Balderas-Peña 2008).*

La preeclampsia es un síndrome que se caracteriza por la incapacidad del trofoblasto de invadir las arterias deciduales que conducen a alteraciones en la placenta, el desarrollo fetal, la perfusión placentaria y un transporte insuficiente de nutrientes. Es una causa importante de morbilidad materna y fetal y afecta 7-10 % de los embarazos.

La etiología exacta de la preeclampsia es desconocida, probablemente porque es un síndrome de origen heterogéneo. Aunque muchos factores de impacto de preeclampsia, aún no se han identificado; la evidencia reciente sugiere una asociación con una alteración de la angiogénesis, así como los cambios en la tensión de oxígeno local, las alteraciones inmunológicas en los primeros microambiente placentarios *(Armenta Martínez 2011).*

El éxito temprano de un embarazo se basa en la implantación y placentación; Los cambios o alteraciones en estos dos eventos pueden causar una serie de problemas inmediatos o a largo plazo incluyendo la infertilidad, aborto, el crecimiento intrauterino restringido o parto pretérmino espontáneo, además de la preeclampsia. Esta insuficiencia placentaria contribuye a condiciones de hipoxia y hace que aparezcan manifestaciones maternas de la enfermedad: la hipertensión, proteinuria, coagulopatía y disfunción hepática. La intención de esta argumentación es abordar una visión de los primeros eventos inmunológicos que participan en la implantación y placentación, puede ser que su modulación adversa conduzca a la preeclampsia *(Serrano 2006).*

En el síndrome preeclampsia, una de las observaciones más importantes, que es compatible con una disminución de la perfusión placentaria, es la pobre remodelación vascular de las arterias espirales uterinas que irrigan el espacio intervelloso.

La remodelación vascular normal es alcanzada por la migración del citotrofoblasto diferenciada en la octava semana de gestación , deben existir dos precursores de las vellosidades diferentes para diferenciadas en subpoblaciones separadas : (I) el sincitiotrofoblasto , que es formada por la fusión de trofoblasto velloso , y (II) el trofoblasto extravelloso que es invasivo y pasa a través del sincitiotrofoblasto y forma las columnas extravellositarias.

El trofoblasto extravelloso consta de todo el trofoblasto situado fuera de la placenta y vellosidades el cual es altamente migratoria, proliferativa e invasiva *(Laresgoiti-Servitje 2010).*

El citotrofoblasto que se diferencia en el fenotipo invasivo expresa nuevas moléculas unidas a la membrana y moléculas de adhesión. En la preeclampsia, el

citotrofoblasto no adquiere el fenotipo vascular invasor, ya que no puede expresar las moléculas de adhesión características del citotrofoblasto extravelloso diferenciado y mantiene el fenotipo del citotrofoblasto de la región de la columna proximal *(Schiffrin 2010).*

Esto contribuye a la inadecuada invasión del trofoblasto alterado y el fracaso de la remodelación vascular en la preeclampsia. La invasión del citotrofoblasto implica, además de adhesión vascular, una aproximación física de estas células a la matriz extracelular, la degradación de esta matriz y su migración subsiguiente. Con el fin de degradar la matriz extracelular, aparecen obligadamente metaloproteinasas de la matriz (MMP). Que participan en la invasión del trofoblasto en el embarazo humano normal, siendo la MMP-9 la más abundante, debido a una mayor expresión durante las semanas 3 a 9 de la gestación. En la preeclampsia, el citotrofoblasto es deficiente en la producción de MMP-9 *(Laresgoiti-Servitje 2010).*

<u>El rol del sistema inmune en el origen de la preeclampsia.</u>

Varios investigadores postulan que la pobre invasión de trofoblasto puede ser atribuida a una respuesta inmune aberrante materna contra el trofoblasto *(Serrano 2006).* De hecho, es frecuente que la tensión de oxígeno tienda a bajar y la infra-expresión de los factores angiogénicos sea secundaria a alteraciones inmunológicas observadas en este síndrome. Se ha propuesto que hay dos etapas en la preeclampsia: la primera es mala invasión de trofoblasto como resultado de inadecuada expresión de HLA-G que conduce a una disminución de la estimulación de las células NK deciduales que participan en la producción de citocinas inmunorreguladoras y factores angiogénicos. La segunda etapa es caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica que afecta leucocitos y el endotelio. Este estímulo inflamatorio parece originarse en la placenta, y puede ser causada por la liberación de productos de apoptosis del sincitiotrofoblasto en la circulación materna *(Reyna-Villasmil 2009).*

El papel del sistema inmune en el desarrollo de la preeclampsia implica no sólo a las células NK, células T CD4+ subpoblaciones CD8+, células dendríticas, moléculas de adhesión y citocinas. Se requiere el conocimiento de los mecanismos que conducen al desarrollo fetal o del citotrofoblasto, de la tolerancia por el sistema inmune materno en el embarazo normal, para entender que los componentes del sistema inmune pueden

estar involucrados en las respuestas que conducen a la mala la invasión del trofoblasto en las mujeres con preeclampsia.

En resumen se describe cómo los componentes del sistema inmune (células, citocinas y moléculas) participan en los orígenes de la preeclampsia, ya sea porque producen ciertos efectos (a consecuencia del tipo de citocinas liberadas), o debido a que modulan la respuesta inmune o a alteraciones de su función que promueven el desarrollo de esta enfermedad (Reyna-Villasmil 2009).

El paradigma Th1/Th2 y su relación con la preeclampsia.

Durante muchos años, el modelo de regulación inmune durante el embarazo ha tenido sus bases en un cambio de la respuesta inmune materna a partir de Th1 hacia una respuesta Th2 *(Saito et al, 2010)*. Este modelo se basa en la observación de que en una mujer no embarazada, la respuesta que provoca un antígeno presentado a un linfocito T dependerá, en parte, de las citocinas que abunden en el microambiente en el que este linfocito está presente. Por ejemplo, un microambiente rico en IL-12, IL-18 e IFN-gamma favorecerá la producción de las células Th1 que secretan TNF-alfa, IL-2 e IFN-gamma y promueven la activación de otras células tales como macrófagos y linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, un microambiente rico en IL-10 e IL-4 promoverá la producción de linfocitos Th2. Las células Th1 inhiben la respuesta de células Th2 y viceversa. En mujeres sanas no embarazadas, hay un equilibrio entre las respuestas de Th1 y Th2. Sin embargo, durante el embarazo, este equilibrio es notablemente alterado por la presencia de la placenta, ya que la progesterona y las citocinas modulan las células inmunes a través de la respuesta Th2.

Se ha propuesto que en la preeclampsia el cambio hacia Th2 probablemente no se produce, o que se revierte en etapas muy tempranas de la enfermedad. En consecuencia, las respuestas Th1 no son suprimidas y la producción de IFN-gamma es normal. Como se señaló anteriormente, en mujeres con preeclampsia, los perfiles de citocinas en sangre periférica son principalmente Th1, que muestran un aumento de IFN-gamma y una disminución de la IL–4. Además, se han disminuido los niveles de IL-10 en el suero y la placenta en estas pacientes. Las células Th2 predominan en el

segundo y tercer trimestres del embarazo normal, mientras que las subpoblaciones Th1 son más comunes en los pacientes con preeclampsia *(Saito et al., 2010).*

Chaouat et al., han abordado las limitaciones del paradigma Th1/Th2 en el embarazo ya que el IFN-gamma no puede ser, por sí mismo, el elemento decisivo, porque se requiere esta citocina a dosis bajas para el desarrollo vascular y la transformación de las arterias espirales uterinas necesaria para la implantación normal. Así la implantación normal requiere la participación de ciertas respuestas inflamatorias, este paradigma podría ser demasiado simplista, sobre todo en las enfermedades del embarazo. Por lo tanto el papel de las células NK y otras citocinas, tales como IL-12, IL-8, etc., secretadas por las células del sistema inmune y por otras células también deben ser consideradas *(Laresgoiti-Servitje 2010).*

Otras citocinas también modulan las respuestas Th1/Th2, tales como la familia del factor transformante del crecimiento (TGF-b), aunque su papel exacto sigue siendo controvertido. Nueva evidencia ha demostrado que a pesar de que participan en una diversidad de funciones biológicas, cada subtipo desempeña funciones particulares en la regulación del sistema inmunológico. En la placenta humana, no existe aún evidencia sólida sobre papel del TGF-b en el origen de la preeclampsia. Es evidente que se necesitan más trabajos para revelar las complejas interacciones de citocinas involucradas durante la implantación y placentación *(Ernerudh 2011).*

El papel de los linfocitos T reguladores

Las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, no se limitan a las células Th1 y Th2. Las subpoblaciones de linfocitos Treg y Th17 también han sido el foco de muchas investigaciones recientes de embarazos normales y las patologías relacionadas con el embarazo *(Saito 2010).*

Como se mencionó anteriormente, un predominio de citocinas Th2 ha sido considerada un importante factor determinante mecanicista para la supervivencia del feto. Hay investigaciones que sugieren que los productos de otras células, y no necesariamente los linfocitos Th2, deben regular las células Th1 alorreactivas en el embarazo. Ellos podrían, tal vez, ser modulados por los linfocitos Treg. Las células Treg son linfocitos CD4+ que constitutivamente expresan CD25 y Foxp3, que es el gen

maestro que controla el desarrollo y la función natural de las células T reguladoras. Estas células han sido el centro de atención en los últimos estudios ya que juegan un papel importante en el mantenimiento de la autotolerancia y en el control negativo de respuestas inmunes patológicas y fisiológicas. Las células Treg también participan en la mediación de la tolerancia materna al feto humano. En el embarazo normal, un alto porcentaje de linfocitos aislados de la decidua tienen el fenotipo regulador (es decir, son Treg), mientras que en la sangre periférica de estas mismas mujeres hay menos Treg que en las mujeres no embarazadas. Esto sugiere un reclutamiento preferencial de las células Treg hacia la interfaz feto-materna donde pueden contribuir a la regulación de las respuestas específicas locales. El papel de los linfocitos Treg en la preeclampsia no es completamente claro todavía. Algunos investigadores han reportado que los pacientes con preeclampsia y las mujeres con embarazos normales no tienen diferencias en el número de subpoblaciones de linfocitos en la sangre periférica. Esta observación podría rechazar la posibilidad de que la preeclampsia se asocia con una disminución de la cantidad de células Treg, de acuerdo con esa posibilidad, otros investigadores han informado de una disminución en la presencia de los linfocitos Treg en la sangre periférica de pacientes con preeclampsia *(Laresgoiti-Servitje 2010).*

Por lo tanto, se propuso que las alteraciones en el equilibrio entre estas células Treg podrían estar asociadas con la preeclampsia. Los linfocitos Treg promueven la tolerancia a este nivel por la activación de vías alternativas, y no necesariamente mediante la promoción de un cambio en la producción de citocinas en el sistema inmune. Esto podría ser particularmente aplicable a la preeclampsia, donde los perfiles de citocinas son desviados hacia el fenotipo Th1 (Ernerudh 2011, Arias 2010).

Participación de los linfocitos Th17 en la preeclampsia

Datos recientes han puesto de manifiesto vínculos importantes en el desarrollo y funcionamiento entre las células Treg inducidas (iTreg) y las células Th17 que comparten un requisito: el factor transformante del crecimiento (TGF-b) para desarrollarse a partir de células T nativas. La diferenciación terminal de las células Th17 requiere IL-1b e IL-6 en los seres humanos. Las células Treg, las cuales inducen tolerancia, y las células Th17, inducen inflamación o rechazo, parecen surgir a partir de precursores comunes, en la exposición a TGF-b solo (iTregs) o TGF-b más IL-1b o

IL-6 (Th17). Un desequilibrio entre las células Treg y Th17 se ha propuesto como un mecanismo patogénico en varias enfermedades humanas. Las células Th17 producen citocinas proinflamatorias, tales como la IL-17A, IL-17F e IL-22.

Las teorías 1) de la inflamación crónica, 2) de la disfunción endotelial, 3) de la pobre angiogénesis, y 4) de la mala adaptación inmune en la fisiopatología de la preeclampsia-eclampsia podrían estar vinculadas, por la diferenciación desequilibrada de las células Treg y Th17.

En un embarazo normal, las células Treg se expanden para llegar a un adecuado nivel para la inducción de la tolerancia de antígenos paternos, pero en los casos de preeclampsia-eclampsia, la endoglina soluble producida por las células endoteliales y el sincitiotrofoblasto pueden perturbar la diferenciación de las células Treg y la angiogénesis. Por otra parte, IL-1b e IL-6 producidas por las células dendríticas pueden promover la diferenciación de células T nativas en células Th17 y hasta la conversión de las células Treg en células Th17. El aumento de las células Th17 entonces inducirá inflamación crónica, lo que resulta en la disfunción endotelial.

En resumen, un desequilibrio entre las células Treg y la diferenciación de células Th17 puede explicar la patogénesis de la preeclampsia-eclampsia poniendo fin al caos en las numerosas teorías propuestas hasta ahora (Saito, 2010).

Los linfocitos Th17 representan una subpoblación recientemente descrita de células T, que protegen contra las bacterias extracelulares pero también conducen a trastornos autoinmunes. Sus propiedades en humanos sólo se conocen parcialmente. Los linfocitos Th17 comparten características con las células Th1, los Th17 pueden ser activados por IL-12. Se sabe muy poco sobre el papel de las células Th17 en el embarazo con trastornos, como la preeclampsia, pero debe considerarse la posibilidad de que linfocitos con el fenotipo Th17 o Th17/Th1 podrían estar involucrados *(Laresgoiti-Servitje 2010).*

La incursión en la teoría inmunológica de la preeclampsia que continúa vigente hasta este momento y es una de las más consistentes (*ACOG 2013*) ha llevado a la búsqueda de diferentes tipos de células, anticuerpos y marcadores del sistema inmune como posibles marcadores de preeclampsia, lo que abre inmensa gamma de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

Hay varios factores que se han propuesto en las últimas décadas, para contribuir a la patogénesis de la Preeclampsia-Eclampsia, incluyendo pobre placentación, pobre angiogénesis y la inflamación crónica o endoteliosis; pero los hallazgos epidemiológicos sugieren que una mala adaptación inmune es la causa principal de PE; por ejemplo, PE se presenta más comúnmente en la primera concepción, y cuando hay un cambio de pareja, el riesgo aumenta de nivel en el primer embarazo. Un intervalo intergenésico largo de más de 10 años es también un factor de riesgo de PE. Las células T de memoria, que inducen la tolerancia a los antígenos paternos, pueden explicar estos resultados epidemiológicos. A pesar de que una multitud de defectos inmunológicos y vasculares, se han propuesto para explicar la etiología de esta enfermedad, en general se acepta que un desequilibrio y control defectuoso de las células Th17 por Treg conduce a un rechazo del feto, causando la hipertensión materna y las manifestaciones clínicas asociadas *(Saito 2010).*

El trabajo del Dr. Steinborg y sus colaboradores en relación a la caracterización de los linfocitos Treg y las enfermedades asociadas al embarazo, menciona que durante décadas los inmunólogos han estado investigando sobre los mecanismos celulares que previenen el rechazo del feto semialogénico durante el curso normal del embarazo. Con frecuencia se presume que las células Treg están involucradas en el mantenimiento de la tolerancia durante el embarazo. El conteo de las células T durante el embarazo permanece aún controvertido. Estudios recientes documentan un incremento de las células Treg en mujeres embarazadas cuando se compararan con mujeres no embarazadas; mientras que otros estudios postulan que el conteo de células T disminuye durante el curso del embarazo normal. Desde luego el número de células Treg depende fuertemente de la estrategia con la que se caracterizan las células T después de teñirlas para el análisis de la citometría de flujo y del momento en que se determinen en el curso del embarazo normal.

Los cambios más prominentes en la composición de linfocitos Treg durante el curso del embarazo normal, se observan entre la semana 3 y 10 de gestación. Después de la semana 20 la composición de células Treg no sufre cambios significativos. Su actividad supresora permanece estable durante el progreso normal del embarazo pero disminuye significativamente al término del mismo. Se propone que la preeclampsia y el parto pretérmino son caracterizados por cambios en la composición de las células

Treg que se acompañan por una disminución de su actividad supresora (Steinborg 2011).

En el trabajo realizado por la Dra. Darmochwal-Kolarz y el Dr. Saito quienes han estudiado ampliamente el sistema inmune durante la gestación; específicamente la asociación de células Treg/preeclampsia; y cuyo objetivo fue investigar la activación de linfocitos T CD3+, T cooperadores CD4+ y T citotóxicas CD8+, así como las poblaciones de células T nativas CD4+CD45RA+, T de memoria CD4+ CD45RO + y linfocitos Treg en preeclampsia y mujeres embarazadas sanas, donde se estudiaron 25 pacientes con preeclampsia y 30 mujeres en el tercer trimestre de embarazo saludable. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica, se tiñeron con anticuerpos monoclonales y se estimaron sus porcentajes utilizando el método de citometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron que la población de linfocitos Treg fue significativamente menor en el grupo de pacientes con preeclampsia en comparación con los controles ($p < 0,01$). Parece ser que la activación de los linfocitos T se asocia con la deficiencia de las células Treg en la preeclampsia (Darmochwal-Kolarz 2007). Por lo anterior, se sostiene la teoría de un desequilibrio en el sistema inmune que está asociado con la preeclampsia.

El equipo de la Dra. Santner-Nanan en 2009, tomando en cuenta que las células Treg contribuyen a mantener la tolerancia durante el embarazo, ha propuesto que el embarazo normal está asociado con un número elevado de células Treg. Si la deficiencia en el número y función de las células Treg son implicadas en el desarrollo de preeclampsia o no, permanece controversial. Ellos postularon que la preeclampsia puede acompañarse de una alteración en la diferenciación de células Treg y un cambio en la producción de citocinas proinflamatorias como IL–17; midieron el número de células Treg y la producción de IL-17 al final del tercer trimestre en mujeres embarazadas sanas versus mujeres embarazadas preeclámpticas para observar los cambios en el curso del embarazo y encontraron que las células CD4+ productoras de IL-17 disminuyeron durante el embarazo saludable, esto fue asociado a un incremento en el número de células CD4+ FoxP3, cuando se compararon con las mujeres preeclámpticas; mientras que las células productoras de IL-10 e interferón gamma se mantuvieron sin cambios. Para estimar la diferencia en los subpoblaciones de células T, en una muestra constituida por 24 mujeres no embarazadas, 35 embarazadas saludables y 36 pacientes embarazadas preeclámpticas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: un incremento en el porcentaje en sangre periférica de células Treg en

pacientes embarazadas sanas comparadas con mujeres preeclámpticas ($p < 0.001$). (Santner-Nanan 2009). Ellos deducen que el equilibrio entre células Treg y Th17 es fundamental para mantener la tolerancia al feto y evitar la preeclampsia.

En el estudio realizado por Darmochwal-Kolarz y su equipo en el 2012 cuyo objetivo fue estimar la prevalencia de linfocitos CD3+CD4+ productores de IL-17, IL-2, IFN–gamma e IL-4, además de las células Treg CD4+CD25+FoxP3+, en sangre periférica de pacientes embarazadas con preeclampsia y embarazadas en el tercer trimestre de embarazo normal, otro propósito fue evaluar la actividad inmunosupresora de las células Treg de pacientes con preeclampsia en comparación con los controles. Fueron incluidas 34 pacientes con preeclampsia y 27 mujeres sanas embarazadas. Los porcentajes se estimaron utilizando citometría de flujo. El resultado fue que el porcentaje de linfocitos T CD3+ CD4+ productores de IL-17A fue significativamente mayor en la preeclampsia que en las mujeres embarazadas sanas normotensas en el tercer trimestre ($p < 0,001$). La población de células Treg CD4+CD25+FoxP3+ fue significativamente menor en el grupo de mujeres con preeclampsia en comparación con los controles ($p < 0,05$) (Darmochwal-Kolarz 2012).

Estos resultados proponen la regulación de la respuesta inmune Th17 en la preeclampsia. La disminución del número y la función de las células Treg puede ser responsable de la activación de la respuesta inflamatoria característica de este trastorno. En la preeclampsia, el predominio de la inmunidad Th17 podría actuar a través de la modulación del equilibrio inmune Th1/Th2 (Darmochwal-Kolarz 2012).

El estudio realizado por Prins y colaboradores, en 2009; parte de la base de que algunos mecanismos inmunológicos están involucrados en la fisiopatología de la preeclampsia y que durante el embarazo hay un incremento en la células Treg, las cuales tienen un papel importante en regular la tolerancia al feto el cual es inmunológicamente diferente. El objetivo fue investigar cualquier asociación entre los embarazos complicados con preeclampsia y los niveles de células Treg en sangre periférica, inmediatamente antes del parto o de la cesárea. Obtuvieron sangre periférica de 26 mujeres embarazadas sanas y 18 pacientes preeclámpticas y evaluaron las células Treg mediante citometría de flujo. Así demostraron que el porcentaje de células CD4+FOXP3+, en sangre periférica fue significativamente más bajo en mujeres con preeclampsia que en mujeres embarazadas sanas ($p < 0.01$); concluyendo que la deficiencia de células reguladoras tiene un papel importante en la fisiopatología de la preeclampsia (Prins 2009).

Existen resultados controversiales respecto al papel de las células T reg en el embarazo. El Dr. Hu y su equipo realizaron una investigación cuyo objetivo fue identificar los linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ en sangre periférica en el embarazo normal y en la preeclampsia y explorar su rol en la patogénesis de la preeclampsia. Para ello reclutaron un grupo de 27 mujeres con preeclampsia, 27 con embarazo normal en el tercer trimestre y 27 mujeres no embarazadas sanas. Se tomaron muestras de sangre periférica, los linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ se analizaron por citometría de flujo, y se calculó la proporción linfocitos Treg. La cantidad y la proporción de células Treg no fueron significativamente diferentes entre las pacientes que no están embarazadas, el grupo de pacientes con embarazo normal y con preeclampsia (p 0,05 para ambos). No hubo diferencias significativas en la proporción y la cantidad de células T reguladoras CD4+CD25+ en los subgrupos con preeclampsia leve y severa (p 0,05 para ambos). Al no observarse ningún cambio significativo en sangre periférica de células T reg, en esa investigación, se sugiere que otros mecanismos en lugar de células T reg CD4+CD25+ estarían involucrados en la patogénesis de la preeclampsia (Hu 2009).

Basados en los estudios anteriores, se realizó esta investigación tipo estudio transversal en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia sin otras enfermedades concomitantes para determinar los valores de linfocitos Th17 y Treg. A fin de comparar si hay diferencia en el equilibrio de estas células y si los valores se asocian de alguna manera con la preeclampsia.

JUSTIFICACIÓN.

En los países subdesarrollados, las formas severas de la preeclampsia y la eclampsia son más comunes, y la tasa de incidencia de todos los partos va desde el 4% hasta el 18% en algunas partes de África. En América Latina, la preeclampsia es la causa número uno de la muerte materna. En México la enfermedad hipertensiva, edema y proteinuria del embarazo, el parto y el puerperio contribuyeron con el 20.8% de la mortalidad materna en la semana gestacional número 46. En el Hospital General Regional No. 36, se atienden un número aproximado de 8000 nacimientos por año, con un ingreso aproximado de pacientes con preeclampsia severa de 250 en un año.

Esta investigación tiene relevancia porque aportará conocimiento acerca de un grave problema de salud pública. Además resulta de utilidad práctica y clínica conocer las diferencias de la respuesta inmune entre pacientes con y sin preeclampsia ya que de la generación de este conocimiento se beneficiará la comunidad médica y sobretodo las pacientes portadoras de factores de riesgo para preeclampsia y nos ayudará a mejorar el control prenatal de las pacientes en riesgo de desarrollar esta enfermedad.

Las Implicaciones prácticas que reviste esta investigación se basan en que conoceremos las diferencias de la respuesta inmune entre el embarazo normoevolutivo y con preeclampsia, lo que podría aplicarse en la práctica clínica para detectar a pacientes en riesgo de desarrollar la enfermedad, además de tener implicaciones para una amplia gama de problemas obstétricos.

Con esta la investigación, se conocerá más a cerca de la respuesta inmunológica de la paciente con preeclampsia y los resultados se podrán generalizar a principios más amplios. La información que se obtenga puede servir para conocer en mayor medida el comportamiento de la respuesta inmune durante el embarazo y la relación que guarda con preeclampsia, ofreciendo la posibilidad de una exploración fructífera, pudiendo sugerir ideas, recomendaciones o hipótesis a futuros estudios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La preeclampsia es un síndrome complejo con una fisiopatología documentada que se inicia muy temprano en la gestación. Sin embargo, sus signos clínicos no aparecen hasta el segundo o tercer trimestre con los antecedentes conocidos sobre los cambios en el sistema inmune, es posible investigar los ambientes inmunológicos que condujeron a la placentación anómala que son la causa-raíz de la preeclampsia.

En el Instituto Mexicano del Seguro Social, especialmente en el Hospital General Regional 36 IMSS Puebla que atiende a la población obstétrica del estado de Puebla y es considerada un centro de referencia para otros estados vecinos no contamos con marcadores tempranos de la principal causa de muerte, la preeclampsia que por definición es una causa de muerte previsible.

Un desequilibrio en la diferenciación entre células Treg y las células Th17 puede explicar la patogénesis de Preeclampsia-Eclampsia. Sin embargo hasta el momento no se conoce en población mexicana derechohabiente del IMSS cuál son los niveles circulantes de linfocitos Th17 y Treg en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia.

Por lo que surge la siguiente pregunta:

¿Existe diferencia en los niveles circulantes de linfocitos Th17 y linfocitos T reguladores en pacientes embarazadas con y sin preeclampsia?

HIPOTESIS

Hipótesis nula.

Los niveles circulantes de linfocitos Th17 y T reguladores no muestran diferencia en mujeres con y sin preeclampsia.

Hipótesis alterna.

Los niveles circulantes de linfocitos Th17 y T reguladores son diferentes en mujeres con y sin preeclampsia.

OBJETIVOS

General: Comparar los niveles de linfocitos Th17 y T reguladores circulantes en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia.

Específicos:

- **a.** Determinar la proporción de células Th17 (CD4+CD25+ROR-γ+) en linfocitos de sangre periférica de pacientes embarazadas con y sin preeclampsia mediante citometría de flujo.
- **b.** Determinar la proporción de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) en linfocitos de sangre periférica de pacientes embarazadas con y sin preeclampsia mediante citometría de flujo.
- **c.** Analizar la asociación entre la proporción de linfocitos Th17/Treg y la presentación de preeclampsia en mujeres embarazadas.

BIOÉTICA

Esta investigación se clasificó como riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 de la Ley General de Salud. Cumple con las pautas éticas internacionales, los principios básicos de la Declaración de Helsinki (última modificación en Brasil, Octubre 2013; *Asociación Médica Mundial, 2013*) y la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de investigación médica (publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de abril de 2014). Además, este estudio se ajusta a las normas institucionales en materia de investigación científica y fue aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación en Salud con el No. R-2013-2102-60.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se llevó a cabo un estudio comparativo, observacional, transversal, prolectivo, homodémico y unicéntrico; de febrero de 2014 a abril de 2015; en la División de Ginecología y Obstetricia del Hospital General Regional número 36. Puebla, Pue., México.

Se incluyeron 54 pacientes embarazadas, 27 casos con preeclampsia (de base hospitalaria) tomando como definición operacional los criterios que establece el Lineamiento Técnico 2007 de la Secretaria de Salud de México. Para la prevención el diagnóstico y el manejo de la preeclampsia/eclampsia; y 27 controles (a razón de 1 control por cada caso) de base poblacional embarazadas sanas normotensas. Estos grupos se parearon por edad gestacional. Las pacientes pertenecen a la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social, todas las pacientes leyeron y firmaron el consentimiento informado (Anexo 2).

Las variables principales y de ajuste se definieron con anticipación así como los criterios diagnósticos. Las variables a considerar fueron preeclampsia-eclampsia, niveles circulantes de linfocitos Th17 y T_{reg}. Las variables de ajuste que se consideraron fueron edad de las pacientes, edad gestacional, peso corporal.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad entre los 15 y 35 años, embarazo único, de cualquier edad gestacional, que fuera factible conocer sus resultados perinatales hasta la resolución de la gestación. Se excluyeron pacientes con otras comorbilidades con diagnóstico reconocido en el expediente antes de su ingreso al estudio: enfermedades crónicas, degenerativas, hipertensión crónica, enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, infección sistémica o haber sido hospitalizadas por otras complicaciones obstétricas antes de su ingreso al estudio.

Ninguna paciente del grupo control desarrolló signos de hipertensión o de preeclampsia, criterio para ser eliminada.

Se realizó el cálculo del tamaño de muestra con la fórmula para una proporción de diferencia de promedios en una población finita.

La información se recolectó mediante entrevista directa, exploración física, consulta del expediente clínico, resultados de laboratorio clínico y citometría de flujo.

Se estandarizaron todas las técnicas mediante una prueba piloto: entrevista, corroboración diagnóstica, toma de muestra de sangre periférica, análisis de la muestra sanguínea con inmunofenotipificación con anticuerpos monoclonales, obtención de lectura mediante citometría de flujo,

Análisis estadístico

A todos los datos se les realizo la prueba de Kolgomorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos. Posteriormente se determinaron proporciones, rangos inter cuartiles, media y desviación estándar. Para determinar diferencias entre grupos se realizaron diferentes pruebas según fue el caso para variables no categóricas se realizó una X^2, mientras que para variables categóricas se realizó una prueba T de Student para datos normales y una U de Mann Withney para datos no normales. Para determinar correlaciones entre las variables se calculó la r de Spearman o r de Pearson, según la normalidad de los datos.

La estrategia de trabajo fue la siguiente:

1. Una vez identificadas las pacientes del grupo de casos se les invitó a participar en el estudio, previa explicación e información de su participación.
2. Lectura y firma del consentimiento informado (Anexo 2).
3. Entrevista directa, consulta del expediente clínico, exploración física.
4. Toma de presión sanguínea con baumanómetro aneroide para confirmar hipertensión (Anexo A).
5. Se llenó la hoja de recolección de datos para la obtención de variables sociodemográficas (Anexo 1).
6. Se identificaron mujeres embarazadas para el grupo control, seleccionándolas de acuerdo con su edad gestacional para parearlas con cada caso.
7. Se realiza el llenado parcial del instrumento de recolección de datos mediante entrevista directa y consulta del expediente clínico, obteniéndose datos clínicos y antropométricos, ficha de identificación, fecha de última menstruación, antecedentes obstétricos, cálculo de la edad gestacional tensión arterial, peso y talla.
8. Se realizó toma de muestra de sangre periférica para determinación de linfocitos en el momento de su ingreso al estudio (Anexo B). Es decir, en las pacientes del grupo problema en el momento del diagnóstico y antes de la administración de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad; y en las pacientes del grupo control, la toma de la muestra se realizó al momento de cumplir la edad gestacional que las empareja a la paciente del grupo problema.
9. Identificación de las muestras de sangre, transporte al laboratorio y almacenamiento en refrigeración.
10. Análisis de las muestras de sangre periférica en el laboratorio especializado en inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente para determinar niveles circulantes de linfocitos.
    a. Separación de las células mononucleares mediante de centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (Anexo C).
    b. Marcaje de células con el kit para la identificación de linfocitos T reguladores *Human FoxP3 Buffer Set BD Pharmigen*^{TM} (Anexo D).

c. Marcaje de células con el kit para la identificación de linfocitos Th17 *Anti-human/Mouse ROR gamma (t) APC Affimetrix eBioscience* (Anexo D).
d. También se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anticuerpo de ratón anti CD4 humano conjugado a FITC (Mouse Anti-Human CD4), anticuerpo de ratón anti CD25 humano conjugado a PE (Mouse Anti-Human CD25), anticuerpo de ratón anti FoxP3 humano conjugado a Alexa Fluor® 647 (Mouse Anti-Human FoxP3).
e. Adquisición de datos en el citómetro de flujo FACS Canto™ II Flow Cytometry System de Becton-Dickinson (Anexo E).

11. Se estudiaron los resultados perinatales al momento del desenlace obstétrico en ambos grupos.
12. Análisis estadístico de los datos.
13. Elaboración del documento final y presentación de los resultados.

RESULTADOS

Se incluyeron en este estudio 54 mujeres embarazadas, de las cuales 27 presentaron signos clínicos de preeclampsia. Las otras 27 fueron seleccionadas entre mujeres con embarazo normoevolutivo, de acuerdo con su edad gestacional para parearlas con cada una de las mujeres del grupo problema, y cumplieron con los criterios para ser incluidas en el grupo control.

A toda la población de estudio se le dio seguimiento hasta la resolución de la gestación.

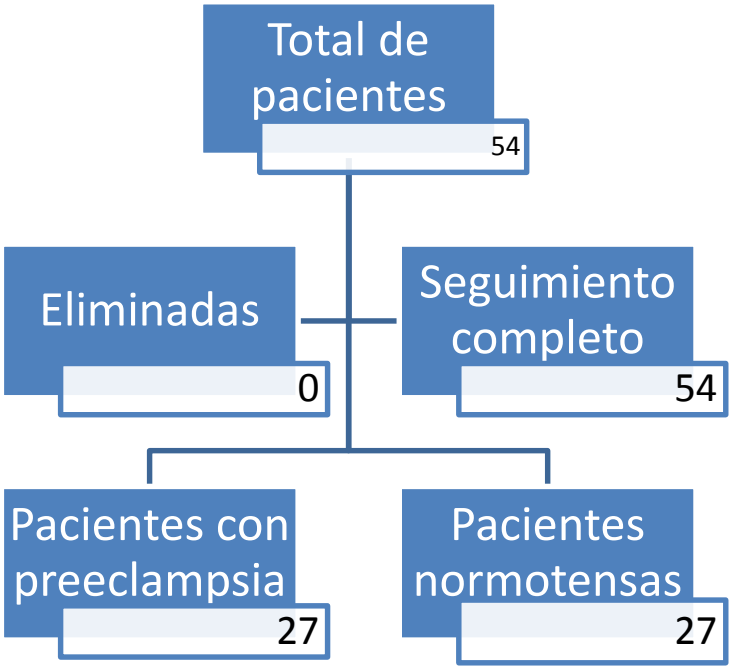


Figura 1. Flujograma de la clasificación de pacientes incluidas en el estudio.

En la evaluación de las pacientes participantes en el estudio, se determinaron diversos parámetros, los cuales fueron clasificados en cuatro grupos: 1) datos socioculturales, 2) datos clínicos, 3) datos obstétricos, y 4) datos del recién nacido.

Datos socioculturales

En relación a los datos de índole sociocultural, se incluyó información sobre la escolaridad, estado civil y ocupación de las pacientes. Se observa que no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio, en lo que respecta a ocupación y estado civil (Cuadro 1).

Cuadro 1. Datos socioculturales de las pacientes					
	Casos		***Controles***		
Escolaridad:	***N***	***%***	***N***	***%***	***p***
Primaria incompleta	0	*0*	1	*3.7*	*0.313*
Primaria completa	3	*11.1*	0	*0*	*0.075*
Secundaria incompleta	2	*7.4*	0	*0*	*0.150*
Secundaria completa	5	*18.5*	12	*44.4*	*0.040*
Preparatoria incompleta	4	*14.8*	3	*11.1*	*0.484*
Preparatoria completa	6	*22.2*	4	*14.8*	*0.484*
Carrera técnica	2	*7.4*	4	*14.8*	*0.386*
Profesionista	5	*18.5*	3	*11.1*	*0.221*
Estado civil					
Casada	12	*44.4*	7	*25.9*	*0.154*
Unión libre	11	*40.7*	11	*40.7*	*1.00*
Soltera	4	*14.8*	9	*33.3*	*0.111*
Ocupación					
Ama de casa	6	*22.2*	*6*	*22.2*	*1.00*
Obrera	11	*40.7*	*11*	*40.7*	*1.00*
Empleada	9	*33.3*	*10*	*37.0*	*0.776*
Empresaria	1	*3.7*	0	*0*	*0.313*

Datos clínicos

Dentro de los parámetros clínicos que se analizaron están la edad de las pacientes y la edad gestacional, la tensión arterial y la concentración de proteínas en la orina. No se encontraron diferencias significativas en los promedios de edad entre las mujeres del grupo problema y el grupo control. Tampoco en las edades gestacionales entre ambos

grupos, ya que éste fue el criterio utilizado para homologar a cada paciente con su control.

El parámetro principal para determinar la presencia de preeclampsia es la tensión arterial. Los valores de tensión arterial sistólica fueron de 156.9 ±13 mm Hg en los pacientes *vs.* 111.4 ±9.4 en los controles (p=0.0001). Mientras que para la tensión arterial diastólica los valores fueron 102.7 ±8.9 en los pacientes *vs.* 68.07 ±6.9 mm Hg en los controles (p=0.0001) (Cuadro 2). Se puede observar que los valores de las tensiones arteriales de los pacientes fueron significativamente mayores que en los controles, no sólo al comparar la media general de cada grupo (Figura 2A y C), sino al analizar en forma personalizada cada paciente contra su control (Figura 2B y D). Esto confirma que los grupos de estudio estuvieron bien diferenciados, con base en el principal criterio clínico para el diagnóstico de preeclampsia, que es la tensión arterial.

Otro dato clínico que indica severidad en los pacientes con preeclampsia es la proteinuria, para este valor también se encontraron diferencias significativas, con un promedio de 75.9 ±50.9 en pacientes con preeclampsia *vs.* 4.44 ±10.8 en el grupo control (Cuadro 2, Figura 2E).

Cuadro 2. Datos clínicos de las pacientes

	Casos (n=27)			***Controles (n=27)***			
Característica:	***Rango***	***Media***	***DE***	***Rango***	***Media***	***DE***	***p***
Edad de las pacientes (años)	20 – 34	27.3	4.6	19 – 35	28.4	4.5	1.00
Edad gestacional (SDG)	30 – 41	36.7	3.4	30 – 41	36.7	3.4	1.00
Tensión arterial sistólica (mmHg)	130 –181	156.8	13.0	90 – 130	111.3	9.4	0.000
Tensión arterial diastólica (mmHg)	90 –120	102.7	8.9	60 – 80	68.0	6.9	0.000
Proteinuria (mg/dl)	0 – 300	75.9	50.9	0 – 30	4.4	10.8	0.000

Muestra los datos clínicos con los que ingresaron las pacientes al estudio. DE: desviación estándar. SDG: semanas de gestación, mmHg: milímetros de mercurio. (análisis estadístico con T Student para muestras relacionadas)

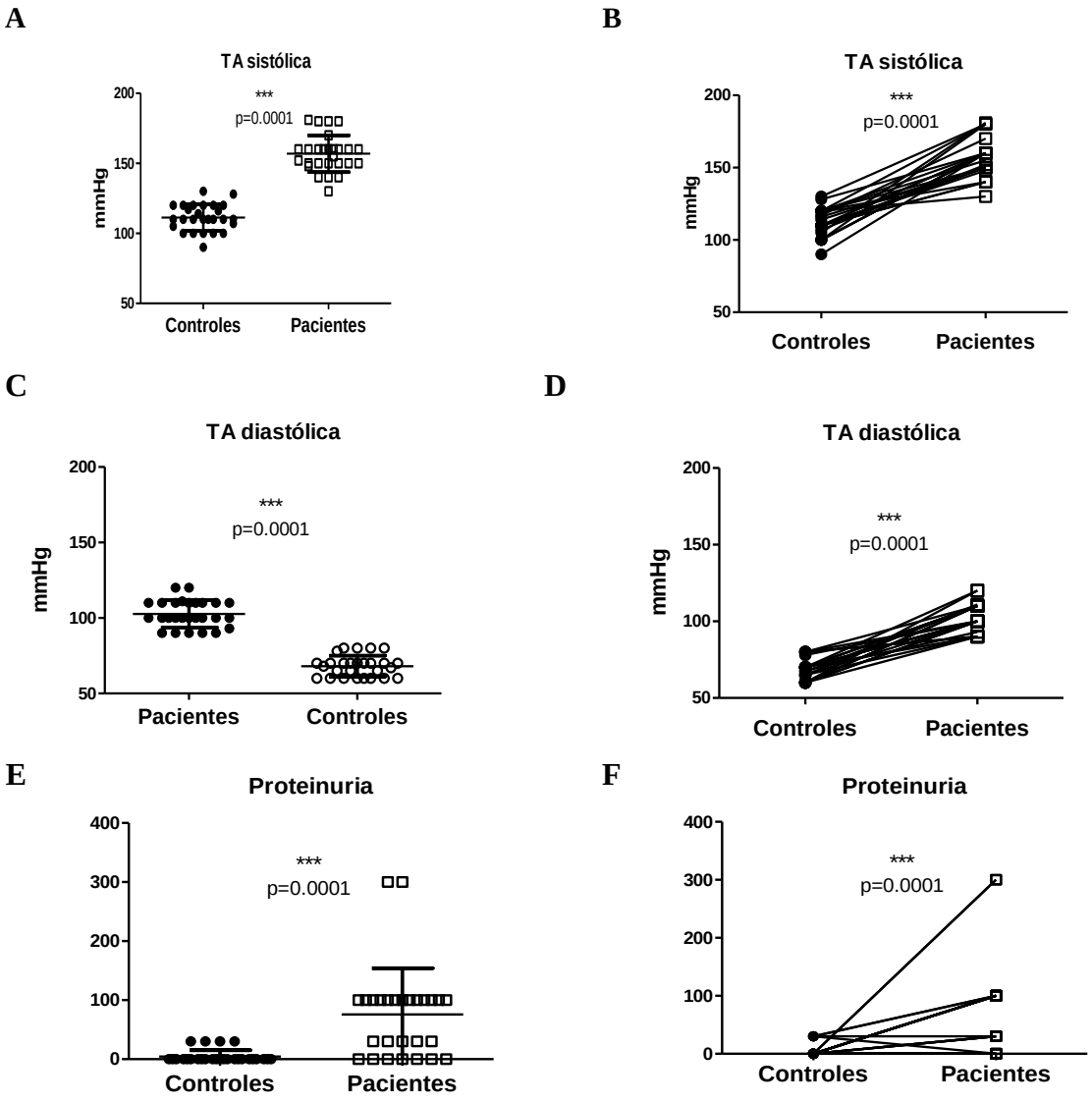


Figura 2. Análisis comparativo de la tensión arterial y proteinuria. En A, C y E se representó la dispersión de los valores de tensión arterial, la media, y la desviación estándar. En B, D y F se representó la comparación personalizada de los valores de tensión arterial y proteinuria de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Todas las pacientes del grupo problema presentaron uno o más de los criterios de severidad reportados en el lineamento técnico de la Secretaria de Salud, en el cual se realiza una asociación entre el aumento de la tensión arterial durante el embarazo con la presencia de proteinuria y plaquetopenia (cuadro 3). 25 pacientes manifestaron signos de preeclampsia severa, de éstas 7 no presentaron proteinuria, 2 pacientes presentaron valores ≥30mg, 14 pacientes ≥100mg, y 2 pacientes ≥300mg. En relación a las plaquetas la mayoría de estas pacientes presentó valores normales y sólo 5 pacientes

presentaron plaquetopenia. Dos pacientes mostraron síndrome de HELLP pues además de tensión arterial alta presentaron proteinuria ≥300mg y plaquetopenia.

Cuadro 3. ***Asociación entre estado hipertensivo del embarazo, proteinuria y plaquetopenia***						
Síndrome		***Proteinuria***			***Plaquetas***	
	n (%)	***≥30 mg n(%)***	***≥100 mg n(%)***	***≥300 mg n(%)***	***Normales n(%)***	***Disminuidas n(%)***
Preeclampsia severa	25 *(85.1)*	2 *(7.4)*	14 (51.8)	2 (8)	18 (72)	5 (20)
HELLP	2 *(8)*	0	0	2 (8)	0	2 (8)

Datos Obstétricos

El análisis de los antecedentes obstétricos de las pacientes incluidas en el estudio muestra un predominio significativo de pacientes primigestas en el grupo de casos (cuadro 4), con una media de 1.7 ±0.77; mientras que en el grupo control predominan las mujeres con más de una gestación con una media de 2.48 ±1.15 (p=0.0098). La comparación de la frecuencia de primigravidez muestra una diferencia significativa entre casos y controles con valores de 48.1% *vs.* 18.5%, respectivamente (p<0.021). También observamos como el número de gestas es menor en la mayoría de los pacientes respecto a su control pareado por edad gestacional (Figura 3B).

Cuadro 4. Datos obstétricos de las pacientes				
Número de gestaciones	***Casos***		***Controles***	
	N	***%***	***N***	***%***
1	**13**	**48.1**	5	18.5
2	9	33.3	**11**	**40.7**
3	5	18.5	6	22.2
4	0	-	3	11.1
5	0	-	2	7.4

Número de gestaciones en los casos y controles, incluyendo la actual.

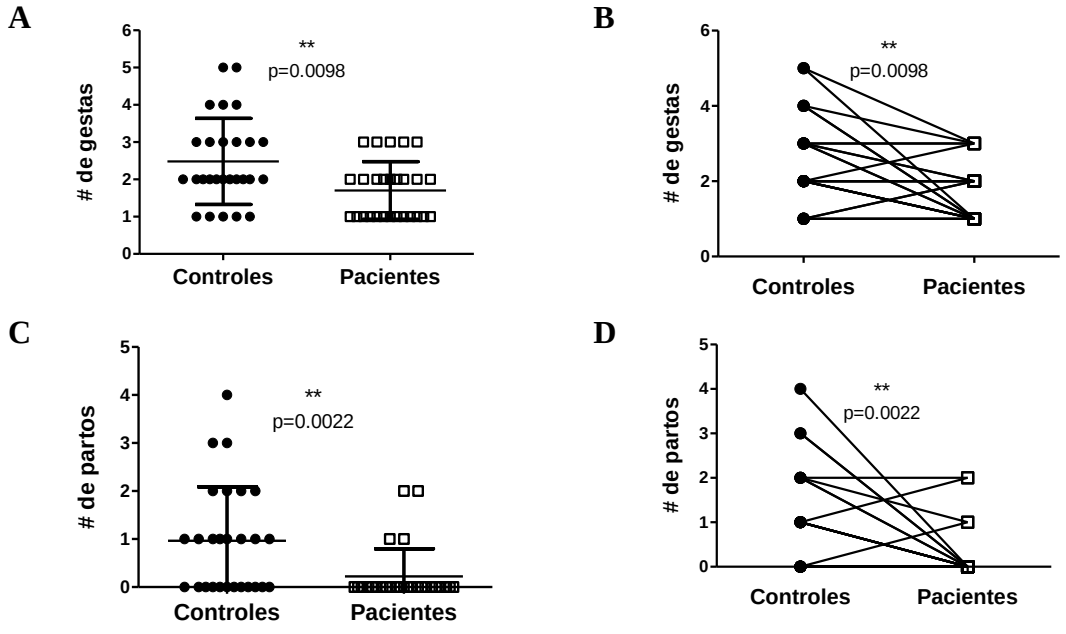


Figura 3. Análisis comparativo de datos obstétricos. En A y C se representó la dispersión de los valores: número de gestaciones y partos. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Índice de masa corporal

Uno de los factores de riesgo asociados con la presentación de preeclampsia es la obesidad, que se calcula a través del índice de masa corporal (IMC). Por lo tanto, en nuestro estudio se tomaron de los expedientes los datos del peso de las pacientes al inicio del embarazo, para calcular el IMC en ese momento. Dos mujeres del grupo de casos y cuatro del grupo control presentaron IMC >30 antes del embarazo. Al término de la gestación se determinó el peso y la ganancia de peso respecto al inicio del embarazo. En el cuadro 5 se observa que no se presentaron diferencias significativas en los pesos de las mujeres de ambos grupos. Sin embargo, si se observan diferencias significativas en la ganancia de peso, que fue mayor en el grupo con preeclampsia que en el grupo control.

Es de notar que aun cuando los grupos fueron ajustados respecto a las semanas de gestación, no se encontraron diferencias significativas en los siguientes parámetros: peso pregestacional, peso al término y el IMC, lo que garantiza que se trabajó con grupos muy similares en esos aspectos (Figura 4).

Cuadro 5. Peso e IMC de las pacientes							
Peso (Kg)	***Casos***			***Controles***			
	Rango	***Media***	***DE***	***Rango***	***Media***	***DE***	***p***
Pregestacional	46.3 – 87.0	59.2	11.2	45.0 – 83.0	60.6	9.8	0.276
IMC*	19.6 – 34.2	24.7	3.4	19.1 – 31.2	25.3	3.5	0.586
Al término	49.5 – 96.0	72.6	12.6	59.0 – 99.6	70.5	8.8	1.00
Ganancia	0 – 24	12.7	6.8	3 – 19.8	9.9	4.3	0.000

Se presenta el peso de las pacientes al inicio del embarazo (tomado del expediente) y el determinado al término del embarazo. IMC= índice de masa corporal al inicio del embarazo (Kg/m^2). Ganancia de peso durante el embarazo.

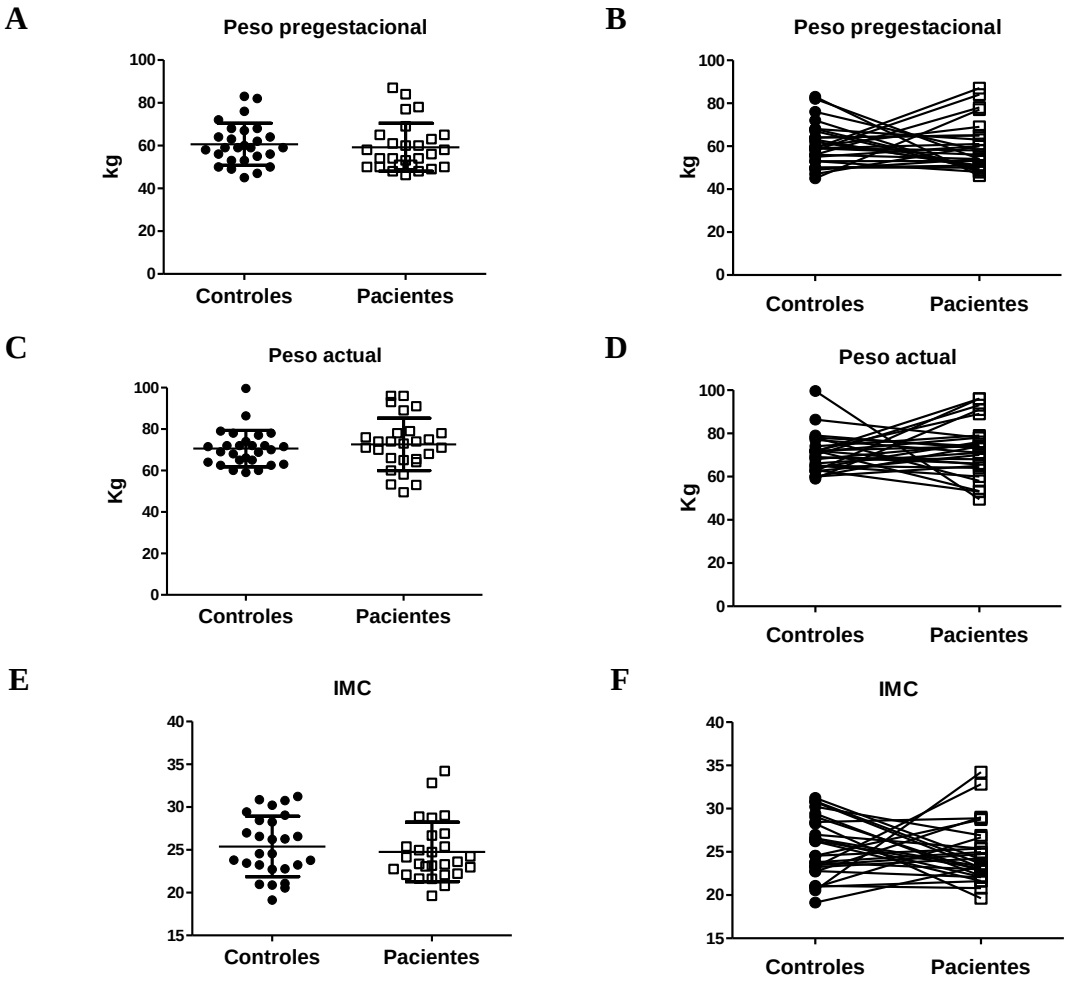


Figura 4. Análisis comparativo de pesos e IMC. En A, C y E se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B, D y F se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Datos perinatales.

La evaluación de datos perinatales de las pacientes se muestran en el cuadro 6 e incluyen el modo en que se resolvió la gestación, el peso de los recién nacidos y la edad gestacional del producto mediante la valoración de Capurro.

Respecto al modo de resolución observamos que todas las pacientes con preeclampsia fueron sometidas a cesárea, como marca la norma; no así las pacientes del grupo control.

Cuando se analizaron los pesos de los recién nacidos se observó que fueron significativamente menores en los hijos de pacientes con preeclampsia que en los hijos de las mujeres del grupo control, con una media de 2577 ±629.4 g *vs.* 2998 ±457.3 g respectivamente (Cuadro 6, Figura 5A).

También se realizó la evaluación de Capurro, que permite calcular la edad gestacional de un neonato, tomando en cuenta cinco parámetros fisiológicos. El puntaje clasifica a los neonatos en postmaduro >42 puntos, a término entre 37-41 puntos, prematuro leve 35-36 puntos, prematuro moderado 32-34 puntos, y prematuro extremo <32 puntos. Los resultados obtenidos muestran una media de 36.2 ±2.9 puntos, que correspondería a prematuro leve, para los hijos de pacientes con preeclampsia, mientras que los hijos del grupo control obtuvieron un puntaje promedio de 38.4 ±1.2 puntos, que correspondería a recién nacidos a término (Cuadro 6, Figura 5). Es decir que las diferencias encontradas no sólo corresponden a un número de semanas menor para los recién nacidos de las pacientes con preeclampsia también los clasifican en grupos de menor desarrollo y menor edad gestacional.

Cuadro 6. Datos perinatales de las pacientes y sus productos							
Modo de parto							
Modo de resolución[1]	***Casos n (%)***			***Controles n(%)***			***p***
Partos	0 (0)			14 (51.8)			**0.000**
Cesárea	27 (100)			13 (48.1)			
Peso del recién nacido							
	Casos			***Controles***			
	Min - Max	***Promedio***	***DE***	***Min - Max***	***Promedio***	***DE***	***P***
Peso RN[2] (Kg)	1200 – 3575	2577	629.4	2240 – 4050	2998.3	457.2	0.007
Edad gestacional de los recién nacidos							
Capurro (semanas)	30 – 41	36.2	2.9	36 – 40	38.4	1.2	

1, Resolución del parto en estudio. 2, Peso del recién nacido

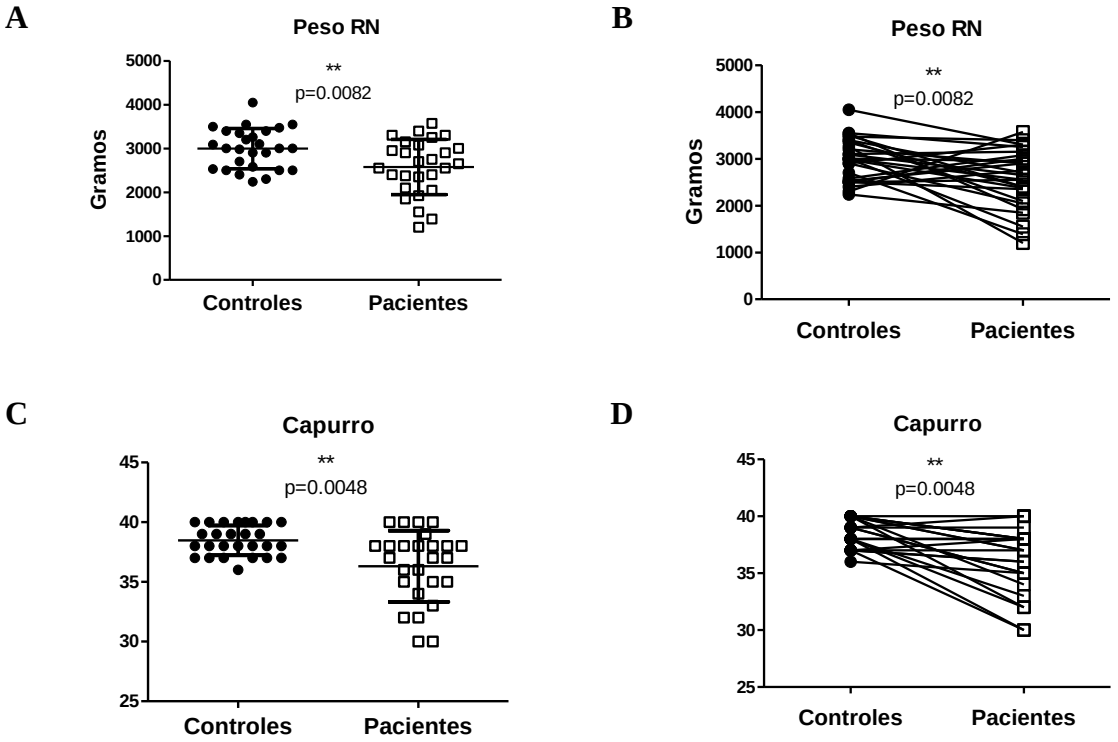


Figura 5. Análisis comparativo de datos perinatales. En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

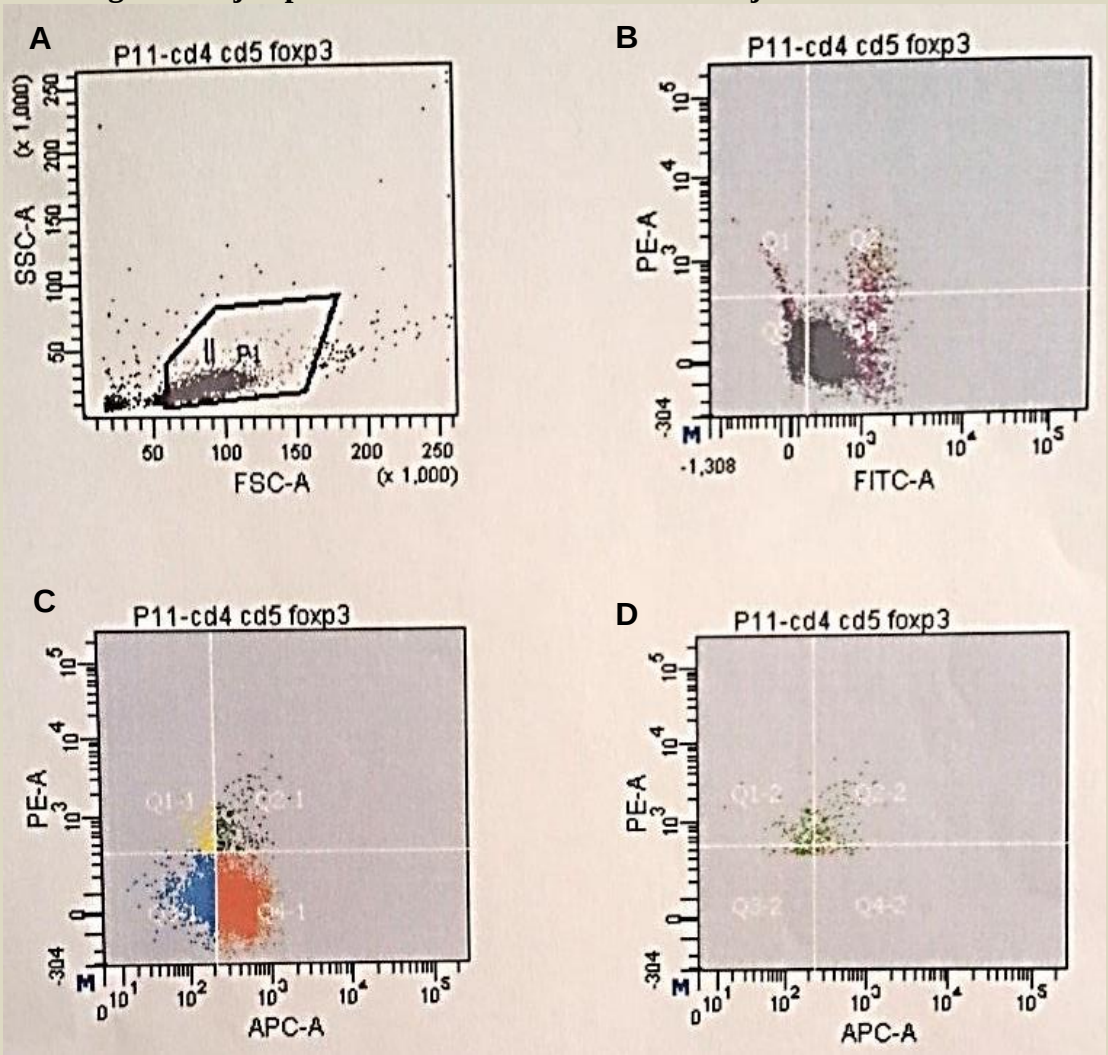
Resultados de citometría

Las muestras de sangre periférica se procesaron para separar las células mononucleares, que se marcaron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficie CD3, CD4, CD25 y los factores de transcripción ROR-γ y Foxp3 que permiten definir el fenotipo celular. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo y se determinó la proporción de cada población celular respecto al total de células mononucleares (CMN) y respecto a la población de linfocitos T.

A continuación se muestra un ejemplo del análisis de citometría de flujo. En la figura 6A se observa una gráfica de puntos con el valor FSC que indica tamaño de las células en el eje X, y el valor SSC que indica complejidad de las células en el eje Y. La zona seleccionada dentro de la gráfica indica la población total de CMN. En la figura 6B se observa una gráfica dividida en cuadrantes en la que se identifican subpoblaciones celulares con fluorescencia positiva al marcador fluorescente PE (superior izquierdo, Q1), positiva al marcador fluorescente FITC (cuadrante inferior derecho, Q4), positiva a ambos marcadores (superior derecho, Q2) y negativa a ambos marcadores (inferior izquierdo, Q3). Los resultados varían en cada ensayo dependiendo de la molécula que se esté buscando, en este ejemplo observamos en el cuadrante Q4 la subpoblación de células CD4+. En los cuadrantes Q2-1 y Q4-1 (superior e inferior derechos) de la figura 6C se observan todas las CMN que expresan Foxp3, positivas y negativas a CD25

(superior e inferior, respectivamente). Finalmente, en el cuadrante Q2-2 (superior derecho) de la figura 6D se observa una subpoblación de linfocitos T CD3+CD4+ que son a la vez positivas a los marcadores CD25 y Foxp3, que corresponden a linfocitos Treg. Las proporciones de cada subpoblación celular se representan en la Figura 6E.

Figura 6. Ejemplo de análisis de citometría de flujo.



E

Tube: cd4 cd5 foxp3

Population	%Parent	%Total
All Events	####	100.0
P1	77.1	77.1
Q1	0.6	0.5
Q2	2.4	1.9
Q3	31.7	24.5
Q4	65.2	50.2
Q1-1	1.2	1.0
Q2-1	2.1	1.6
Q3-1	15.9	12.3
Q4-1	80.8	62.3
Q1-2	0.8	0.6
Q2-2	1.2	0.9
Q3-2	20.8	16.0
Q4-2	77.2	59.5

CD4+ → Q4

CD25+Foxp3+ → Q2-1

CD4+CD25+Foxp3+ → Q2-2

Células CD4$^+$

Las células CD4$^+$ encontradas en la población total de CMN fueron más abundantes en los controles respecto a los pacientes con preeclampsia, con una media de 30.13 ±20.06 % y 5.41 ±4.2 %, respectivamente (p=0.0006) (Figura 7A). En el análisis personalizado se observa que todas las pacientes con preeclampsia tienen un porcentaje de CMN CD4+ menor respecto a su control (Figura 7B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se calculó el porcentaje de células CD4+ dentro de la población de linfocitos T CD3+, con una media de 30.13 ±20.06 % en las pacientes y 27.9 ± 13.22 % en los controles (Figura 7C). Esto sugiere que la reducción observada en la expresión de CD4 ocurre en células diferentes a linfocitos.

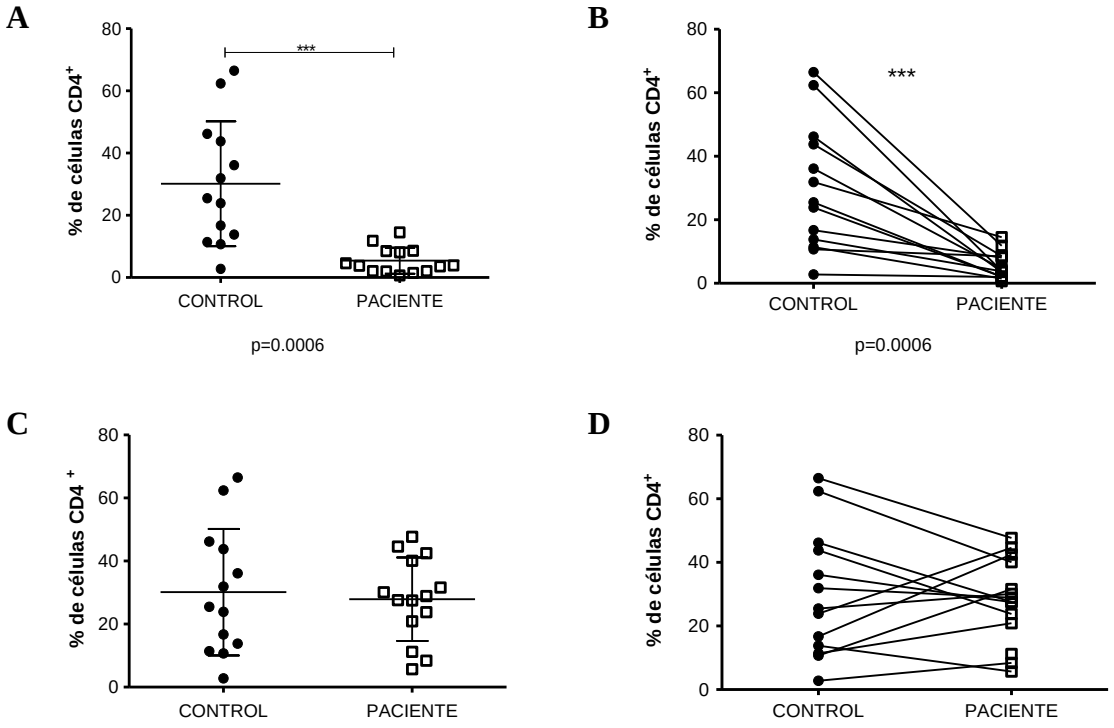


Figura 7. Expresión de CD4. Proporción de células CD4+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Células CD25$^+$

Otra molécula evaluada fue CD25 que se expresa más en aquellas células que han sido activadas. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de células CD25+ entre pacientes y controles, con una media alrededor de 1.85% en la población de CMN totales (Figura 8A) y de 8.6% en linfocitos (Figura 8C). Tampoco se observaron diferencias significativas al hacer la comparación personalizada de CD25 entre pacientes y controles (Figura 8B y D).

.

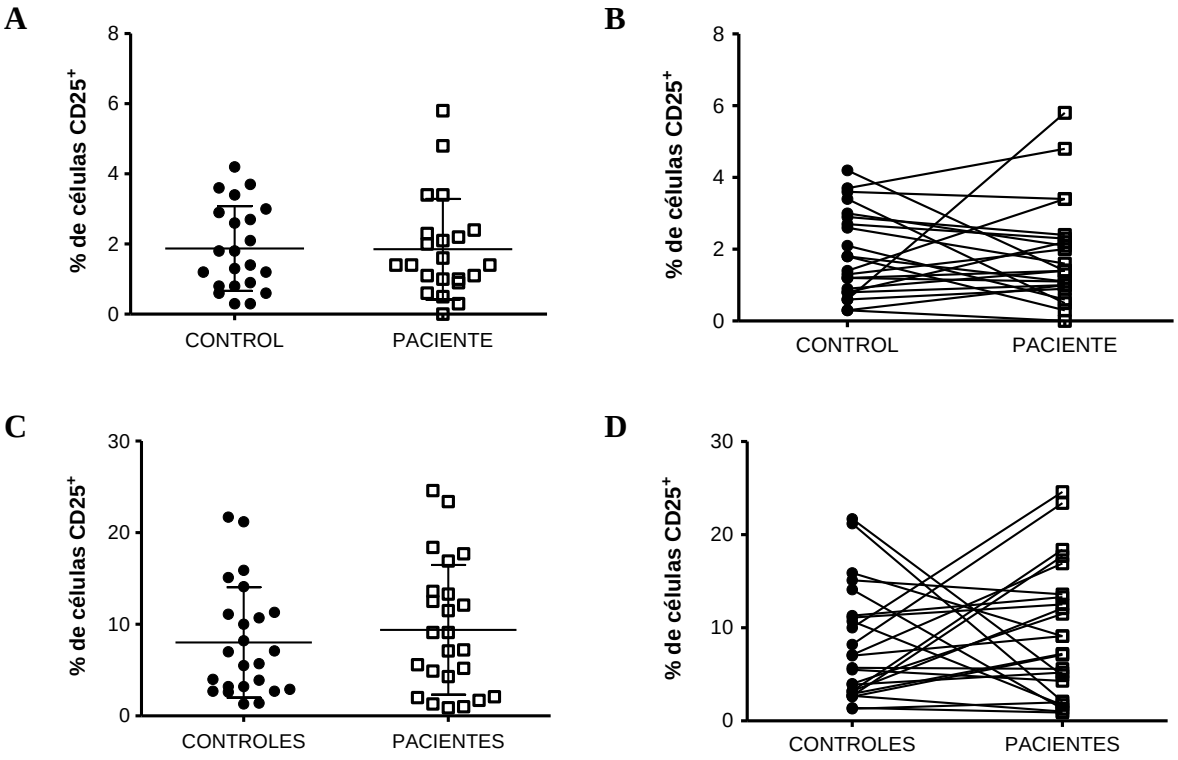


Figura 8. Expresión de CD25. Proporción de células CD25+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Células ROR-γ$^+$

La molécula ROR-γ fue analizada porque es un marcador fenotípico de linfocitos TH17. Sin embargo, en este primer análisis la presencia de esta molécula puede estar asociada tanto a linfocitos como a monocitos y macrófagos. Los resultados obtenidos muestran una diferencia en la expresión de este factor de transcripción en las CMN entre las pacientes con preeclampsia y sus controles. El grupo de mujeres control muestra una

media de 19.24 ±9.21%, mientras que las mujeres con preeclampsia muestran una media de 14.38 ±9.62%, con una p=0.048 (Figura 9A). En la comparación personalizada se puede observar que en la mayoría de las pacientes la expresión de ROR-γ es menor que en los controles (Figura 9B). Sin embargo, estas diferencias de expresión no son significativas estadísticamente en la población de linfocitos, en los cuales la media varía alrededor de 60% en ambos grupos (Figura 9C y D). Esto último sugiere que los cambios observados son en otras células y no exclusivamente en linfocitos.

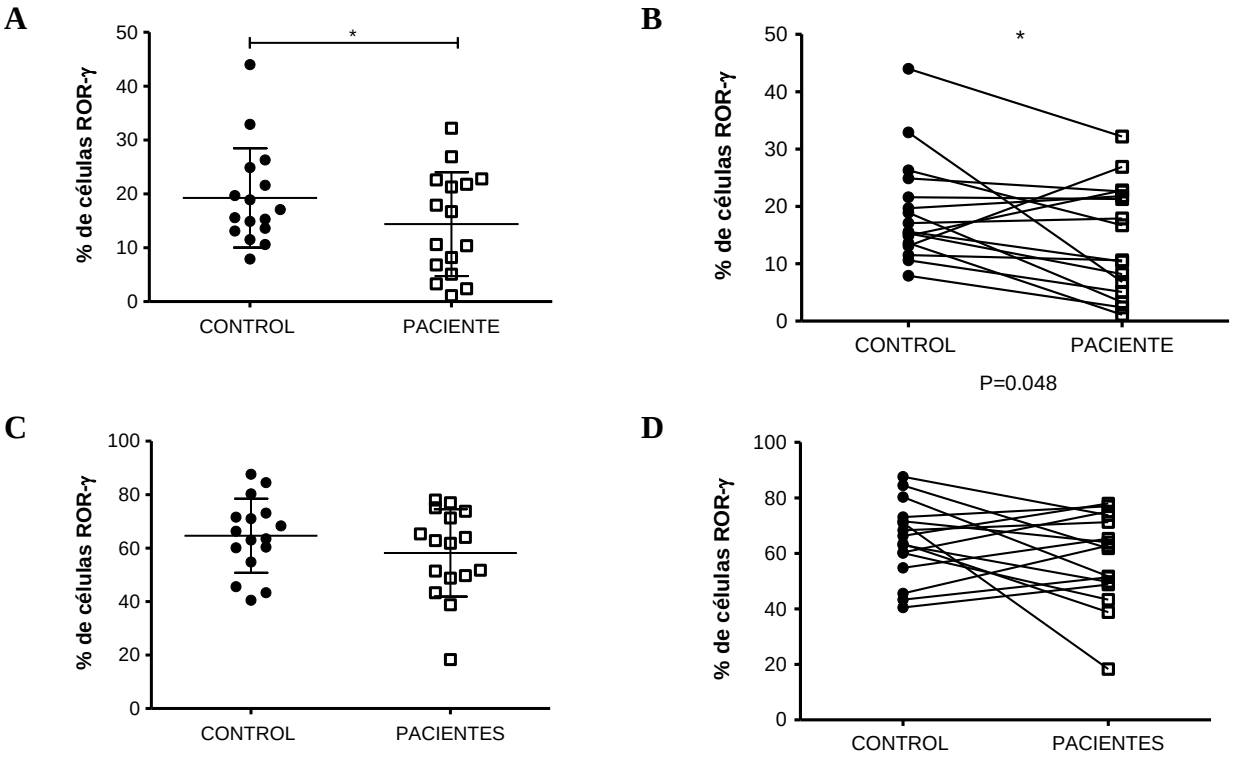


Figura 9. Expresión del factor de transcripción ROR-γ⁺. Proporción de células ROR-γ+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Células FoxP3⁺

El factor de transcripción FoxP3 es de gran importancia para las células reguladoras, pero también se puede expresar en otras células además de linfocitos, principalmente macrófagos. La expresión de Foxp3 en la población total de CMN así como en la población de linfocitos no tuvo diferencias significativas entre las pacientes y los controles, con una media de 0.85% en CMN (Figura 10A) y 3.5 % en linfocitos (Figura

10C). Tampoco se observan diferencias en expresión al realizar el análisis comparativo personalizado (Figura 10B y D).

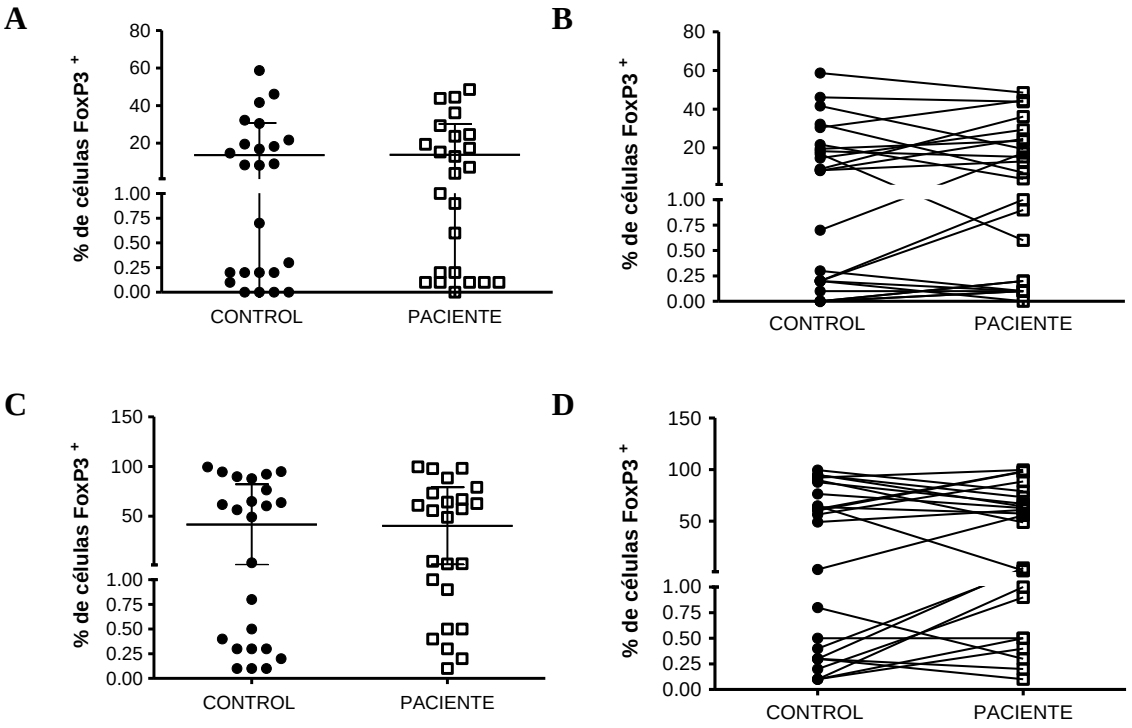


Figura 10. Expresión del factor de transcripción Foxp3. Proporción de células Foxp3+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Células $CD4^+CD25^+$

La búsqueda conjunta de las moléculas CD4 y CD25 se realiza para identificar aquella población de células CD4 positivas activas, es decir capaces de producir citocinas. En este estudio no se observaron diferencias en esta población celular entre las pacientes con preeclampsia y sus respectivos controles, con una media de 0.85 % en la población total de CMN y de 3.5 % en la población de linfocitos (Figura 11A y C). Tampoco se muestra ninguna tendencia en la expresión entre pacientes y controles en ambas poblaciones celulares (Figura 11B y D).

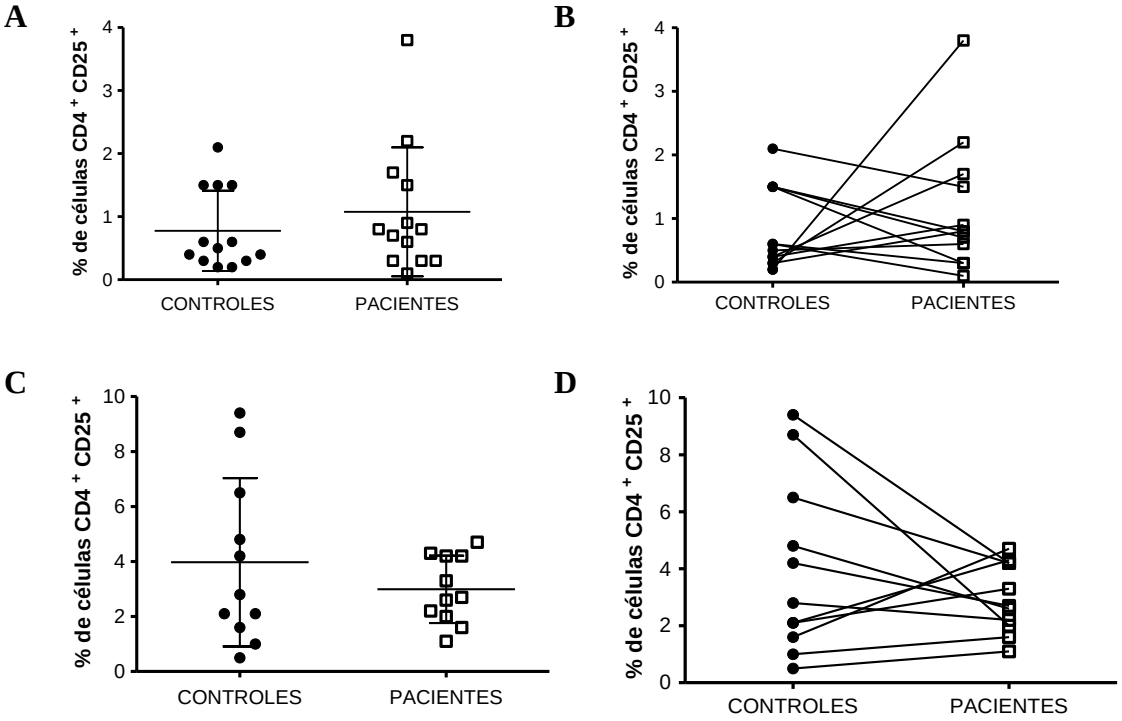


Figura 11. Células CD4⁺CD25⁺. Proporción de células CD4+CD25+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Células CD25⁺ROR-γ ⁺

La expresión de CD25 y ROR-γ indica la presencia de células activas productoras de IL-17, principalmente linfocitos Th17 activos. No se encontró diferencia significativa entre controles y pacientes en la expresión de estos marcadores en CMN (Figura 12A) ni en linfocitos (Figura 12C).

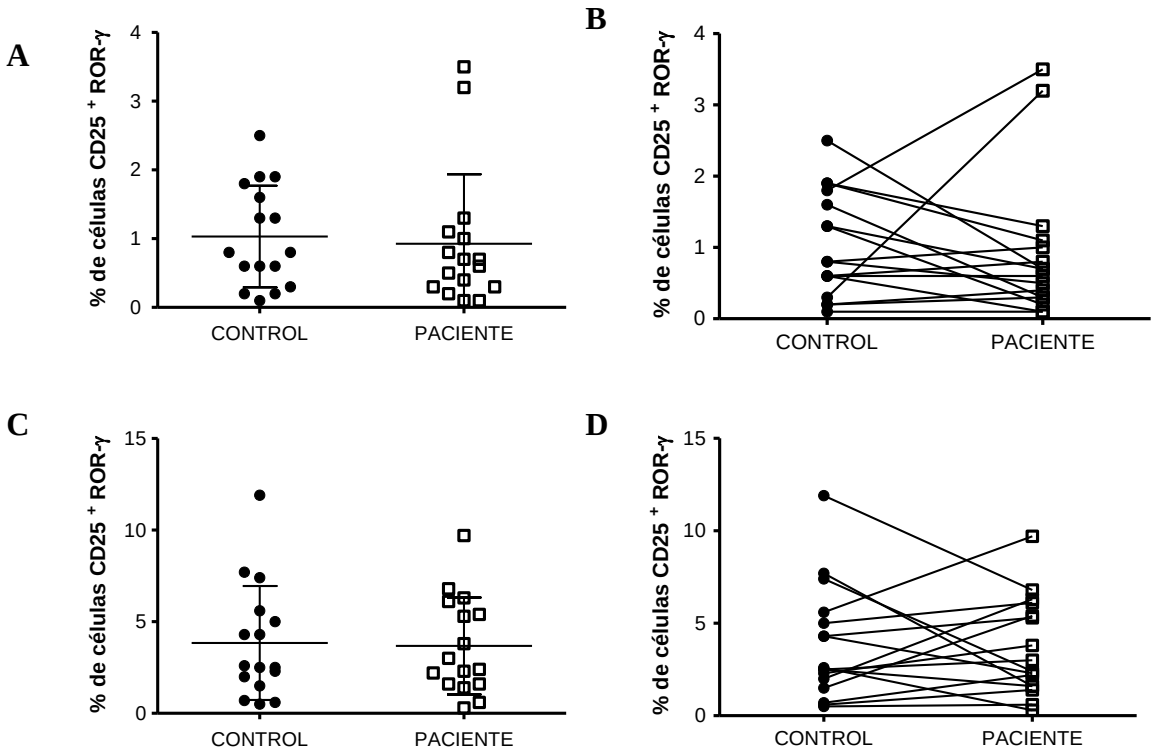


Figura 12. Células CD25⁺ROR-γ⁺. Proporción de células CD25+ROR-γ+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Células CD25⁺FoxP3⁺

Los marcadores CD25 y FoxP3 indican la presencia de subpoblaciones celulares activas y productoras de IL-10. Esta población fue significativamente mayor en las CMN de las mujeres del grupo control respecto a las mujeres con preeclampsia; con medias de 16.39% y 2.39%, respectivamente (p=0.0127) (Figura 13A). En la población de linfocitos también se encontró una diferencia significativa de mayor expresión en los controles que en las pacientes con una media de 41.58% y 4%, respectivamente (Figura 13C). En el análisis personalizado se confirma que la mayoría de las pacientes con preeclampsia presentan menor proporción de células CD25⁺FoxP3⁺ respecto a sus respectivos controles (Figura 13B y D).

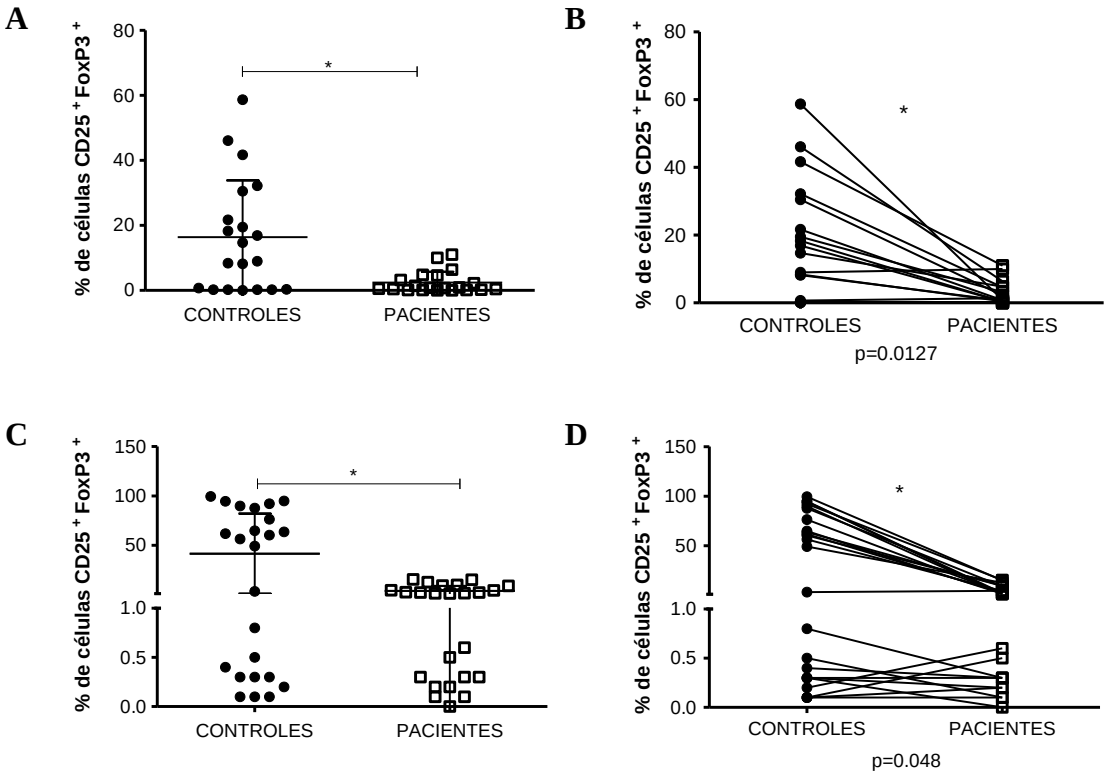


Figura 13. Células CD25⁺FOXP3⁺ Proporción de células CD25+Foxp3+ respecto al total de CMN (A y B) y en relación al total de linfocitos T (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Linfocitos Th17 $CD4^+CD25^+ROR\text{-}\gamma^+$

Para asegurar una correcta identificación de las subpoblaciones de linfocitos Th17 (ROR-γ+) y Treg (Foxp3+) su análisis se realiza junto con otros marcadores: CD3 que identifica a todos los linfocitos T, CD4 que identifica a los linfocitos "cooperadores" y CD25 que identifica a los linfocitos activos.

Respecto, a los linfocitos Th17 ($CD4^+CD25^+ROR\text{-}\gamma^+$) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes y los controles, con una media para ambos grupos de alrededor de 9.75% (Figura 14A). En el análisis comparativo personalizado parece haber dos tendencias: un grupo en los que es mayor la expresión en pacientes que en controles; y otro donde es menor respecto a sus controles (Figura 14B).

Linfocitos Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

Los linfocitos T reguladores por definición deben expresar de manera simultánea las moléculas $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. En este caso se encontró un mayor número de estas células en las pacientes con preeclampsia respecto a sus controles con una media de 53.46 ±43.05% en las pacientes y 3.6 ± 4.07 % en las mujeres control, con una p=0.0006 (Figura 14C y D). Al realizar el análisis comparativo personalizado se observan dos comportamientos bien definidos en el grupo de pacientes uno de alta expresión con una media de alrededor de 80% de expresión y otro grupo de baja expresión de alrededor del 3% de expresión. Esto podría deberse a las características de las pacientes, por lo que se realizaron análisis de correlación con las características clínicas (Cuadro 7).

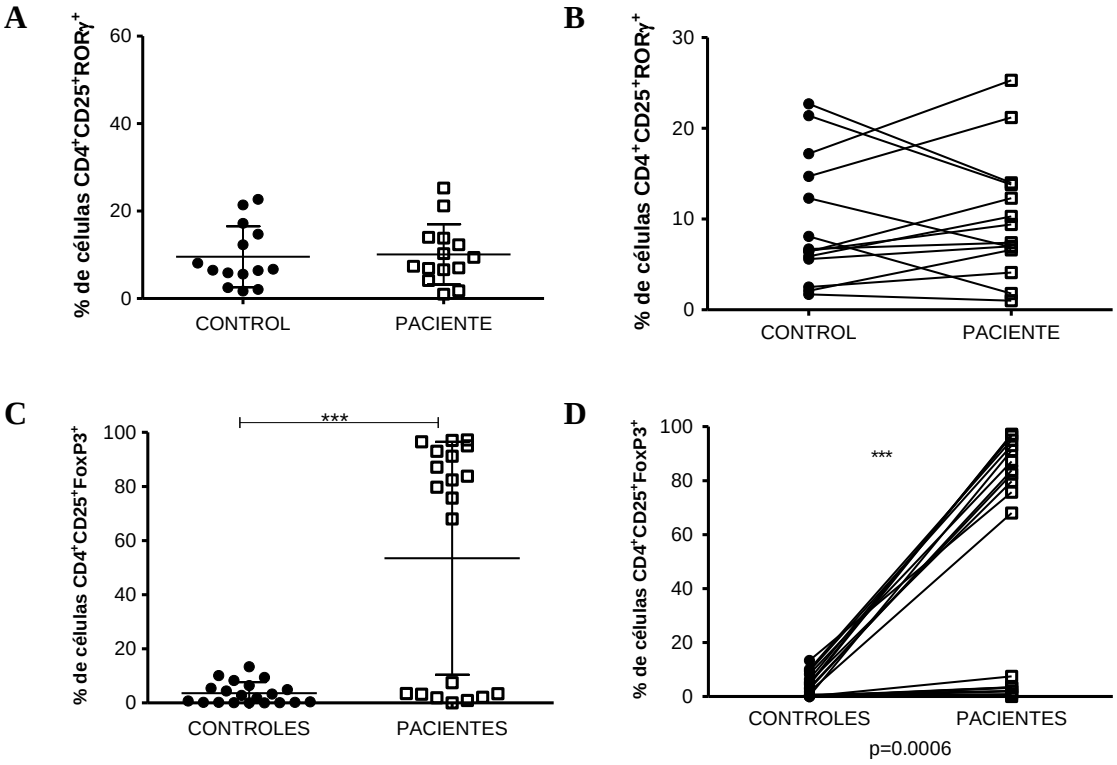


Figura 14. Células Th17 y Treg. Las células Th17 tienen fenotipo **$CD4^+CD25^+ROR\text{-}\gamma^+$** (A y B); mientras que las células Treg tienen fenotipo **$CD4^+CD25^+FOXP3^+$.** (C y D). En A y C se representó la dispersión de los valores, la media y la desviación estándar. En B y D se representó la comparación personalizada de los valores de cada paciente con preeclampsia con relación a su control.

Correlaciones entre células y signos clínicos

Se realizaron análisis de correlación entre los signos clínicos (TA diastólica, TA sistólica, proteinuria, y las relacionadas al recién nacido) con la expresión de moléculas y la proporción de células determinadas tanto en la población total de CMN y en linfocitos.

Se encontraron varias correlaciones importantes que se presentan en la tabla 1, únicamente cuando el coeficiente de correlación *r* (Spearman o Pearson) fue > 0.5 y con un valor de *p* significativo. Dentro de éstas destacan las asociadas a las células que expresan el factor de transcripción ROR-γ^+, que muestran una correlación significativa con la TA diastólica tanto en CMN como en linfocitos (r = 0.5191 y 0.5789, respectivamente). De la misma manera las células CD4 y CD25 que expresan ROR-γ están fuertemente asociados con la talla y el peso del recién nacido. La correlación observada es negativa, lo que indicaría que a mayor número de células expresando este factor de transcripción menor talla y peso del recién nacido, como se observa en el cuadro 7.

Mientras que para las células que expresan el factor de transcripción FoxP3 en combinación con CD4 y CD25 tienen una correlación directa elevada con el signo clínico de proteinuria, es decir que a mayor proporción de células CD4+CD25+Foxp3+ mayor será el valor de proteinuria. De la misma manera las células CD4+CD25+FoxP3+ presentaron una correlación importante con el número de plaquetas en las pacientes con preeclampsia. Lo anterior, sugiere que estas células pueden ser utilizadas como marcador complementario de severidad de la enfermedad junto con la TA diastólica y proteinuria alta. Por otro lado, las mujeres embarazadas que expresan altos niveles de células CD25+ROR-γ+ o CD4+CD25+ROR-γ+ podrían tener recién nacidos de peso y talla bajos.

Además de las correlaciones anteriores, se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de células CD4+CD25+FoxP3+ y las CD4+CD25+ROR-γ+ tanto en la población total de CMN como en linfocitos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Correlaciones de poblaciones celulares y datos de pacientes

	Spearman/ Pearson* *r*	Valor *p*
% Linfocitos CD4 vs semanas de gestación	0.5803*	0.0296
% CMN CD25 vs Talla recién nacido	-0.5130	0.0104
% Linfocitos ROR-γ vs PA diastólica	0.5789*	0.0188
% CMN ROR-γ vs PA diastólica	0.5191*	0.0394
% Linfocitos $CD25^+$ROR-γ vs talla RN	-0.6073	0.0126
% CMN $CD25^+$ROR-γ vs talla RN	-0.7145	0.0019
% CMN $CD25^+$ROR γ vs talla RN	-0.6124	0.019
% CMN $CD25^+$ROR γ vs Peso RN	-0.4982	0.0496
% CMN $CD4^+CD25^+$ROR γ vs Talla RN	-0.6124	0.0199
% Linfocitos FoxP3 vs proteinuria	0.5439	0.0073
% Linfocitos $CD25^+$FoxP3 vs Proteinuria	0.6625	0.0006
% CMN $CD25^+FoxP3^+$ vs Proteinuria	0.4630	0.0261
% $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ total vs proteinuria	0.6306	0.0029
% Linfocitos $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ vs plaquetas	0.5003	0.0209
% Linfocitos $CD4^+CD25^+$ $FoxP3^+$ vs % $CD4^+CD25^+$ROR-γ^+	-0.5824	0.0289
% $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ total vs % $CD4^+CD25^+$ROR-γ^+ total	0.6758	0.0080

DISCUSION

Toda investigación en preeclampsia es invaluable, ya que en nuestro país esta patología ocupa el segundo lugar como causa de mortalidad materna prevenible. Además de tener implicaciones sociales, económicas y médicas graves para las instituciones de salud. De acuerdo con un reporte de la *Dirección General de Epidemiología*, la preeclampsia contribuyó con el 20.7% del total de muertes en la tercera semana del mes de noviembre de 2015.

Hasta donde sabemos, éste es uno de los primeros estudios que abordan los aspectos inmunológicos de la preeclampsia en nuestro país.

Nuestros resultados apoyan los resultados de otras investigaciones que han identificado cambios en el sistema inmune como la causa de la preeclampsia, al ocasionar una mala adaptación a la tolerancia materna. Distintas revisiones como la de Laresgoiti-Servitje y col. (2010) afirman que las células del sistema inmune y moléculas reguladoras están implicadas en el origen de la preeclampsia.

En nuestro estudio se evaluaron diferentes poblaciones celulares de las pacientes con preeclampsia y fueron comparadas contra los controles respectivos. El porcentaje de CMN $CD4^+$ fue mayor en las mujeres del grupo control que en los casos de preeclampsia. La molécula **CD4**, es un marcador de superficie que se expresa en células capaces de producir citocinas como IL-10, IL-17. Esto es importante porque la preeclampsia ha sido caracterizada como un estado de respuesta materna inflamatoria excesiva, con un predominio de citocinas Th1 *(Santner-Nanan et al 2009, Toldi-Rigó, 2011).* Sin embargo, la proporción de linfocitos CD4+ no mostró diferencias significativas, en la mayoría de las pacientes con preeclampsia respecto a sus controles.

La población celular que contiene ROR-γ es de gran importancia debido a que nos indica todas aquellas células capaces de producir IL-17, y que podría condicionar la gravedad de la preeclampsia *(Molvarec et al 2015 Darmochwal-Oleszcuk 2014, Santner-Nanan et al 2009, Toldi et al, 2011; Toldi et al 2012).* La producción de citocina interleucina 17 está regulada por el factor de transcripción factor ROR-γ. (*Yang et al 2007)* La molécula ROR-γ es un factor de transcripción presente tanto en linfocitos, como en monocitos y macrófagos *(Reyna-Villasmil et al, 2012; Ye et al 2014; Wu et al 2013).* Por esta razón fue evaluado en la población total de CMN. La menor expresión de ROR-γ en CMN, pero no en linfocitos, de pacientes con

preeclampsia respecto a los controles, podría indicar que los macrófagos y otras células podrían estar involucradas en el desarrollo de preeclampsia.

Las CMN y linfocitos doble positivas para CD25 y el factor de transcripción ROR-γ indican células que han sido activadas y al mismo tiempo están produciendo IL-17 *(Reyna-Villasmil et al 2012).*

La expresión de $CD25^{+}FoxP3^{+}$ indica aquellas poblaciones celulares Treg que están activas y son productoras de IL-10. Al parecer estas células participan en el control de la repuesta inmune durante en el embarazo y contribuyen a la formación de las venas espirales que nutrirán al feto. Por el contrario, la baja expresión de Foxp3 contribuye a la inflamación sistémica exagerada en preeclampsia *(Toldi et al 2015).* De la misma manera las células CD4 y CD25 que expresan Foxp3, están asociadas negativamente con condiciones del recién nacido como son la talla y el peso; lo que indicaría que a mayor número de células $CD25^{+}FoxP3^{+}$ menor talla y peso del recién nacido.

Las células que expresan el factor de transcripción FoxP3 en combinación con CD4 y CD25 tienen alta correlación con el signo clínico de proteinuria, observándose mayores niveles de proteinuria conforme fue mayor el porcentaje de células observadas. De la misma manera las células CD4+CD25+FoxP3 mostraron una correlación significativa con un bajo número de plaquetas en las pacientes con preeclampsia. Lo que sugiere que el factor de transcripción FoxP3, es un indicador de severidad de la enfermedad (TA diastólica y proteinuria alta); mientras que aquellas pacientes que expresan altos niveles de células CD25ROR o CD4CD25ROR podrían tener recién nacidos de bajo peso y talla.

Además de las correlaciones anteriores, se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de células CD4CD25FoxP3 y las CD4CD25ROR-γ tanto en la población total de CMN como en la población de linfocitos.

El factor de transcripción FoxP3 es de gran importancia para las células reguladoras, al igual que el factor de transcripción ROR-γ; este puede expresarse en otras células además de linfocitos, principalmente macrófagos. La expresión de este factor de transcripción condiciona la producción de IL-10 en estas células; además esta célula es ampliamente conocida por su efecto regulador, por lo que es de gran importancia en la enfermedad.

Las poblaciones celulares T reguladoras y Th17 tienen gran importancia en la preeclampsia debido a las citocinas producidas por estas poblaciones, IL-10 e IL-17 *(Reyna-Villasmil et al 2011, Reyna- Villasmil et al 2012)* respectivamente, las cuales logran regular la condición de severidad de las pacientes embarazadas.

Los hallazgos de este estudio son diferentes a los del estudio realizado por *Steinborn et al. (2008), q*uienes encontraron una disminución significativa en el porcentaje de células T_{reg} en mujeres con preeclampsia.

Nuestros resultados difieren también de los resultados de *Hu et al., (2008)* quienes encontraron que la proporción de células T_{reg} no son significativamente diferentes entre mujeres no embarazadas, embarazadas normotensas y pacientes con preeclampsia encontrando una significancia estadística $p>0.05$. A diferencia de nuestro estudio donde si encontramos resultados con significancia estadística a favor de un mayor número de células T_{reg} en las pacientes con preeclampsia.

La edad materna en nuestro grupo de estudio es similar a la edad del grupo de estudio de la Dra. *Darmochwal-Kolarz en 2012*, esta similitud se puede deber a los criterios de inclusión, pero también nos muestra que los resultados se aplican en grupos etáreos muy comunes en todos los hospitales. También encontramos similitud con ese estudio en lo relativo a las presiones diastólicas y sistólicas, así como también al peso de los recién nacidos, tanto para las pacientes como para las controles. Sn embargo, se aprecia una diferencia entre el grupo de casos de la Dra. *Darmochwal-Kolarz (2012)* y nuestro trabajo, consistente en que la edad gestacional de ingreso a aquel fue dos semanas menor al nuestro, y dos semanas pueden establecer diferencias clínicas para el binomio materno-fetal.

Aunque no fue un objetivo de este estudio, también se encontraron diferencias entre los resultados perinatales, observando resultados más favorables en el grupo de pacientes sanas, en lo que se refiere al peso y la edad gestacional de los recién nacidos.

Los análisis de correlación (r de Spearman o Pearson) entre las diferentes células y los signos clínicos mostraron hallazgos importantes. Dentro de éstas las que destacan son aquellas asociadas a las células que expresan el factor de transcripción ROR-γ^+, que muestran una relación significativa con la TA diastólica tanto en CMN como en linfocitos.

Muchos autores coinciden en que hay una incapacidad materna para aceptar inmunológicamente a la placenta que promueve un proceso inflamatorio que resulta en preeclampsia. Se requieren más estudios para confirmar la fisiopatogenia y el eventual control del proceso inmunológico para evitar, de esta manera, la interrupción del embarazo antes de llegar a término.

No se observaron diferencias significativas en la proporción de linfocitos Th17 entre ambos grupos. Es probable que esto se deba a que la mayoría de las mujeres se

encontraban en el tercer semestre y sus embarazos eran mayores de 30 semanas. Este periodo se ha definido como predominantemente inflamatorio, por lo que no es raro encontrar elevados los niveles de TH17. Por lo que vale la pena realizar un estudio de cohortes que incluya mediciones en las diferentes etapas de la gestación, en el primero segundo y tercer trimestre de embarazos normoevolutivos y con preeclampsia para conocer la evolución de la respuesta inflamatoria y las fluctuaciones de las células TH17.

La diferencia encontrada en los linfocitos T_{reg} apoya la teoría de la disrupción inmunológica involucrada en la génesis de la preeclampsia ya que estas células son una población especializada de linfocitos T conocidos por sus propiedades como supresores potentes de la respuestas inmunes inflamatorias y su capacidad para mediar la homeostasis inmune como propiedades únicas, particularmente su capacidad de suprimir las células T y NK activas, como parte integral de la tolerancia inmune durante el embarazo. Estas células se caracterizan por la expresión en su superficie de CD4, CD25 y el factor de transcripción intracelular Foxp3. La probable explicación para las diferencias encontradas en los linfocitos T_{reg}, que muestran mayor cantidad en los embarazos con preeclampsia, es que el estado preclínico prolongado que tiene la patología induce una intensa respuesta del sistema inmune. Por lo que se necesita un estudio de cohorte para conocer las proporciones de linfocitos Treg en todos los estadios del embarazo tanto de pacientes sanas como de pacientes que desarrollarán preeclampsia antes de la aparición de los signos clínicos.

Actualmente hay un consenso en que los linfocitos T reguladores (T_{reg}) son los conductores de la orquesta inmunológica en la interfase materno-fetal, en la cual las células asesinas naturales (NK) representan 70% del repertorio inmunológico y los linfocitos el 10%. El papel de las células NK en la implantación y la angiogénesis trofoblástica es fundamental e indispensable, pero se no resolvieron el problema de la memoria inmunológica en los embarazos sucesivos. Al respecto, es bien conocido el efecto protector del embarazo anterior con el mismo padre. La teoría refiere que esta memoria es impulsada por las células T reguladoras *(Robillarda P, Dekkerb G, Chaouat G. 2014).* Por lo que orientar esta investigación en trabajos de índole longitudinal, cohortes o la búsqueda de células especializadas del sistema inmune en microambientes como la placenta o la decidua de pacientes con preeclampsia, son de las recomendaciones que ha generado este estudio. De esta manera alinearemos nuestros esfuerzos al proceso de investigación en preeclampsia de organismos internacionales

como el Colegio americano de Ginecólogos y obstetras *(ACOG, 2013)* sosteniendo la teoría inmunológica como una de las más esperanzadoras en la génesis de la preeclampsia.

CONCLUSIONES

Se observa una diferencia en los porcentajes de células Treg entre las pacientes preeclámpticas y sus pares normotensas sanas. El porcentaje de expresión de Células T reguladoras es menor en las pacientes con Preeclampsia.

Los resultados perinatales son más favorables en el grupo de pacientes sanas cuando son comparados con las pacientes con preeclampsia.

Se observa diferencia estadísticamente significativa en el peso de los recién nacidos, cuando se realiza una comparación entre hijos de pacientes sanas y enfermas

Se observa diferencia estadísticamente significativa en las semanas de gestación al nacimiento de los recién nacidos, cuando se realiza una comparación entre hijos de pacientes sanas y enfermas.

REFERENCIAS BIBLIOHEREMOGRAFICAS

A

Armenta-Martínez O, Espinosa-Villaseñor N, Arroyo Kuribreña J, Soto-Vega E. Modulación de la respuesta inmunológica durante el embarazo. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. 2011; 37 (2):277-287

Atención integral de la preeclampsia en el segundo y tercer niveles de atención: Secretaría de Salud; 2008

Arias M. Villegas J. Avances en inmunidad gestacional. Int. J. Morphol., 28(3):713-718, 2010

B

Balderas-Peña LA, Vizcaíno Magaña CV, Hernández-Higareda S, Vargas-Guillén C, Álvarez-Romo F, García-Iglesias T y cols. Poblaciones de linfocitos y preeclampsia. Ginecol Obstet Mex 2008; 76(6):327-35

Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R, The "great obstetrical syndromes" are associated with disorders of deep placentation. Am J Obstet Gynecol. 2011 March; 204(3): 193–201

D

Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz, Kolarz J et al. Activated T Lymphocytes in Pre-Eclampsia. Am J Reprod Immunol 58 (2007) 39–45

Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternikb M, Tabarkiewiczb J, Kolarzb B, Rolinskib J. et al. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. Journal of Reproductive Immunology 93 (2012) 75– 81

Darmochwał-Kolarz D1, Oleszczuk J The critical role of Th17 cells, Treg cells and co-stimulatory molecules in the development of pre-eclampsia. Dev Period Med. 2014; 18(2):141-7.

E

Ernerudh J, Berg G and Mjösberg J. Regulatory T Helper Cells in Pregnancy and their Roles in Systemic versus Local Immune Tolerance, 2011, Am J Reprod Immunol, (66), 31-43.

G

Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, HolzgreveW, and Hahn S and Lapaire O. Potential markers of preeclampsia – a review. Reprod Biol Endocrino 2009, 7:70

H

Hu D, Chen Y, Zhang W, Wang H, Wang Z et al. Alteration of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia Acta Obstetricia et Gynecologica. 2008; 87: 190- 194

Hypertension in pregnancy. (American Collegue of obstetricians and gynecologists, 2013). Task Force on Hypertension in pregnancy 2013. P 81

J

Jensen F , Wallukat G , Herse F , Budner O, El-Mousleh T et al CD19_CD5_ Cells as Indicators of Preeclampsia. Hypertension. 2012; 59:861-868.

L

Lineamiento técnico Prevención diagnóstico y Manejo de la Preeclampsia Eclampsia Secretaria de Salud. México 2007.

Laresgoiti-Servitje E, Nardhy Gómez-López N, Olson D. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. Human Reproduction Update, Vol.16, No.5 pp. 510–524, 2010

M

Mondragón-Barrios L. Consentimiento informado: una praxis dialógica para la investigación. Rev Invest Clin. 2009; 61(1): 73–82.

Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. Am J Reprod Immunol. 2010 June; 63(6): 425–433.

Morgan-Ortiz F, Calderón-Lara, SA, Martínez-Félix JI, González-Beltrán A, Quevedo-Castro E. Factores de riesgo asociados con preeclampsia: estudio de casos y controles. Ginecol Obstet Mex 2010; 78(3):153-159

Molvarec A. Czegle I, Szijártó J, Rigó J. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. J Reprod Immunology 112 (2015) 53‑57

O

OMS Centro de prensa. Mortalidad materna. Nota descriptiva núm. 348. Mayo de 2012.

R

Reyna-Villasmil E, Briceño-Pérez C, Torres-Cepeda. Inmunología, inflamación y preeclampsia Rev Obstet Ginecol Venez 2009; 69(2):97-110

Romero-Arauz JF, Morales-Borrego E, García-Espinosa M, Peralta-Pedrero ML. Guía de Práctica clínica Preeclampsia – Eclampsia. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2012; 50 (5): 569-579

S

Saito S. Immune regulationTh17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. Immunology and Cell Biology (2010) 88, 615–617

Saito S. Nakashima A, Shima T, Ito M Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. Am J Reprod Immunol. 63 (2010) 601–610

Santner-Nanan B, Peek M, Khanam R, Systemic Increase in the Ratio between Foxp3+ and IL-17-Producing CD4+ T Cells in Healthy Pregnancy but Not in Preeclampsia J Immunol 2009; 183:7023-7030

Schiffrin E. T lymphocytes: a role in hypertension? Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2010, 19:181–186.

Secretaría de Salud. Dirección General de epidemiologia. Informe semanal de vigilancia epidemiológica. Mortalidad Materna

Serrano N. Immunology and genetic of preeclampsia. Clin Dev Immunol, June–December 2006; 13(2–4): 197–201

Steinborn A, Schmitt E, Kisielewicz A, Rechenberg S, Seissler N et al, Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs. Clinical and Experimental Immunology, 2011, 167: 84–98.98

V

Vázquez-Rodríguez E, Bouchan-Valencia P, González-Jiménez MA, Paredes-Vivas LY, Calixto-González R y cols. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. Perinatol Reprod Hum 2011; 25 (1): 39-45.

Y

Yang X, Pappu1 B, Nurieva1 R, Akimzhanov A, Soon H; TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alfha and ROR gamma. Immunity. 2008 January; 28(1): 29–39.

W

Wu Q, Sun X, Chi R, Xu L, Li X, et al. (2013) RORct Modulates Macrophage Recruitment during a Hydrocarbon Oil-Induced Inflammation. PLoS ONE 8(11)

ANEXOS

ANEXO 1. DEFINICION DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDICION.

Variables principales	
Pr**eeclampsia** Definición conceptual	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 ≥140/90 mm Hg acompañada de proteinuria, es frecuente que además se presente cefalea, acúfenos, fosfenos, edema, dolor abdominal y/o alteraciones de laboratorio. NOTA: En casos de embarazo múltiple, enfermedad trofoblástica gestacional o Hidrops puede presentarse antes de las 20 semanas.
Definición operacional	Los criterios para determinar la preeclampsia leve son los siguientes: 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. Su verificación requiere por lo menos dos tomas con diferencia de seis horas entre cada una, con la paciente en reposo y en un lapso no mayor de siete días. Proteinuria ≥ 300 mg en una recolección de orina de 24 horas o ≥ 30 mg/dl en dos muestras de orina tomadas al azar, con diferencia de seis horas entre cada una, en un lapso no mayor de siete días. Sin evidencia de compromiso multisistémico o de vasoespasmo persistente. Para considerar el diagnóstico de preeclampsia severa es necesaria la presencia de uno o más de los siguientes criterios: Tensión arterial ≥ 160 o 110 mm Hg en, por lo menos, dos tomas con un mínimo de diferencia de seis horas entre cada una. Proteinuria ≥ 2 g en orina de 24 horas. Oliguria: diuresis < 500 ml en 24 horas. Creatinina sérica ≥ 1.2 mg/dl. Trastornos cerebrales severos persistentes o alteraciones visuales. Edema agudo pulmonar. Dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho del abdomen. Disfunción hepática (aspartato aminotransferasa ≥ 70 UI/L). Trombocitopenia (< 100 000 mm3). Coagulación intravascular diseminada. Cianosis. Restricción del crecimiento intrauterino debido a insuficiencia uteroplacentaria
Escala	Ordinal
Unidades de medición	Leve Severa

Niveles circulantes de linfocitos Th 17	Corresponden a células TCD4 efectoras que inducen a células epiteliales y del estroma a producir interleucinas que reclutan neutrófilos en sitios de infección al inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa. La expansión clonal y la diferenciación en células Th17 requiere de IL-6 y TGF-β. Además, la actividad efectora ulterior de células Th17 requiere de IL-23. Estas células se caracterizan por su secreción de IL-6, IL-17A, IL-17F, TNF y CXCL1.
Definición operacional	Determinación en sangre periférica de la presencia de interleucina 17
Escala	Dimensional
Unidades de medición.	Niveles séricos de interleucina.
Niveles circulantes de linfocitos T reguladores Definición conceptual	Los linfocitos T reguladores (Treg) también conocidos como linfocitos T supresores constituyen una población de linfocitos que expresan la molécula CD4+ y que juegan un rol fundamental en la regulación del sistema inmunitario y en la tolerancia ante antígenos propios. Tienen la capacidad de regular la activación y función de células T y B, y representan un 10 a 15% del total de linfocitos CD4+ en humanos.
Definición operacional	Determinación en sangre periférica de la presencia de linfocitos T reguladores
Escala	Dimensional
Unidades de medición	Porcentaje de células
Variables de ajuste	
Edad **Definición conceptual:**	Con origen en el latín *aetas*, es un vocablo que permite hacer mención al tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo
Definición operacional	Se consideran años cumplidos al momento del ingreso al estudio
Escala	Dimensional Discreta
Unidades de medición	Años cumplidos entre 15 y 35
Edad gestacional **Definición conceptual:**	Se considera al tiempo trascurrido en el vientre materno desde la concepción y se toma como referencia la fecha de última menstruación al momento del cálculo que se requiera.
Definición operacional	Semanas de gestación ajustadas por ultrasonido realizado en el primer trimestre
Escala	Dimensional discreta
Unidades de medición	De 6 a 40 semanas
Peso corporal **Definición conceptual:**	Esta noción menciona a la **cantidad de masa** que alberga el **cuerpo** de una **persona**.
Definición operacional	El gramaje obtenido en cada una de las tres veces que se mida esta característica en la paciente cuando sea citada para la toma de muestra de sangre periférica.
Escala	Dimensional continua
Unidades de medición	Gramos

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN

Y POLITICAS DE SALUD

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(ADULTOS)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	"ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE LINFOCITOS TH 17 Y T REGULADORES EN MUJERES EMBARAZADAS CON Y SIN PREECLAMPSIA"
Patrocinador externo (si aplica):	No aplica
Lugar y fecha:	Puebla, Puebla. Octubre de 2015
Número de registro:	2013 – 2102 – 60
Justificación y objetivo del estudio:	Estamos invitando a participar a pacientes en un estudio de investigación que se lleva a cabo en el servicio de ginecología y obstetricia del Hospital de General Regional No.36, de Puebla, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Al participar en este estudio usted ayudará a conocer la utilidad de la relación que guardan algunas células de su organismo con el desarrollo de una enfermedad llamada Preeclampsia la cual es muy grave y en ocasiones mortal para la mamá y su bebé. Estos datos pueden servir para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en el futuro. El estudio tiene como propósito "Comparar los niveles circulantes de linfocitos Th 17 y T reguladores en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia" por lo que pensamos usted pudiera participar en este proyecto ya que reúne las condiciones apropiadas. Al igual que usted, muchas más pacientes serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria.
Procedimientos:	Entrevista directa, consulta del expediente, exploración física

	completa de los pacientes, manejo de muestras sanguíneas, separación de glóbulos blancos, inmunofenotipificación de células Treg y Th17.
Posibles riesgos y molestias:	Ninguno. Probablemente dolor ligero a la toma de la muestra sanguínea en alguna de las venas de sus antebrazos.
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 de su embarazo. Y en un momento determinado si se llegara a diagnosticar o encontrar alguna alteración de su embarazo se le informaría en forma inmediata y se canalizaría al servicio correspondiente para su adecuado manejo
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Si pertenece a alguno de los dos grupos de pacientes que participan en este estudio el grupo de investigadores, dará seguimiento de su caso hasta la resolución de la gestación. Y estaremos pendientes de que usted reciba los tratamientos estandarizados para los problemas clinicos que presente; este tratamiento se llevará a cabo en el Hospital General Regional 36 del IMSS
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. Usted no necesita retirarse del estudio, pero si usted no desea que los resultados obtenidos de sus muestras sean utilizados, podrá solicitarlo y entonces esto no influirá en la atención futura que el Instituto Mexicano del Seguro Social 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
Privacidad y confidencialidad:	El equipo de investigadores, su médico en el servicio de ginecología del Hospital General Regional 36, del Instituto Mexicano del Seguro Social, resguardará la información. Solamente la Secretaria de Salubridad y Asistencia, su médico tratante, los investigadores y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si

lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

☐ No autoriza que se tome la muestra.

☐ ✓ Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

☐ Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	Usted recibira el tratamiento medico o quiurgico estandarizado sin excepción en el hospital General Regional 36
Beneficios al término del estudio:	Los beneficios que usted recibira al finalizar el estudio posiblememnte seran en otros embarazos que usted llegue a tener o para otras pacientes o para sus futuras generaciones, hijas, sobrinas ya que con este estudio usted cointribuye al desarrollo de alterantivas de diagnostico y tratamiento de una enfermedad potencialmemnte mortal.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable:	Dr. Julio Roberto Reyes Leyva. Centro de investigación Biomédica de Oriente, Puebla.
Colaboradores:	Dra. Irma del Carmen Zamora Ginez. Coordinación de la maestría en Ciencias Médicas e Investigación de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dra. Lilian Karen Flores Mendoza. Centro de investigación Biomédica de Oriente, Puebla. Dra. Dolores Guillermina Martínez Marín. Hospital General Regional 36. División de Ginecología y obstetricia

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque “B” de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

_____	_____
Nombre y firma del sujeto	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
_____	_____
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

Clave: 2810-009-013

ANEXO 3. DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS ACTIVIDADES A REALIZAR

ANEXO 4. CRONOGRAMA DE TRABAJO. (GRÁFICO DE GANTT)

	Agosto – octubre 2013	Noviembre – diciembre 2013	Enero 2014	Febrero – abril 2014	Mayo – julio 2014	Agosto - Octubre 2014	Nov 2014 - Enero 2015	Enero - Abril 2015	Mayo 2015	Jun 2015
Búsqueda de información bibliográfica										
Elaboración del protocolo										

de investigación										
Presentación y solicitud de autorización del protocolo										
Realización de estudio piloto y estandarización de los procedimientos										
Desarrollo de la investigación										
Presentación de avances										
Presentación de resultados										
Publicación y difusión										

ANEXO 5. INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE LA INFORMACION

Instrumento de recolección de datos del protocolo titulado.

"Estudio comparativo de los niveles circulantes de linfocitos Th 17 y T reguladores en mujeres embarazadas con y sin preeclampsia"

Instituto Mexicano del Seguro Social.

Hospital General Regional 36 IMSS Puebla

Número de Registro 2013-2102-60 Fecha.

Núm.	Nombre de la paciente		
NUMERO DE AFILIACION:			
EDAD:	GESTA:	FUM:	FPP:
FECHA:	EDAD GESTACIONAL SDG	POR USG:	

	TA	Peso corporal	Niveles circulantes de linfocitos Th17	Niveles circulantes de

				linfocitos T reguladores
Ingreso al estudio				
Resolución del embarazo				
Presento preeclampsia-eclampsia			**CRITERIOS:**	
Leve				
Severa				
Eclampsia				
Plaquetas				
Tratamientos recibidos para la hipertensión				
Observaciones				
GRUPO Y Rh	Talla		**Peso pregestacional**	**Antecedentes de importancia drogas**
Consulta preconcepcional	**Lugar de la** Consulta preconcepcional		**Número de consultas**	
Proteinuria	**Recibió esquema de inductores de madurez pulmonar**		**Cual**	**Fecha de IMP**
Recién nacido sexo	**Peso**		**talla**	**PC**
PA	**CAPURRO**		**APGAR**	**LIQUIDO AMNIOTICO**
PLACENTA	**DESTINO DEL RN**			
OBSERVACIONES	**Estado civil**		**ocupación**	
MPF	**Escolaridad**			

ANEXO 6. LINEAS DE INVESTIGACIÓN

a. Un estudio longitudinal en los que se determinen los niveles circulantes de linfocitos T reguladores y Th 17 en los tres trimestres en pacientes embarazadas sanas

ANEXO A. TOMA DE PRESIÓN ARTERIAL

La medición de la presión arterial deberá realizarse en el brazo derecho a la altura del corazón con la paciente sentada. Preferentemente se utilizará el esfigmomanómetro de mercurio. La presión arterial sistólica corresponde con el primer ruido de Korotkoff y la presión arterial diastólica con el quinto ruido de Korotkoff.

ANEXO B. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA

1) Lavado las manos y preparación del material.

2) Lleve el equipo a la unidad del paciente.

3) Identifique al paciente verbalmente o revisando la ficha clínica.

4) Explíquele el procedimiento a realizar.

5) Lávese las manos.

6) Acomode al paciente con la zona a puncionar sobre la almohadilla.

7) Revise la piel y las venas del paciente.

8) Seleccione el sitio que le merezca mayor seguridad de éxito en la técnica y de menor riesgo para el paciente.

9) Si es necesario, lave la zona con agua y jabón.

10) Al seleccionar el sitio de punción prefiera las venas del pliegue del codo por tener mejor calibre lo que permite un mejor acceso. Coloque la ligadura para facilitar esta elección, tenga la precaución de soltarla, una vez elegida la vena.

11) Colóquese los guantes, arme la jeringa

12) Coloque la ligadura 4 traveses de dedos sobre el lugar a puncionar.

13) Desinfecte un área de 5 cm de la piel del paciente, con alcohol al 70%.

14) Deje una torunda seca entre los dedos anular y meñique de su mano dominante.

15) Fije la vena fraccionando la piel que la circunda y solicite al paciente que empuñe la mano suavemente.

16) Inserte la aguja con el bisel hacia arriba, puncione la vena, dirigiendo la aguja en la misma dirección en que ésta se encuentra, (puncionado primero la piel, trate de no puncionar directamente sobre la vena, puesto que la puede atravesar e impedirle tomar la muestra) y observe el reflujo de sangre.

17) Obtenga la cantidad de sangre requerida.

18) Suelte la ligadura, pídale al paciente que suelte la mano empuñada.

19) Retire la jeringa, deje la torunda seca en el sitio de punción, pidiéndole al paciente, dentro de lo posible, que la afirme flexionando el brazo.

20) Llene con la cantidad necesaria los frascos de examen, siempre llene primero los frascos que tienen anticoagulantes, girándolos según corresponda.

21) Coloque tela adhesiva con un pequeño trozo de algodón seco o parche curita en el sitio de punción.

22) Acomode al paciente.

23) Lleve el equipo y deseche material punzante en receptáculo ad-hoc y el resto en basurero.

24) Retírese los guantes, lávese las manos.

25) Registre el procedimiento, según norma del servicio.

ANEXO C. SEPARACION DE POLIMORFONUCLEARES CON GRADIENTE DE DENSIDAD FICOLL-HYPAQUE

Materiales y reactivos materiales:

• Tubos Falcón para centrífuga de 15 mL estériles (2 tubos)

• Tubos Falcón de plástico de 50 mL estéril (1 tubo)

• Ficoll-Hypaque (4 mL)

• PBS (50 mL)

• Microipeta 1000 microlitros

• Guantes de látex o vinilo estériles

• Gradilla

• Centrífuga

PROCEDIMIENTO

1. Obtener la muestra de sangre en tubo lila o verde con medidas de bioseguridad.

2. Centrifugar la sangre a 1700 rpm y separar el suero en tubos Eppendorf, con micropipetas de 1000 microlitros.

3. Etiquetar y mantener en criopreservación a -80 grados centígrados

4. El paquete células se diluye con 1 ml de PBS.

3. Dispensar el Ficoll-Hypaque en tubo Falcón de 15 mL, la necesaria para trabajar el paquete celular a razón de 2:1 (sangre: Ficoll)

4. Cargar la sangre diluida con suero fisiológico y dispensar muy cuidadosamente y lentamente sobre el Ficoll-Hypaque en el tubo de centrifuga.

Poner el tubo inclinado y apoyar la punta de la pipeta sobre la pared del tubo para dejar deslizar la sangre suavemente sobre el Ficoll y poder formar una interfase (Ficoll abajo y sangre arriba).

5. Centrifugar a 650 gravedades durante 30 minutos, a temperatura de 4 grados centígrados.

6. Retirar cuidadosamente de la centrifuga y llevar a la gradilla. Verificar la formación de las fases de gradiente de densidad (arriba el plasma sanguíneo, debajo la banda de

células mononucleares, debajo el Ficoll-Hypaque, debajo las células polimorfonucleares y debajo los eritrocitos aglutinados).

7. Extraer toda la banda de células mononucleares utilizando micropipetas de plástico de 1000 microlitros y dispensar en tubo de centrifugación nuevo.

8. Dispensar la banda en un único tubo de centrifugación y luego completar hasta 5 ml con PBS. Cubrir tubo y llevar a centrifugación.

9. Centrifugar con contrapeso a 1700 r.p.m. durante 10 minutos, a 4ºC pudiendo utilizar freno al final de la centrifugación.

10. Extraer tubo de la centrífuga sin agitarlo.

11. Decantar sobrenadante y resuspender células del fondo con un pulso de vórtex o con golpes con las yemas de los dedos.

12. Completar nuevamente hasta los 5 mL con PBS, cubrir tubo y llevar nuevamente a centrifugar igual que en el paso anterior.

13. Decantar sobrenadante y resuspender células del fondo con un pulso de vórtex o con golpes con las yemas de los dedos, y pasar a un tubo de Citómetro Para iniciar protocolos de inmunotipificación

ANEXO D. INMUNOFENOTIPIFICACION CELULAR CON ANTICUERPOS DE SUPERFICIE (CD4 Y CD25) E INTRACELULARES (ROR-GAMMA Y FOXP3)

En condiciones ideales de asepsia y antisepsia se inicia la inmunofenotipificación de las células mononucleares.

1. Se preparan 2 tubos para cada paciente ya sea caso o control con una densidad celular de 1×10^6 corroborada mediante conteo en cámara de Neubauer estas células se trabajaran en tubos de citómetro diluidas en 100 cc de solución PBS.

2. Se aplican los anticuerpos de superficie CD4 CD25 se incuban en oscuridad durante 30 minutos

3. Lavado A cada lavado celular consiste en aplicar 4 ml de PBS y centrifugado a 1700 rpm durante 10 minutos y a 4 grados centígrados

4. se inicia el proceso de permeabilización y fijación con *FoxP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set* de eBioscience.

Preparar la solución de Fijación/permeabilización de trabajo: diluyendo Fixation/Permeabilization Concentrat (4x) en Fixation/Permeabilization Diluent, agregar 1.5 ml del concentrado en 4.5 ml del diluyente, agitar en vórtex 3 segundos.

Preparar la solución de permeabilización 1x (diluyendo Permeabilization Buffer (10X) en agua destilada. Prepara 40 mls (4 mls de la solución en 36 de agua).

5. Agregar 1 ml de la solución de trabajo de Fijación y Permeabilización a ambos tubos agitar con vortex 3 segundos e incubar 45 minutos en la obscuridad a 4 °C.

6. sin retirar esta solución una vez pasados los 45 minutos agregar a cada tubo 2 mls de la solución 1x de permeabilización y centrifugar 350 gravedades por 5 minutos.

7. Decantar y agregar 2 mls de la la solución 1x de permeabilización y centrifugar 350 gravedades por 5 minutos.

8. Decantar el sobrenadante y agregar el anticuerpo ROR -gamma 2.5 microlitros y 8 microlitros de anticuerpo FoxP3 Incubar 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

9. Posteriormente agregar 2 mls de la solución de permeabilización a cada tubo centrifugar 5minutos a 350 gravedades 4 °C,

10. Repetir el paso anterior

11. Finalmente resuspender en 200 microlitros de PBS y 100 microlitros de paraformaldheido al 4-5%

12. Guardar para la adquisición de la lectura de anticuerpos en refrigeración a 4º grados centígrados y cubiertos de la luz.

ANEXO E. ADQUISICION DE LA LECTURA FLUROCROMOS EN CITÓMETRO DE FLUJO FACS CANTO II

1. Se corrobora la auto calibración del instrumento

2. Adquisición de lectura de células sin inmunofenotipificación utilizada como control en cada paciente (ya sea caso o control)

3. Adquisición de lectura de células inmunofenotipadas con anticuerpos de superficie e intracelulares.

4. Se guarda la información para su posterior análisis estadístico