

**CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DE INTERACCIÓN GENÉTICO-
METABÓLICO BASADO EN ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y
CORRELACIONES CLÍNICO-MOLECULARES PARA LA PREECLAMPSIA**

JOSÉ MARÍA SATIZÁBAL SOTO M.D., M.Sc.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - 9695
SANTIAGO DE CALI
2015**

**CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DE INTERACCIÓN GENÉTICO-
METABÓLICO BASADO EN ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y
CORRELACIONES CLÍNICO-MOLECULARES PARA LA PREECLAMPSIA**

JOSÉ MARÍA SATIZÁBAL SOTO M.D., M.Sc.

Trabajo de tesis como requisito para parcial para optar al título de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director

FELIPE GARCÍA VALLEJO Ph.D.

Codirector

ADALBERTO SÁNCHEZ GÓMEZ Ph.D.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS 9695
SANTIAGO DE CALI
2015**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Santiago de Cali, _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi familia, a mis hijos Mauricio Andrés y Christian Camilo, y a mi esposa, Lina Johanna Morena. A mis compañeros, especialmente Julio César Montoya, y directores, Felipe García Vallejo y Adalberto Sánchez Gómez. A la Universidad del Valle y principalmente a la Fundación para la Prevención de la Discapacidad -FUNDIS- por la financiación parcial de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
I. CAPÍTULO PATOFISIOLOGIA DE LA PREECLAMPSIA	20
I.1 Factores de riesgo de la Preeclampsia	21
I.2 Etiología de la Preeclampsia	23
I.3 Prevención de la Preeclampsia	27
II. CAPITULO BIOQUÍMICA DE LA PREECLAMPSIA	28
II.1 Introducción	28
II.2 Objetivos	35
II.3 Metodología	35
II.3.1 Tipo de estudio	35
II.3.2 Muestreo	36
II.3.3 Análisis estadístico	38
II.4 Resultados y discusión	39
II.4.1 Datos descriptivos de casos y controles	39
II.4.2 Evaluación de los parámetros bioquímicos	40
II.4.3 Análisis de Componentes Principales	42
III. GENÓMICA DE LA PREECLAMPSIA	46
III.1 Introducción	46
III.2 Objetivos	48
III.3 Metodología	48
III.3.1 Minería de datos	48
III.3.2 Análisis bioinformático	50
III.3.3 Análisis estadístico	51

III.4 Resultados y discusión	52
III.4.1 Minería de datos	52
III.4.2 Expresión diferencial de genes seleccionados	53
III.4.3 Caracterización de la cromatina asociada	55
III.4.4 Paseo Cromosómico	57
III.4.5 Red de interacción protéica de genes asociados	58
IV. BIOLOGÍA SISTÉMICA DE LA PREECLAMPSIA	65
IV.1 Introducción	65
IV.2 Objetivos	68
IV.3 Metodología	68
IV.3.1 Minería de datos	68
IV.3.2 Análisis Chi-cuadrado	69
IV.3.3 Análisis multivariado	69
IV.4 Resultados y discusión	69
IV.4.1 Análisis Chi-cuadrado	69
IV.4.2 Análisis de asociación	70
IV.4.3 Análisis de Componentes Principales	71
IV.4.4 Análisis de Clúster Jerárquico	73
IV.4.5 Información descriptiva de muestras placentarias	74
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	99

ABREVIATURAS

AAF	Anticuerpos antifosfolípidos
ACA	Anticuerpos Anti-cardiolipinas
ACJ	Análisis de Clúster Jerárquico
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADMA	Dimetil-arginina asimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	American Heart Association
AL	Anticoagulante Lúpico
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análisis Ortogonal de Varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT1	Receptor del tipo 1 de la angiotensina II
AT₁-AA	Receptor auto-anticuerpos tipo 1
AQP1	Aquaporine 1
BiNGO	Biological Networks Gene Ontology tool
BioGRIG	The Biological General Repository for Interaction Datasets
BCL6	B-cell lymphoma 6
BLAT	Basic Local Alignment Tool
CA10	Carbonic anhydrase X
CI	Índice de confiabilidad
COL17A1	Colágeno, tipo XVII, alfa 1
CR1	Complement receptor type 1
CRH	Corticotropin releasing hormone
CRP	C Reactive Protein
CSH	Hormona Somatomamotropina Coriónica
EIB3	Epstein-Barr virus-induced 3
ENG	Endoglin
EPS	Entidad Promotora de Salud
ER	Elementos repetidos
ERV	Endogenous retroviruses
F	Femenino
FC	Fold change
FEA	Fosfatidiletanolamina
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1
FSTL3	Follistatin-like 3

GCM1	Glial Cells Missing Homolog 1
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	Gene Ontology
HCy	Homocysteine
HDL	High density lipoproteins
HELLP	Hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet levels
HEXB	Hexosaminidasa B
HHcy	Hiperhomocisteinemia
HIE	Hipertensión inducida del embarazo
HLA-G	Human leukocyte antigen G
HTAC	Hipertensión Arterial Crónica
HTRA1	High temperature requirement factor A1
HTRA4	High temperature requirement factor A4
HUV	Hospital Universitario del Valle
Ig	Inmunoglobulina
IL-1b	Interleuquina-1b
IL-6	Interleuquina-6
INHA	Inhibina alfa
INHBA	Inhibina beta A
IM	Informática médica
ISG15	Interferon-Stimulated Protein, 15 KDa
JAG1	Jagged 1
kDa	Kilodaltons
KRT19	Keratin 19
LDL	Low density lipoproteins
LEP	Leptin
LINE	Long Interspersed Elements
LTR	Long Terminal Repeats
LYN	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
M	Masculino
MDA	Malonildialdehído
MIR	Mammalian interspersed repeat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	No disponible
NDRG1	N-myc downstream regulated 1
NO	Nitric oxide
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
P/E	Preeclampsia–eclampsia

PCa	Proteína C activa
PCR	Proteína C Reactiva ultrasensible
PE	Preeclampsia
PGH	Proyecto genoma humano
PHYHIP	Phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein
PIGF	Placental Growth Factor
PINA2	Protein Interaction Network Analysis
PRL	Prolactina
PROCR	Receptor de la Proteína C
PS	Proteína S
PVR	Poliovirus receptor
PVRL4	Poliovirus receptor-related 4
RCIU	Retardo del crecimiento intrauterino
RDH13	Retinol dehydrogenase 13
RTE	Retrotransposon element
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1
SE	Significancia estadística
SFA	Sufrimiento fetal agudo
sFlt-1	Soluble fms-like tyrosine kinase-1
SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A
SINE	Short Interspersed Elements
SLC6A8	Solute carrier family 6
SLCO2A1	Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1
SPAG4	Sperm associated antigen 4
ST5	Suppression of tumorigenicity 5
TAG	Triacilgliceroles
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP	Tiempo de protrombina
TREM1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TTPa	Tiempo tromboplastina parcial activado
UCSC	Universidad de California Santa Cruz
USP9Y	Ubiquitin specific peptidase 9
UTY	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medias, desviación estándar y significancia estadística de las variables bioquímicas determinadas.

Tabla 2. Tabla de Pesos de los Componentes en el ACP. En rojo se señala el mayor peso por cada variable, destacando así, a qué componente pertenecen.

Tabla 3. Funciones de cada componente principal según valor dado por el ACP.

Tabla 4. Bases de datos empleadas para la minería de datos ejecutada en este trabajo.

Tabla 5. Variables genómicas empleadas en el análisis bioinformático.

Tabla 6. Número de artículos científicos encontrados en PubMed con cada filtro.

Tabla 7. Datos topológicos de la red construida en el programa Cytoscape.

Tabla 8. Categorías GO para procesos biológicos dadas para la red de interacción proteína-proteína.

Tabla 9. Número de plataformas y muestras extraídas de la base de datos GEO.

Tabla 10. Análisis de Chi cuadrado de diferentes variables de línea base, valoradas tanto en mujeres preeclámpsicas como en los controles normales.

Tabla 11. Contribución del porcentaje de la varianza del resultado del ACP de seis componentes a la varianza total.

Tabla 12. Valores de contribución de la varianza de cada uno de los genes asociados con PE en cinco componentes principales que incluyeron el 63,80% de la varianza total calculada

Tabla 13. Descripción de variables relacionadas con las características de aquellas placentas preeclámpsicas del grupo 1, donde se detectó elevada expresión de los genes ENG, FSTL3 y LEP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogenia de la PE. Resumen de los mecanismos implicados en ella. Tomado de 73.

Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el análisis de las muestras de sangre.

Figura 3. Concentración plasmática de A) Colesterol total, B) HDL, C) LDL, D) TG, E) Folatos y F) HCy, componentes que no presentaron diferencia estadística al comparar controles y casos.

Figura 4. Concentración plasmática de A) Ácido úrico, B) PCR, y C) ACA, componentes que sí presentaron diferencia estadística al comparar controles y casos.

Figura 5. Biplot Bidimensional ACP.

Figura 6. Distribución de los valores de Z-score y Fold change promedio para los 16 genes asociados. Se encuentran organizados según el Z score. CA10 fue el único *downregulated*.

Figura 7. Expresión diferencial de genes en placenta de embarazadas preeclámpicas. A). Distribución de los valores de Z-score de genes asociados y controles. B). El dendrograma del Análisis de Conglomerados que muestra uno solo, con subgrupos en los que se destacan, por su elevada intensidad de expresión correlacionada con PE, los genes asociados LEP, EBI3, PROCR, FSTL3, HEXB, INHBA, ENG, INHA y COL17A1.

Figura 8. Comparación, entre los genes asociados y los controles, de las diferentes variables genómicas analizadas. A) Variables asociadas a la cromatina codificante. B) Variables asociadas a la cromatina no codificante que incluyó las familias de ER CR1, L1, ERV y RTE.

Figura 9. Distribución del número de familias por cada gen A) asociado y B) control. La distribución del número de genes por cada familia (Anexo 7), el número de clases por gen (Anexo 8), la distribución del número de genes por cada clase (Anexo 9), y el número de integrantes de cada clase en los 16 genes asociados y control (Anexo 10), también fueron graficados.

Figura 10. Distribución de elementos repetidos obtenida del paseo cromosómico de 100Kpb alrededor de genes asociados con PE, se resaltan las secuencias repetidas SINE, LINE, Alu y MIR.

Figura 11. Número de interacciones de tipo proteico encontradas para cada gen asociado a PE en la red construida.

Figura 12. Red de expresión para placenta preeclámpsica obtenida mediante la aplicación del programa Cytoscape 3.2. Los círculos más grandes y de color rojo resaltan los genes de mayor expresión.

Figura 13. Clasificación en tres grupos de la expresión de diferentes genes cuya expresión fue elevada en los experimentos con micromatrices de ADN. En esta situación se determinaron los genes biomarcadores en tres tipos de placentas preeclámpsicas.

Figura 14. Distribución en dos componentes del plano cartesiano de 22 genes A) Asociados a PE cuyos valores de z-score se obtuvieron de 76 placentas de mujeres con PE y B) Placentas control.

Figura 15. Representación en Heat Map del ACJ de los valores de z-score de 22 genes asociados a PE en 76 muestras de placentas preeclámpsicas. En la escala de colores las zonas en rojo se determinan un elevado nivel de expresión génica mientras las zonas verdes corresponden a genes subexpresados con valores de z-score negativos.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Genes seleccionados, P -valor y Fold change de en los 7 artículos científicos.

Anexo 2. Distribución de fold change promedio para los 16 genes.

Anexo 3. Información general sobre genes asociados seleccionados.

Anexo 4. Información general sobre genes control seleccionados.

Anexo 5. Caracterización de genes asociados en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen.

Anexo 5.1. Continuación: caracterización de genes asociados en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen.

Anexo 6. Distribución del número de elementos repetidos por cada gen asociado A) y control B). Los genes asociados no muestran muchas diferencias, mientras que los controles CPPED1 y MPPED2 son los que más repeticiones tienen.

Anexo 7. Distribución del número de genes por cada familia. Todos los genes A) asociados y B) control, contienen familias en común –Alu, ERV, hAT, L1, L2, Mir, TcMar-, pero las demás son particulares a pocos genes.

Anexo 8. Distribución del número de clases por cada gen A) asociado y B) control. Los genes asociados no muestran muchas diferencias, mientras que los controles CPPED1 y MPPED2 se distinguen por ser los más diversos en cuanto a esta variable.

Anexo 9. Distribución del número de genes por cada clase. Todos los genes A) asociados y B) control, contienen pocas clases en común, la mayoría de clases son particulares a uno o dos genes.

Anexo 10. Número de integrantes de cada clase en los 16 genes A) asociados y los 16 genes B) control. En ambos grupos son aproximadamente 15 las clases numerosas, las demás tienen pocos integrantes.

Anexo 11. Ponencias y artículos de investigación realizados en el desarrollo del trabajo

RESUMEN

La Preeclampsia es la principal causa de morbilidad materna en el país - causando más del 42% de muertes- y permanece como una de las principales mundialmente. Es por este gran impacto que genera la PE y por su carácter complejo, que se hace necesaria una visión bioquímica, molecular y genómica integral, que permita explicar la patogénesis de la enfermedad y provea herramientas para su diagnóstico precoz. En este trabajo se construyó un modelo genético-metabólico de PE, basado en una simulación computacional y correlaciones clínico-moleculares. Para validar este modelo se tomaron 100 muestras de sangre periférica de dos grupos de mujeres embarazadas que ingresaron al servicio de Obstetricia del HUV: el primer grupo, de 50 muestras correspondientes a mujeres diagnosticadas con PE de acuerdo con los criterios internacionales, y el segundo grupo, formado por 50 con embarazo normal como controles. Se midieron los niveles sanguíneos de HCy y folatos mediante inmunoensayo de fluorescencia polarizada, y el perfil lipídico, Ácido Úrico, PCR y ACA mediante espectrofotometría. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas para los niveles de PCR, Ácido úrico y ACA, siendo mayores en el grupo de mujeres con PE. En el estudio genómico de PE, mediante una simulación computacional, se analizaron niveles de expresión en placenta, de genes asociados a PE utilizando el z-score y sus interacciones proteicas. Para ello se aplicaron las redes de interacción, empleando el programa Cytoscape 3.2. De ésta se extrajeron los procesos biológicos más probables de la red; además se comparó la cromatina asociada a estos genes empleando recursos del NCBI y del Genome Browser UCSC. De los resultados derivados de éste análisis, se lograron identificar las proteínas codificadas por los genes ENG, LEP, TGFB1, NDRG1 y BCL6 como posibles biomarcadores de expresión en PE, además de confirmarse la angiogénesis alterada y apoptosis incrementada como unos de los procesos biológicos más afectados en el desarrollo de la enfermedad. Desde el enfoque sistémico, se compararon 76 muestras de mujeres preeclámpsicas y 96 de controles, extraídas de los datos de transcripción global de 14 mil genes consignados en el GEO a partir de experimentos con micromatrices de DNA. Un análisis de asociación mostró que los z-score de los 22 genes seleccionados, se agruparon en tres diferentes categorías, las cuales a su vez se correlacionaron no solo con la expresión sino también, con el tiempo de gestación de 25 a 36 semanas. De estas 3 categorías se observó la alta expresión de LEP, postulandola como posible biomarcador de PE. Esta investigación logró determinar que los niveles de

los metabolitos PCR, Ácido úrico, ACA, y la elevada expresión de los genes codificantes para LEP, ENG, TGFB1 se convierten en marcadores tanto metabólicos como genómicos para identificar y definir la patogénesis de la PE. Dada la complejidad de la PE, además de estos estudios genómicos y bioquímicos, se propone continuar con estudios epigenómicos, ya que, al tener gran componente ambiental, se podrían generar nuevos tratamientos preventivos a nivel de dietas o suplementos que modifiquen las marcas epigenéticas en genes señalados como biomarcadores.

Palabras clave: Preeclampsia, genómica funcional, red-interacción-proteica, biomarcadores, LEP, ENG, PCR, ACA.

ABSTRACT

Preeclampsia is the leading cause of maternal morbimortality worldwide and in Colombia -causing more than 42% of the deaths-. Due to the great impact that PE in public health, it is necessary to approach it by multidisciplinary strategies including clinical-molecular correlation and computational simulation, in order to validate a model of its pathogenesis and provide tools for its early diagnosis. We included in the present study, 50 pregnant women previously diagnosed with PE according with the international criteria, and 50 normal pregnant women as a control group; all of them entered in the Obstetric Service of the HUV. Blood samples were taken by vein puncture and the levels of Homocysteine “HCy” and folates were measured by fluorescence polarization immunoassay and, by spectrophotometry, the lipid profile, Uric Acid, C-reactive protein “CRP” and Anti-cardiolipin antibodies “ACA”. Statistically significant differences for the CRP, uric acid and ACA levels were found higher in the PE group. By a computational simulation, we analyzed the expression levels of PE associated genes in placenta, using their z-score and evaluated the protein interactions, constructing a network with the Cytoscape 3.2 computer program. The most probable biological processes from that network were extracted, and a comparison of the associated chromatin was made using the resources of the NCBI and the Genome Browser UCSC. In this study we identify as potential biomarkers of PE, the proteins encoded by ENG, LEP, TGFB1, NDRG1 and BCL6 genes, and confirmed the altered angiogenesis and increase of apoptosis as ones of the biological processes more affected in the development of PE. Finally we performed a systemic approach comparing 76 samples of preeclamptic women with 96 samples as a control group, both extracted from the global transcription data of 14 thousand genes, previously deposited in the GEO from DNA microarray experiments. An association analysis showed that the z-score of the 22 selected genes were clustered in three different categories, which were correlated not only with the expression but also with the gestation time from 25 to 36 weeks. From these categories, the high expression of LEP stands out, bringing it forward as a possible biomarker of PE. This research showed the levels of the CRP, uric acid and ACA metabolites and the high transcription of the genes LEP, ENG, TGFB1 become markers as well as metabolic as genomics for the identification and definition of the pathogenesis of PE. Given the complexity of PE, besides of this genomic and biochemical studies, we propose to extend to epigenomic studies since, having a large environmental component, could generate new preventive treatments in terms

of diets or supplements that modify the epigenetic marks on genes identified as biomarkers.

Key words: Preeclampsia, functional genomics, protein-interaction-network, biomarkers, LEP, ENG, CRP, ACA.

INTRODUCCIÓN

En Colombia como en otros países en desarrollo, los problemas de salud están relacionados principalmente por el bajo nivel socioeconómico de la población, particularmente los procesos infecciosos y enfermedades relacionadas con una inadecuada nutrición; sin embargo, nuestro país también presenta graves problemas de salud que involucran al cáncer, diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares incluyendo las trombofilias y en particular la PE¹.

La PE es una de las tres principales causas de mortalidad materna en el mundo. Puede afirmarse que es la más importante de las enfermedades obstétricas en muchos países¹. En Colombia, según estadísticas oficiales del Ministerio de Salud, ocupa el primer puesto en mortalidad materna, con 42 por 100,000 nacidos vivos². Esta patología, presenta además complicaciones, tanto para las madres asociadas con falla renal, coagulopatía, convulsiones, síndrome HELLP, como para el feto en el que se asocia con retardo del crecimiento intrauterino (RCIU), sufrimiento fetal agudo (SFA), prematuridad, y muerte fetal³. Por lo tanto, el impacto económico y social en los países en vía de desarrollo es de gran importancia, aún más si consideramos que en Colombia la mortalidad materna es 10 veces mayor a la observada en Estados Unidos³, con una tasa de 185 muertes maternas x 100,000 recién nacidos vivos⁴.

A pesar de la importancia de la PE en términos de salud pública, los mecanismos que la desencadenan están determinados de una manera incipiente. Se propone que es una enfermedad compleja, donde la susceptibilidad genética asociada a una diversa contribución de factores medio ambientales, determina la generación de una respuesta que conduce a la aparición de hipertensión, proteinuria y edemas, que son signos del desarrollo de la PE. La recurrencia de PE puede alcanzar hasta un 65% cuando su presentación es temprana y/o severa, además un 35% de las pacientes quedan con hipertensión crónica e inclusive pueden presentar falla renal crónica que amerite hemodiálisis y hasta trasplante renal⁵.

Dada la naturaleza compleja de la PE, las estrategias de prevención han sido dirigidas a los factores de riesgo convencionales conocidos. Sin embargo, estas estrategias pudieran ser más exitosas en la medida que sean dirigidas teniendo en cuenta la susceptibilidad genética de las poblaciones; de allí la importancia de abordarla teniendo en cuenta, tanto los factores de riesgo convencionales como los

no convencionales. Con un adecuado diagnóstico genético y molecular que permita identificar precozmente esta patología sería posible instaurar un tratamiento profiláctico en su embarazo, el cual incluiría un plan terapéutico con adecuadas dosis de ácido fólico, ácido acetilsalicílico, calcio y selenio entre otros, desde la consulta preconcepcional hasta la semana 36 de gestación, lo que supone concomitantemente un adecuado control del embarazo.

El manejo de la PE, debe ser multidisciplinario a fin de abordar desde todas las perspectivas al paciente y su familia permitiendo un adecuado manejo médico, soporte nutricional, psicológico, de rehabilitación y un certero consejo genético. La alta prevalencia de estas alteraciones genéticas encontrada a nivel mundial, conjuntamente con el riesgo trombótico asociado, remarca la importancia, en nuestro país, del presente estudio para así poder explicar la ocurrencia de la enfermedad en nuestro medio y plantear modelos de intervención terapéutica y farmacológica acordes con los factores de riesgo encontrados en nuestras localidades. Teniendo como punto de partida un enfoque integral y transdisciplinario de la enfermedad. Es por esta razón que los resultados obtenidos, validan la hipótesis de que la PE es una patología compleja que debe ser abordada desde lo Bioquímico, pasando por lo molecular y genómico para llegar a construir un modelo sistémico que incluye este abordaje transdisciplinar.

Basados en el contexto que las investigaciones en PE aportan a conocimiento de esta patología, y desde un enfoque clínico y sistémico, este trabajo propone construir un modelo de interacción sistémica genético-metabólico basado en simulaciones bioinformáticas y correlaciones clínico-moleculares, como biomarcadores de riesgo y predicción en el desarrollo de la patología.

I. CAPÍTULO

PATOFISIOLOGIA DE LA PREECLAMPSIA

La PE constituye la principal causa de mortalidad materna en Colombia con más del 42%⁶ de fallecimientos atribuibles a esta enfermedad, afecta aproximadamente al 8% de las embarazadas del mundo entero con un incremento progresivo de su incidencia⁷. Es la principal causa de morbilidad materno-fetal con una mortalidad perinatal cinco veces mayor, generando un gran impacto económico y social en los países en desarrollo^{3, 8}, situación de la que Colombia no es ajena⁹. La proporción de mortalidad materna que ocurrió en el 2006 por cuenta de la PE, varió dependiendo de la base poblacional analizada de 23,8% en toda la población del país⁹ a 50% en las instituciones de tercer nivel¹⁰. Usualmente se incluye a la PE como la primera causa específica de muerte materna en Colombia, seguida por la hemorragia postparto. Gran parte de la documentación que existe sobre el papel de la PE en la mortalidad materna está dada por el esfuerzo que se adelanta en muchos países para reducir el problema; en Colombia, esto está representado por el Plan de Choque para Reducir la Mortalidad Materna¹¹.

Uno de los aspectos más importantes PE es precisamente su condición compleja, lo que dificulta encontrar una causa exacta ya que hay muchos factores que intervienen en su desarrollo. En consecuencia, su estudio ha sido y sigue siendo abordado desde diferentes campos, pasando de la genética clásica a las ciencias ómicas y a la integración sistémica moderna. Es por esto que en los últimos años el estudio de esta enfermedad se ha enfocado en identificar biomarcadores que ayuden a su diagnóstico clínico temprano, puesto que esta es una enfermedad silenciosa en su inicio y sólo se manifiestan los síntomas cuando el embarazo se encuentra en una etapa avanzada. El estudio de las moléculas que forman el “genoma funcional” se ha ido incrementando fuertemente a lo largo de la era post-genómica mediante la expansión de las tecnologías ómicas. Entre éstas, las tecnologías proteómicas y la espectrometría de masas en particular, forman una estrategia bien armada hacia análisis de alto rendimiento que pueden ofrecer nuevas perspectivas en el entendimiento de patofisiologías, así como también, en el desarrollo de terapias moleculares para su tratamiento¹². En consecuencia, una amplia gama de estudios han optado por investigar una enfermedad compleja como lo es la PE a nivel proteómico^{13, 14, 15, 16, 17}. Uno de éstos es el realizado por Epiney y colaboradores¹⁸, quienes identificaron las proteínas secretadas por células del citotrofoblasto de un grupo preeclámpsico y uno control, logrando concluir que la

disminución del factor XIII -cadena A- podría estar asociado al desarrollo de PE. Otro de los estudios enfocados en encontrar patrones diferenciales a nivel proteómico, es el de Feng y colaboradores¹⁹, en el que se encontró que la proteína alfa-1-antitripsina esta subregulada en mujeres con PE. En el 2011 Zhang y colaboradores²⁰ analizaron *nitroso*-proteomas de placentas humanas normotensas y preeclámpsicas, obteniendo como resultado la alteración significativa que presenta el *nitroso*-proteoma de placentas preeclámpsicas en comparación con placentas control y sugiriendo su rol esencial en la patofisiología de la PE.

I.1 Factores de riesgo de la Preeclampsia

La PE se caracteriza por un aumento de la presión arterial mayor de 140/90 mm Hg después de la semana 20 de gestación, con proteinuria mayor de 300mg/L en 24 horas y ocasionalmente edema especialmente facial. En algunas pacientes, hay además alteración en los mecanismos de coagulación sanguínea y en el funcionamiento hepático¹. Esta patología es una de las principales causas de mortalidad materna en el mundo¹⁸ afectando aproximadamente al 8% de las embarazadas con un incremento progresivo de su incidencia⁹, mientras que en Colombia, ésta constituye la principal causa, con más del 42%¹¹ de fallecimientos maternos atribuibles.

Las teorías actuales han caracterizado al embarazo como un estado de coagulación intravascular diseminada crónica compensada, en el que la elaboración de los componentes de la coagulación cubre o rebasa a su consumo; en este sentido, la evidencia histopatológica sugiere que la reducida perfusión placentaria ocasionada por un defecto durante la placentación, posiblemente por un mecanismo inmunogenético, es uno de los eventos iniciales de la PE; por esta razón, muchos de sus factores de riesgo se correlaciona con una menor perfusión placentaria^{21, 22, 23, 24}. La mayoría de los casos de PE ocurren en primigestantes saludables, y por ello es importante establecer los factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de esta patología, Sin embargo, no hay una paciente típica que nos permita identificarla previo a las manifestaciones clínicas, sino más bien existen, desde el punto de vista epidemiológico, factores de riesgo conocidos que predisponen a la presencia de PE^{25, 26}, los cuales se describen a continuación:

Paridad: La PE es, predominantemente, una entidad que afecta a mujeres primigestantes, observación hecha por Mauriceau hace cuatro siglos²⁷. Sobre este particular, Hinselmann²⁸, realizó una revisión de 6498 casos de la literatura, entre los cuales el 74% de las preeclámpsicas eran primigestantes, pudiendo calcular que

existe un riesgo seis veces superior en este grupo de pacientes respecto a las multíparas.

Edad Materna: Se reporta con gran incidencia en mujeres cuya edad materna es menor de 21 años o mayor de 35 años²⁹. Torres y colaboradores³⁰, han señalado, en un estudio realizado en una Unidad de Hipertensión Arterial de una Sala de Partos Venezolana, que sólo ingresan pacientes con PE severa o eclampsia, pacientes con un promedio de edad de 28 años, con mínima de 13 y máxima de 46.

Obesidad: Un incremento en el 35% del peso del feto en el embarazo aumenta el riesgo de presentar toxemia. Se ha observado que existe mayor incidencia de PE en primigestantes obesas³¹.

Condicion Socioeconómica: Esta variable afecta principalmente a pacientes de bajo nivel socioeconómico. Esta relación se fundamenta en la mala calidad del control prenatal, y falta de recursos para tener una dieta adecuada, rica en calcio y folato, los cuales podrían prevenir su evolución^{32, 33}.

Hipertensión Arterial Crónica: Las mujeres con HTAC son diez veces más propensas al desarrollo de PE³⁴. Además, estas pacientes muestran que mientras mayor sea la severidad y la evolución de la enfermedad, el riesgo de desarrollar PE, será superior³⁵.

Embarazo Gemelar: La embarazada con gemelos tiene más probabilidad de desarrollar PE con relación a la embarazada de feto único. El riesgo de PE se eleva hasta 10% a 20% en los embarazos dobles, hasta 25% a 60% en los triples, y puede llegar hasta 90% en los cuádruples³⁶

Historia de Enfermedad Renal Crónica, Diabetes e Hipertiroidismo mal controlados: Se ha encontrado una incidencia superior de PE entre pacientes con diabetes mellitus (10%), en comparación con controles (4%)³⁷. Aunque el hipertiroidismo es poco frecuente durante el embarazo (0,2%), tiene entre sus complicaciones a la PE³⁸.

Cambio de Paternidad: Existen varias publicaciones que aportan evidencia del aumento en la incidencia de PE cuando se presenta un cambio de paternidad^{39, 40}. Se ha reportado que una exposición prolongada al semen del compañero sexual, previo al embarazo, tiene un efecto "protector" contra el desarrollo de esta patología. De esta manera, se observa una mayor incidencia de PE en mujeres que han

utilizado métodos anticonceptivos de barrera, tales como diafragma y condones, con respecto a usuarias de anticonceptivos orales o de dispositivos intrauterinos⁴¹.

Antecedente personal o familiar de PE: Si una embarazada presenta toxemia en un embarazo previo, las probabilidades de recurrencia son del 37% si la PE ocurrió en el tercer trimestre, y del 64% si ocurrió en el segundo trimestre⁴². En una población con incidencia de PE del 6%, una primigestante cuya hermana haya presentado dicha enfermedad, tiene una probabilidad de presentarla del 37%. Si fue su madre quien tuvo la toxemia, la probabilidad en la hija es de un 26%. Muchos estudios son consistentes con la hipótesis de que la PE puede ser heredada, con un patrón hereditario considerado por la mayoría como autosómico recesivo. No obstante, es difícil establecer un modelo de herencia, debido a la confluencia con otros factores de infertilidad o esterilidad, que no permiten identificar a todos los casos con exactitud^{43, 44}.

Los anteriores factores además de ser inespecíficos están presentes en muchas mujeres durante la gestación, aún sin riesgo de padecer PE, por tanto su utilización como biomarcadores o predictores de la enfermedad se dificulta notoriamente.

I.2 Etiología de la Preeclampsia

Isquemia/Hipoxia Placentaria: A pesar que el mecanismo de la fisiopatología de la PE continúa sin ser aclarado, la Isquemia/Hipoxia Placentaria parece ser el factor clave en ella^{45, 46, 47}. Una inadecuada invasión trofoblástica que lleva a una remodelación incompleta de las arterias espirales uterinas se considera la causa primaria de la isquemia placentaria⁴⁵. La pobre perfusión y la hipoxia llevan a la placenta a sintetizar y liberar grandes cantidades de factores vasoactivos como sFlt-1, citoquinas, y posiblemente la ANG II, receptor autoanticuerpos tipo 1 (AT₁-AA)^{45, 48, 49, 50, 51}. Las que a su vez inducen activación/disfunción del endotelio materno en vasos, riñón, y otros órganos que a la larga termina en hipertensión.

La molécula que prominentemente se postula como clave en la patogénesis de la PE es sFlt-1.^{52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62} Muchas evidencias científicas sustentan la hipótesis que la isquemia placentaria contribuye a la disfunción de las células endoteliales en la vasculatura materna induciendo una alteración en el balance de factores antigénicos/antiangiogénicos circulantes como por ejemplo VEGF, PlGF, y sFlt-1. Investigaciones recientes sugieren que concentraciones elevadas de sFlt-1 pueden presagiar los síntomas clínicos de la PE^{47, 57, 63, 64}, otros estudios indican que la hipoxia y pobre perfusión placentarias pueden dar inicio al desbalance de factores antigénicos^{65, 66}. Sin embargo aún no es claro por que la deficiencia en la

perfusión placentaria inicia los síntomas preeclámpsicos como son la hipertensión, disfunción endotelial e incrementa las concentraciones de sFlt-1, o por qué el inadecuado desarrollo placentario es seguido de cambios patológicos en la expresión y secreción de sFlt-1⁵⁴.

La hipertensión asociada y en general los síntomas de la PE, desaparecen después del parto o la extracción prematura de la placenta⁶⁷. Esto en combinación con la evidencia de PE en embarazos molares, es decir, desarrollo de placenta más no de feto, sugiere que la placenta juega un papel central en la enfermedad. La principal hipótesis sobre el evento inicial de la PE es la reducida perfusión de la placenta que ocasiona una extensa disfunción del endotelio vascular de la madre. Otros numerosos factores incluyendo genéticos, inmunológicos, comportamentales, ambientales, han sido implicados en la patogénesis de la PE^{68, 69}. El principal evento descrito hasta ahora es la interacción entre la isquemia/hipoxia placentaria y la disfunción cardiovascular que es ampliamente reconocida como fundamento del síndrome de la PE.

Los trabajos previos sobre esta enfermedad del embarazo sugieren que las alteraciones patológicas más precoces aparecen en la circulación útero-placentaria, lo cual origina una isquemia placentaria que es considerada como el estadio I de la enfermedad⁷⁰. En el estadio II, la placenta isquémica secreta varios factores circulantes los cuales provocan la lesión de las células endoteliales en la madre con el apareamiento del cuadro clínico de la PE^{70, 71}. Existen muchos argumentos que sugieren que la isquemia placentaria desempeña un papel central en la PE^{72, 73, 74}:

- 1) El examen histológico de las placentas de pacientes con PE muestra numerosos infartos placentarios y un estrechamiento esclerosante de las arteriolas⁷⁵;
- 2) las biopsias de las placentas de estos pacientes revelan una invasión trofoblástica inadecuada de las arteriolas deciduales maternas que origina vasos endurecidos⁷⁶;
- 3) los factores de riesgo maternos para la PE incluyen condiciones médicas que predisponen a las pacientes a una insuficiencia vascular tales como la hipertensión arterial crónica, la diabetes, el lupus y las enfermedades trombosantes adquiridas o hereditarias⁷⁷;
- 4) los embarazos múltiples o la mola hidatiforme que aumentan la masa placentaria pero con una disminución relativa del flujo sanguíneo, aumentan el riesgo de PE⁷⁵;

los modelos animales de PE se basan en la creación de una isquemia placentaria y así alterar el flujo sanguíneo⁷⁸.

Durante el desarrollo placentario normal, el citotrofoblasto invade las arteriolas espirales maternas y las remodela completamente para formar vasos de gran capacidad y de débil resistencia⁷⁶. Esta invasión endovascular del citotrofoblasto implica el reemplazo no solamente del endotelio, sino también de la túnica muscular

media. En la PE existe solo una invasión superficial por el citotrofoblasto de las arteriolas uterinas espirales lo cual conduce a una perfusión placentaria reducida y a una insuficiencia placentaria⁷⁹. El mecanismo primario que conduce a una débil invasión/diferenciación trofoblástica en la PE es desconocido, sin embargo factores genéticos, inmunológicos y ambientales (como la hipoxia y la malnutrición) desempeñan un papel importante. Los trabajos extensos del grupo de Fisher sugieren que las diferencias de tensión en O₂ serían el *primun novens* regulador de la capacidad invasiva del citotrofoblasto⁸⁰. Se considera que el remodelaje de las arteriolas espirales comienza al final del primer trimestre y se complete entre la 18 y 20 semanas. A pesar de que la edad gestacional en la cual cesa la invasión trofoblástica de las arteriolas es desconocida, los estudios histológicos han mostrado que la invasión trofoblástica disminuye en la columna decidual cuando la edad gestacional aumenta.

Disfunción endotelial sistémica: Una disfunción endotelial generalizada podría explicar una gran parte de los aspectos clínicos de la PE: la hipertensión arterial por alteración del control endotelial del tono vascular, la proteinuria por un aumento de la permeabilidad glomerular, la coagulopatía como resultado de la expresión anormal de los factores procoagulantes y la disfunción hepática secundaria a la isquemia⁸¹. Los resultados de muchos estudios soportan la teoría de una disfunción endotelial como el origen de las lesiones maternas en la PE. Ha sido reportado un aumento de los niveles circulantes de fibronectina, del factor VIII y de la trombomodulina, todos marcadores de lesión endotelial⁸². La vasodilatación inducida por el flujo ha sido encontrada alterada en los vasos de las pacientes con PE lo cual sugiere una disfunción endotelial⁸³. Una disminución de la producción de las moléculas vasodilatadoras derivadas del endotelio como las prostaciclina, un aumento de los niveles de las endotelinas y una reactivación acentuada a la angiotensina II sugieren igualmente una disfunción endotelial⁸⁴. Las biopsias renales de estas pacientes han revelado edema endotelial glomerular, llamado endoteliosis glomerular⁸⁵. Por último, el suero de mujeres con PE induce la activación de las células endoteliales de la vena umbilical in vitro⁸⁶.

Numerosos laboratorios han ensayado, desde hace varios años, tratar de identificar los factores circulantes responsables de esta disfunción endotelial. Muchos grupos han reportado las alteraciones de las citoquinas/factores de crecimiento/moléculas de adhesión tales como el TNF- α , IL-6, IL-1b, el Fas ligando, lípidos oxidados y la ADMA, los cuales son liberados por la placenta y/o de otras fuentes maternas en la PE^{87, 88}. Sin embargo no existe ninguna prueba de que alguno de estos factores sea responsable de la enfermedad. Recientemente, la neuroquinina-B (cercana a la sustancia P), se produce en las placentas preeclámpsicas, y puede inducir una

hipertensión transitoria en la rata, pero sin causar proteinuria ni endoteliosis glomerular⁸⁹. La sensibilidad aumentada a la ANG II, una anomalía constante en la PE, podría ser secundaria a una superexpresión del receptor de la bradiquinina (B2)⁹⁰. Esta superexpresión conduciría a una heterodimerización de los receptores B2 con el receptor del tipo 1 de la angiotensina II (AT1), y este receptor aumentaría la respuesta a la angiotensina II in vitro. Queda por demostrar que estas anomalías son patogénicas y no epifenómenos. Algunos resultados muy recientes muestran una expresión y una secreción aumentada de los sFLT-1, el cual es un antagonista natural del VEGF, en los pacientes con PE^{91, 92}. De una manera muy interesante, la administración exógena sola del sFlt-1 es capaz de producir un síndrome parecido a la PE⁹¹.

En conclusión, el síndrome materno en la PE, corresponde a un estado de disfunción endotelial generalizado secundario a un exceso de factores tóxicos para el endotelio los cuales son liberados por la placenta patológica o enferma. La comprensión de los mecanismos que conducen a la isquemia placentaria en la PE debería aclararnos sobre la patogenia de la misma. Ésta parece ser una enfermedad en dos etapas con una etapa inicial de síndrome placentario que es seguido por el síndrome materno (Figura 1).

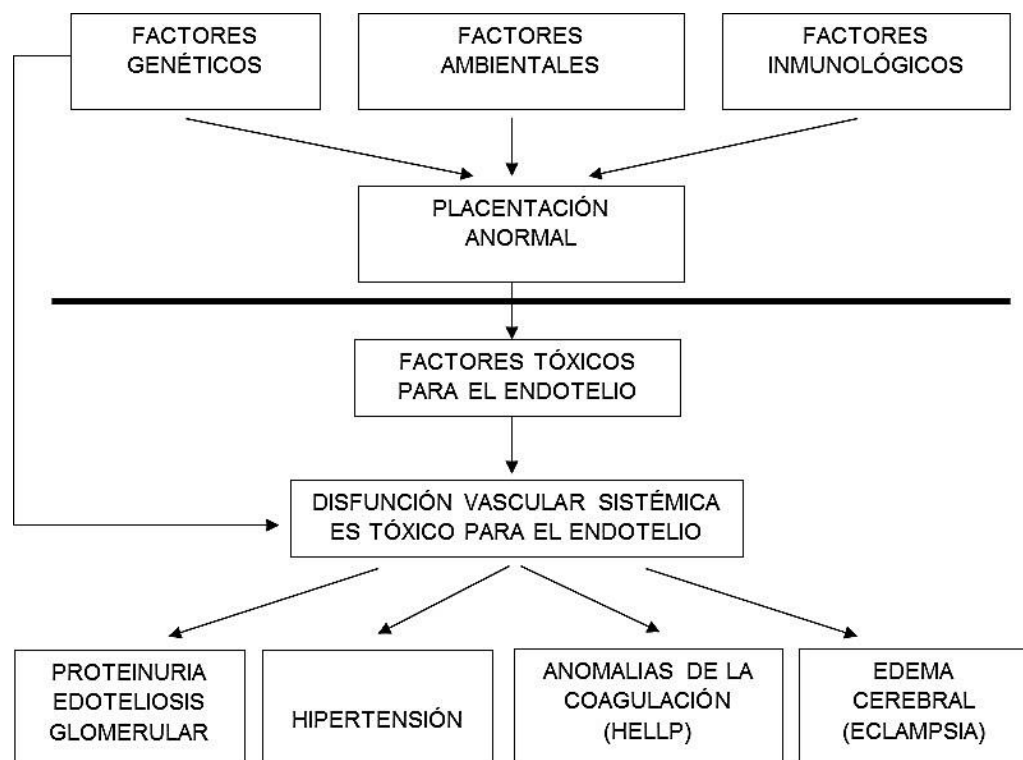


Figura 1. Patogenia de la PE. Resumen de los mecanismos implicados en ella. Tomado de 72.

Tomando como base esta hipótesis se sugiere como factores de riesgo para presentar esta entidad una serie de alteraciones bioquímicas y moleculares, que pueden representar los factores ambientales genéticos e inmunológicos que inducirían el Estadio I de la enfermedad. Se clasifican como factores bioquímicos con un componente predominantemente ambiental, el incremento de triglicéridos y colesterol LDL, la disminución del colesterol HDL, hiperhomocisteinemia, disminución en los niveles de folatos, y la hiperuricemia; con un componente predominantemente genético la presencia del polimorfismo Factor V de Leiden, el de la Metilentetrahidrofolato reductasa G677T y de la Protrombina 20210. Factores con componente predominantemente inmunológico, la concentración aumentada de PCR y los ACA.

En conjunto ellos no explican por sí mismos el desarrollo de la enfermedad pero son factores de riesgo asociados que permiten en un momento determinado identificar una paciente susceptible de padecer PE. Son muchos más los factores bioquímicos, genéticos e inmunológicos asociados con el desarrollo de la PE; sin embargo, sólo se incluyen en esta investigación aquellos que han mostrado una asociación de forma consistente en diferentes estudios y poblaciones y que dadas las condiciones socio-económicas de nuestro medio son factibles de medir rutinariamente.

I.3 Prevención de la Preeclampsia

Actualmente, el único tratamiento contra la PE que elimina sus síntomas, es la extracción de la placenta. También, a mujeres que desarrollan PE severa, se les administra sulfato de magnesio intravenoso, reduciendo así el riesgo de convulsiones eclámpicas. La aplicación clínica de bajas dosis de aspirina como tratamiento preventivo ha incrementado a lo largo de la última década, ya que la evidencia sobre su potencial efectividad se ha acumulado^{93, 94, 95}. En el 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el uso de bajas dosis de aspirina (75mg/día) a mujeres con alto riesgo de padecer PE y en la etapa inicial del embarazo, basándose principalmente en la evidencia colectada por una revisión Cochrane en el 2007⁹⁶. Es por esto que las investigaciones alrededor de esta patología aumentan, con el objetivo final de encontrar tratamientos que la prevengan en mujeres con riesgo de padecerla, y a eliminar sus síntomas sin la necesidad de extraer la placenta.

II. CAPÍTULO

BIOQUÍMICA DE LA PREECLAMPSIA

II.1 Introducción

Existen ciertos factores bioquímicos con un componente predominantemente ambiental que han sido señalados por su relación con el desarrollo de PE, entre estos se tienen:

Hiperhomocisteinemia: Los niveles anormales de HCy pueden ser ocasionados por la interacción de factores genéticos y nutricionales. La homocisteína es un derivado metabólico del aminoácido metionina, por esta razón la dieta que contiene abundante metionina requiere de niveles suficientes de folatos, cobalamina y piridoxina para prevenir la hiperhomocisteinemia (HHcy). La HHcy primaria constituye un padecimiento autosómico recesivo que inicia a edad temprana con el daño a vasos sanguíneos, homocistinuria y trombosis.^{97, 98} Las enzimas primordialmente afectadas son: cistationina β sintetasa^{2, 7}, metilentetrahidrofolato reductasa y metilentetrahidrofolato homocisteína metil transferasa⁹⁸. Diversos estudios han probado que la HHcy es un factor de disfunción endotelial y PE^{99, 100, 101, 102, 103}. Esta genera una condición protrombótica y proaterogénica, debido a la estimulación de factores de la coagulación, como el factor XII y el factor V,¹⁰⁴ por disminución en la actividad de la proteína C y alteración de la agregación plaquetaria. Adicionalmente, los altos niveles de HCy estimulan la peroxidación lipídica generando mayor cantidad de radicales libres de oxígeno, los que a su vez provocan disminución en la biodisponibilidad de NO, llevando finalmente a disfunción endotelial¹⁰⁵. Estudios posteriores reportaron que mujeres con P/E tenían valores elevados de HCy, sugiriendo el papel de esta molécula en la fisiopatología de la PE^{106, 107}.

Según van Pampus y colaboradores¹⁰⁸, 11 de 58 preeclámpsicas severas (19%) antes de las 28 semanas de gestación, presentaron niveles altos de HCy frente a 3 de 67 controles (4,5%) ($p < 0,05$ s). Si la PE se presentó después de las 28 semanas, 35 de 289 (10,4%) presentaron niveles altos. Rajkovic y colaboradores¹⁰⁹, compararon los niveles de HCy plasmática entre 20 primigrávidas preeclámpsicas y 20 normales al momento del parto, demostrando diferencia con significancia estadística. Los mismos autores en otra investigación con gestantes africanas eclámpsicas o preeclámpsicas demostraron niveles elevados de HC frente a normotensas con razones de disparidad de 6,03 y 4,57 respectivamente¹¹⁰. Estudio realizado en Suecia demostró que la HHcy por si misma presenta un OR

para PE de 2,2 (95%CI 0.6-7.9)¹¹¹; hallazgos semejantes fueron encontrados en población de Egipto¹¹², Turquía^{113, 114}, Noruega¹¹⁵, España¹¹⁶, Irlanda¹¹⁷, Italia¹¹⁸, Grecia¹¹⁹, Bangladesh¹²⁰, Irán¹²¹, Canadá¹²², Varsovia¹²³.

De hecho, el hecho de que las mujeres de raza negra presenten un riesgo incrementado de padecer PE comparadas con las mujeres blancas, podría ser explicado por los mayores niveles de HCy sanguínea encontrado en las primeras¹²⁴. Estas diferencias están asociadas a los menores niveles de ácido fólico encontrados, posiblemente debidos a diferencias en la dieta, adherencia al tratamiento suplementario de ácido fólico o factores de interacción nutricional materna. La HHcy podría al mismo tiempo estar reflejando un pobre estado nutricional como consecuencia de un escaso consumo de vitaminas del complejo B, en especial ácido fólico^{125, 126} lo cual ratifica la importancia de un adecuado aporte de esta vitamina para evitar las consecuencias no solo a la madre,^{127, 128, 129, 130} si no también al feto y neonato por el paso transplacentario que lleva a que estos también presente HHcy¹¹³ lo cual se ha relacionado con malformaciones congénitas y con bajo peso al nacer^{131, 132, 133}. El grado de HHcy podría también ser un biomarcador de severidad.^{99, 100, 134, 135}

Hiperuricemia: La elevación de la concentración del ácido úrico es otro componente del síndrome hipertensivo del embarazo que ha sido reconocido desde hace años^{136, 137}. Es uno de los cambios más consistentes y tempranos detectables en las preeclámpsicas y ha sido citado como un buen predictor de la presión arterial y el riesgo fetal^{138, 139}. La determinación de las concentraciones de ácido úrico puede ser una prueba de pesquisa más eficiente que las diferentes pruebas para la estimación de la excreción de proteínas urinarias, pues en modelos animales, la inducción de la hiperuricemia ha demostrado que genera proteinuria¹⁴⁰. Los niveles elevados de ácido úrico correlacionan significativamente con morbilidad y mortalidad materna y fetal. La causa de la hiperuricemia y su papel en la etiología de la PE no son claros aún, pero recientes estudios dan cuenta del potencial rol patogénico en la hipertensión y el daño de las células endoteliales en la PE¹⁴¹ lo cual podría ser explicado por un aumento de la actividad de la Xantina oxidasa dado el estrés oxidativo y las elevadas concentraciones de interleucinas proinflamatorias, conllevan a un aumento de radicales libres y a la superproducción de ácido úrico¹⁴², cuyo efecto en el trofoblasto sería la atenuación de la invasión e integración de él en la monocapa endotelial de la microvasculatura uterina y la falta de remodelación de las arterias espirales; lo cual sería el resultado de la inducción de apoptosis por la hiperuricemia y su acción antioxidante^{143, 144}. La concentración plasmática de ácido úrico mostró una marcada diferencia significativa de pacientes preeclámpsicas con las mujeres normotensas ($P<0,05$)¹⁴⁵ correlacionando

significativamente de manera positiva con proteinuria de 24 horas y su severidad¹⁴⁶, actividad enzimática de alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa y lactato deshidrogenasa ($P < 0,05$). Se encontró una significativa correlación negativa con el recuento de plaquetas. La asociación de la hiperuricemia con el riesgo incrementado para PE se da aún en ausencia de proteinuria¹⁴⁷.

Hiperlipidemia: Varios trabajos han estudiado la relación entre los niveles de triacilgliceroles (TAG) y el posterior desarrollo de PE. La gran mayoría de estos trabajos han concluido que existe una diferencia significativa en los niveles de TAG siendo mayor en las mujeres preeclámpsicas que en las gestantes normotensas.^{148, 149} Ware-Jauregui¹⁵⁰ en Perú estudiaron 125 preeclámpsicas con 179 controles utilizando muestras pareadas por edad y edad gestacional observando unos niveles de $300,9 \pm 9,42$ Vs $249,2 \pm 6,35$ mg/dL apreciándose un aumento progresivo del riesgo de PE con sucesivos cuartiles superiores (OR 1, 1.62, 2.21, 5 con el cuartil inferior como referente) $< 0,01$. Satta¹⁵¹ en el Reino Unido estudió 8 mujeres preeclámpsicas y 8 controles (pareadas por edad, edad gestacional y peso pregestacional) obteniendo una concentración de TAG de 3,68 mmol/L vs 1,93 mmol/L 0,004, mientras que Hubel¹⁵² en el mismo país obtuvo valores de 370 mg/dL vs 162 mg/dL $< 0,02$ en 8 mujeres preeclámpsicas y 9 controles.

Wakatsuki¹⁵³ en Japón en 12 mujeres preeclámpsicas y 12 controles (pareadas por edad y edad gestacional) encontró valores de TAG de $311,6 \pm 85,9$ Vs $17,2 \pm 49,3$ mg/dL $< 0,01$. Winkler¹⁵⁴ en Alemania en 15 preeclámpsicas y 23 controles halló niveles de TAG de 340 ± 100 Vs 235 ± 66 mg/dL $< 0,05$ resultados semejantes fueron obtenidos por Williams¹⁵⁵ en Zimbawe, Ramsay¹⁵⁶ en Escocia y Manten¹⁵⁷ en Países Bajos. Enquobahrie¹⁵⁸ en Estados Unidos estudiando 57 mujeres preeclámpsicas y 510 controles halló 13.6% mayor concentración de TAG; OR 4,1 con niveles > 133 mg/dL $< 0,05$.

Niveles de LDL: Las LDL III son una fracción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en TAG que no son captadas fácilmente por los tejidos periféricos, razón por la cual presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación, a ser fagocitadas por los macrófagos, promoviendo la formación de LDL pequeñas y densas, tipo III^{159, 160}. Esta fracción de LDL favorece la síntesis de tromboxanos y aumenta el calcio intracelular en el músculo liso de los vasos sanguíneos, contribuyendo así al vasoespasmo y a la disfunción endotelial¹⁶¹. Los TAG son los mayores determinantes en la formación de las LDL III aportando el 40-60% de la variabilidad del diámetro de las LDL. En un estudio longitudinal Sattar y colaboradores en estudio realizado en mujeres embarazadas sanas, encontraron que aquellas quienes al principio de la gestación presentaron mayores concentraciones de TAG

circulantes, tuvieron una conversión mayor de LDL o LDL III¹⁶². Por su parte, Ogura y colaboradores¹⁶³ realizaron un estudio comparando mujeres preeclámpsicas Vs. embarazadas normotensas a término encontrando que, en la semana 13, el grupo de las preeclámpsicas presentaba un diámetro pico de LDL significativamente menor que el grupo control ($p < 0,05$) asociado a mayores niveles de TAG que el grupo sano, y que la concentración de estas lipoproteínas disminuía significativamente cuatro semanas postparto. Belo y colaboradores¹⁶⁴, encontraron que las mujeres preeclámpsicas presentan un diámetro menor de LDL comparadas con el grupo control, y que existe una correlación inversa entre los niveles de TAG y el diámetro de las LDL y concentraciones plasmáticas de triglicéridos, peroxidación lipídica y disfunción endotelial.

Un estudio realizado en 1991 por Lorentzen y colaboradores¹⁶⁵, determinó que las concentraciones de TAG en suero de mujeres preeclámpsicas eran mayores que en el suero de controles sanas. Ellos demostraron su papel en la disfunción endotelial al observar en células endoteliales cultivadas, sometidas al suero de mujeres preeclámpsicas, una menor liberación de prostaciclina, conocido vasodilatador. Por otro lado, Hubel y colaboradores¹⁶⁶, estudiaron las concentraciones de las diferentes variables del perfil lipídico y niveles de malondialdehído (MDA) (un metabolito de la peroxidación lipídica) en mujeres nulíparas con PE y gestantes sanas, encontrando en las primeras un aumento significativo de los niveles de TAG comparado con las segundas y una correlación positiva entre los niveles de TAG y los de malondialdehído, formulando la hipótesis de que esta elevación de TAG es potencial desencadenante de peroxidación lipídica. Estos hallazgos fueron corroborados por Var y colaboradores, y por Cekmen y colaboradores, quienes encontraron niveles significativamente mayores de MDA en preeclámpsicas comparadas con controles ($p = 0,0003$ y $p < 0,001$, respectivamente)^{167, 168}.

Algunos de estos autores han ido más allá en la búsqueda de una explicación fisiopatológica del papel de esta elevación de TAG, existiendo una tendencia elevada a implicar a los TAG como responsables de un proceso similar al que se observa en la enfermedad aterosclerótica¹⁶⁹. Asimismo, han comparado las acciones de esta fracción lipídica con las observadas en la diabetes mellitus y la enfermedad coronaria^{170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177}.

Por otro lado, también existen factores bioquímicos con componente predominantemente inmunológico que han sido encontrados como implicados en la patología de la PE. Entre estos se encuentran:

PCR: La proteína C reactiva ultrasensible, es un reactante de fase aguda, es una globulina clasificada como un miembro de la superfamilia de las pentraxinas con una masa molecular de aproximadamente 118000 daltons compuesta de cinco subunidades polipeptídicas globulares cíclicas idénticas no glicosiladas cada una con un peso de 23 kDa, organizadas simétricamente alrededor de un poro central. La secuencia genómica de la PCR humana está ubicada en el cromosoma 1, la subunidad precursora está compuesta por 206 aminoácidos al igual que una secuencia señal de 18 aminoácidos¹⁷⁸. Las subunidades o promotores de la PCR están asociados por enlaces no covalentes en una configuración anular con una simetría cíclica pentamérica. Cada promotor tiene un “pliegue de lectina” compuestas por dos hojas beta. La cara opuesta del pentamero es la cara efectora, donde el complemento C1q se une a los receptores Fc gamma, una vez se han unido los ligandos, esto conlleva a la activación de la vía clásica del complemento, la unión de C3 (molécula de adhesión principal del sistema de complemento) y el complejo de ataque a la membrana C5-C9. La unión de la PCR también trae consigo la unión del factor H y convertasas de C5¹⁷⁹.

La PCR no solo se une a los residuos de fosfatidilcolina, también se une a una gran variedad de ligandos autólogos y extrínsecos. Los ligandos autólogos corresponden a lipoproteínas plasmáticas, membranas celulares lesionadas, un gran número de fosfolípidos diferentes, ribonucleoproteínas y células apoptóticas. Los ligandos extrínsecos son principalmente los glicanos, fosfolípidos, otros constituyentes de los microorganismos, como la capsula y otros elementos de las bacterias, hongos y parásitos¹⁸⁰. Esta molécula es producida principalmente en el hígado, normalmente está presente como un pequeño constituyente de suero o plasma a niveles menores de 1mg/dL. También es producida por las células de músculo liso de las arterias coronarias en respuesta a estímulos inflamatorios¹⁸¹.

En general puede elevarse en plasma o suero en procesos infecciosos, condiciones inflamatorias como: artritis reumatoide, enfermedad cardiovascular y enfermedad vascular periférica; cuando hay inflamación aguda, infección o injuria de tejido se induce un marcado incremento en la síntesis hepática, que puede elevar los niveles séricos hasta 100 veces o más dentro de las primeras 24-48 horas y mantenerlos elevados durante varios días antes de retornar a lo normal. Lo anterior sugiere la gran contribución que tiene la PCR en la defensa del huésped y en la respuesta inmune innata¹⁸². Aunque su función in vivo durante la inflamación no ha sido precisada, hay considerable evidencia que indica su papel en el reconocimiento y eliminación de patógenos extraños como también de sustancias endógenas potencialmente tóxicas relacionadas con daño tisular. Puede activar la vía clásica del complemento, estimular la fagocitosis y unirse a receptores de

inmunoglobulinas. Se deposita en los sitios en donde existe un proceso inflamatorio, como en la íntima de las arterias en sitios de aterogénesis; también puede ser sintetizada por los macrófagos, inducida por el factor de necrosis tumoral y las interleucinas 1 y 6¹⁸³.

Dicha proteína desde hace varios años se ha utilizado como marcador de inflamación con procedimientos no muy sensibles que han sido útiles en detectar procesos inflamatorios sistémicos que detectan niveles > 10.0 mg/L. Actualmente, mediante un método ultrasensible, ¹⁸⁴ se pueden detectar niveles de PCR requeridos para la predicción del riesgo cardiovascular. ^{185, 186} Con dicho método, la Asociación Americana de Cardiología (AHA) ¹⁸⁷ recomienda la siguiente interpretación: < 1,0 mg/L riesgo bajo; 1,1 a 3,0 mg/L riesgo moderado; 3,1 a 10,0 mg/L riesgo alto.

Los resultados de la PCR dentro de los rangos mencionados, han demostrado sensibilidad y especificidad para detectar eventos vasculares, no sólo en los vasos coronarios, también en la circulación periférica y en el cerebro¹⁸⁸. Su empleo en diferentes protocolos de investigación la ha confirmado como un marcador sensible y específico que permite identificar precozmente individuos con riesgo cardiovascular¹⁸⁹. Numerosos estudios han permitido recaudar la evidencia suficiente para demostrar que los niveles elevados de PCR y otras citoquinas proinflamatorias alteran la función endotelial aumentando el riesgo de hipertensión inducida por el embarazo¹⁹⁰, de Jonge y colaboradores encontraron un OR de 2,78, 95% (CI) 1,66-4,66]¹⁹¹. Igualmente aumentando el riesgo de PE^{192, 193, 194}, constituyéndose en un marcador de riesgo importante que predice concomitantemente la severidad de la enfermedad^{195, 196} con la ventaja adicional que permite ser medido en etapas tempranas del embarazo¹⁹⁷.

Se ha podido determinar que los niveles plasmáticos de PCR se relacionan con otros factores ambientales de riesgo para la PE como la dieta¹⁹⁸, y de forma inversa con los niveles séricos de folato reafirmando la función protectora de este¹⁹⁹. También correlaciona como factor de riesgo con otras condiciones que afectan directamente al feto como bajo peso al nacer²⁰⁰ y posteriores patologías en el neonato^{201, 202}.

En el área Andina se ha estudiado la correlación positiva entre los niveles de PCR y PE, encontrándose una alta significancia sin poder dilucidar si estas concentraciones elevadas son una causa o una consecuencia de la enfermedad²⁰³. En Colombia García y colaboradores diseñaron e implementaron un estudio para dilucidar este interrogante y poder concluir si concentraciones elevadas de marcadores de inflamación y una función endotelial alterada preceden y están

envueltas en el desarrollo de la hipertensión inducida por el embarazo, demostrando que las gestantes que desarrollan esta alteración presentan desde temprano en el embarazo una vasodilatación mediada por flujo alterada, asociada a niveles elevados de PCR e IL-6, alteraciones que se encuentran mucho antes de que se presenten las manifestaciones clínicas. Constituyéndose entonces en un método útil en la detección temprana de riesgo para desarrollar HIE²⁰⁴.

AAF: Entre los hallazgos encontrados en las investigaciones inmunológicas, sobresalen los que relacionan la presencia de anticuerpos antifosfolípidos con la presentación temprana y con graves complicaciones de la enfermedad²⁰⁵. Dos clases de AAF están asociados a un pronóstico adverso de la gestación²⁰⁶. Anticoagulante Lúpico. (AL) por definición constituyen un grupo de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA o Mixtos) las cuales interfieren con una o más de las pruebas de coagulación dependiente de fosfolípidos (TTPa, tiempo de veneno de Russell, TP diluido, etc). A pesar de este alargamiento en las pruebas de coagulación, los pacientes paradójicamente tienen un incremento en el riesgo trombótico tanto venoso como arterial. De hecho el AL constituye una de las principales causas adquiridas del estado trombofílico. La presencia de AL también se ha asociado a abortos recurrentes y trombocitopenia. La presencia de este anticuerpo antifosfolípidos (AL), tiene mayor implicaciones en el riesgo trombótico comparativamente a la presencia de anticuerpos anticardiolipina²⁰⁷.

Se han encontrado anticuerpos antifosfolípidos que interfieren con la inactivación del factor Va por la PCa y reaccionan con el complejo PCa:fosfolípidos o PS:fosfolípidos. También se ha encontrado que lípidos como la fosfatidiletanolamina (FEA) parecen incrementar la actividad de la PCa, por lo que los anticuerpos anti-FEA disminuirían la actividad inhibitoria de la PCa sobre el factor Va. Por lo que los anticuerpos anti-cardiolipina producen interferencia en la regulación antitrombótica de la hemostasia al disminuir la función de la PS y la respuesta del factor Va a la PCa. A este fenómeno se le ha denominado "PCRa adquirida" ²⁰⁸. En un estudio muy completo sobre las enfermedades maternas asociadas a la PE severa temprana, Fields encontró que 27 mujeres preeclámpsicas de 95 (29,4 %) presentaron ACA positiva. ²⁰⁹ Los estudios de Branch²¹⁰, Van Pampus²¹¹, Yasuda²¹² y Kupfermanc²¹³, sugieren relación entre ACA y PE. Mientras que otros autores no han confirmado dicha asociación con suficiente solidez: Faden²¹⁴, Katano²¹⁵, Rajah²¹⁶.

Se propone entonces que la PE es una enfermedad compleja, donde la susceptibilidad genética asociada a una diversa contribución de factores medio

ambientales, determina la generación de una respuesta que conduce a la aparición de hipertensión, proteinuria y edemas, signos del desarrollo de la PE⁸⁷.

Ho: Las concentraciones plasmáticas de HCy, folato, lípidos, PCR, ácido úrico y ACA no se asocian al riesgo de padecer PE

H1: Si existe asociación entre las concentraciones plasmáticas de HCy, folato, lípidos, PCR, ácido úrico, ACA y el riesgo de padecer PE.

II.2. Objetivos

1. Establecer los niveles sanguíneos de lípidos, HCy, folatos, ácido úrico, PCR y ACA en pacientes con diagnóstico de PE y compararlas con un grupo control.
2. Establecer la asociación de los parámetros anteriormente medidos con PE mediante un modelo multifactorial: Análisis de Componentes Principales.

II.3. Metodología

II.3.1 Tipo de estudio

El estudio llevado a cabo es de tipo epidemiológico, en el cual se hizo una selección de muestra en función de las mujeres con PE (casos) y en las mujeres sin PE (controles), ejecutando una serie de análisis estadísticos para comparar estos dos grupos; este tipo de diseño se le denomina estudios de casos y controles. A continuación se definen los grupos de casos y controles.

Definición de caso: Se tomaron como casos las madres gestantes que ingresaron al servicio de Obstetricia del Hospital Universitario del Valle y a quienes se les diagnosticó PE de acuerdo con los criterios internacionales (ver Criterios de Inclusión). Estas pacientes aceptaron voluntariamente participar de la investigación para lo cual firmaron el consentimiento informado.

Criterios de Inclusión: Pacientes embarazadas con una edad gestacional superior a las 20 semanas. Quien presentó tensión arterial mayor a 140/90 y proteinuria en 24 horas mayor a 300mg/L o que al analizarle una muestra espontánea de orina presentaran proteinuria superior a 30mg/dL o proteinuria mayor o igual a una cruz medida con tira reactiva.

Criterios de Exclusión: Embarazo gemelar, hipertensión crónica, anomalías cromosómicas del feto, Antecedentes de PE, aborto recurrente, trombosis venosa profunda, accidentes vasculares y diabetes gestacional

Definición de control: Madres gestante que ingresaron al servicio de Obstetricia del Hospital Universitario del Valle sin presentar signos ni síntomas de padecer enfermedad vascular ni PE. Los controles tuvieron similaridad con los casos en cuanto a sus características socio-demográficas, obstétricas, control prenatal, tipo de servicio de la EPS de las cuales fueron remitidas y antecedentes prenatales, esto, a fin de minimizar las variables de confusión. Las madres además, aceptaron voluntariamente participar de la investigación para lo cual firmaron el correspondiente consentimiento informado.

El presente proyecto de investigación incluyendo sus protocolos fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Acta de Aprobación 003-08) y por el Comité de Ética en Investigaciones del Hospital Universitario del Valle (Acta de Aprobación 15042011). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas éticas según la Declaración de Helsinki de 1975 en la versión revisada de 1983.

II.3.2 Muestreo:

Cálculo de tamaño de muestra

El tipo de muestreo usado fue el muestreo empleado para diseños de estudio de casos y controles, el cual está dado por la siguiente ecuación²¹⁷:

$$n = \frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

p_1 : Frecuencia de la exposición entre los casos (18,3%)

p_2 : Frecuencia de la exposición entre los controles (3%)

$Z_{1-\frac{\alpha}{2}}$: Nivel de confianza del estudio el cual es del 95%

$Z_{1-\beta}$ ∴ Poder estadístico del estudio el cual es del 80%

$$P : \frac{P_1 + P_2}{2}$$

Relación entre casos y controles de 1:1, para lo cual el tamaño de muestra sería de 43 casos y 43 controles para un total de una muestra total de 86.

Previendo las posibles deserciones y ocasionales pérdidas de muestras o de datos se incrementó el tamaño de la muestra a 50 casos y 50 controles.

Tipo de muestreo: Se realizó un muestreo aleatorio simple, el cual se basó en escoger de forma aleatoria a las mujeres embarazadas con PE y sin PE (casos y controles respectivamente) por un lapso de tiempo hasta completar el tamaño muestral deseado teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

Muestras: Las muestras se recolectaron sangrando de vena periférica, 10c.c. en tubo seco para las determinaciones bioquímicas posteriores, y 10c.c. en tubo con citrato de sodio como anticoagulante para la extracción de ADN. Después de separar el coágulo se extrajo el suero por centrifugación, se separó en alícuotas, congelando a -20°C hasta su uso.

A los sueros se les realizó medición de los niveles de HCy y folatos mediante inmunoensayo de fluorescencia polarizada desarrollado por Axis Biochemical ASA de Oslo, Noruega y Bio-Rad Hércules, California, comercializado y distribuido por Abbott Laboratories empleando un analizador inmunoensayo en el equipo IMMULITE de la casa SIEMENS®. El perfil lipídico, las concentraciones de PCR, ácido úrico y anticuerpos antifosfolípidos se midió mediante pruebas químicas de espectrofotometría y se leyeron en un equipo BTS 370 Automatic Plus autoanalyzer de Bio System® (Figura 2).

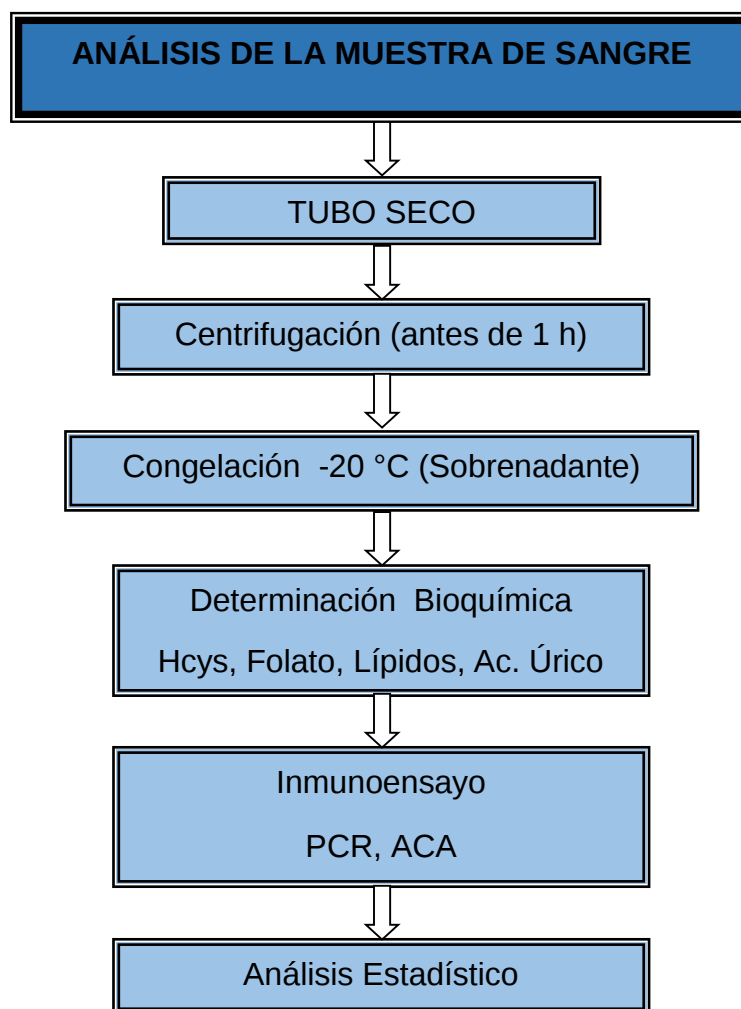


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el análisis de las muestras de sangre.

II.3.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se realizó una plataforma de captura de datos en Epidata 4.1. Se realizó un control de la calidad de estas bases de datos con el fin de detectar posibles errores de digitación o medición de las variables antes mencionadas, posteriormente se transfirieron a la base de datos SPSS version 15 (SPSS Inc, 2005). El análisis estadístico consideró:

Análisis Univariado: La distribución de las variables cuantitativas se evaluó a través de sus respectivas medidas de tendencia central y de variabilidad. Se llevó a cabo un análisis de pruebas de normalidad a través de prueba de Kolmogorov que permitiendo establecer si las distintas variables en estudio tenían una distribución normal, a través del cálculo de la prueba del Chi cuadrado. Además se determinó la diferencia entre el grupo de estudio y el grupo control teniendo en cuenta una significancia estadística menor a 0,05. En las variables cualitativas se llevó a cabo análisis de proporciones, análisis de independencia y tablas de contingencias que establecieron las diferencias significativas entre casos y controles.

Análisis multivariado: Un modelo de regresión logística se llevó a cabo para establecer el grupo de variables que aportan a la variable respuesta (paciente preeclámpsica). Esta regresión se realizó mediante el método de selección de variables (Método backward o forward). Adicionalmente se ejecutó un ACP, utilizado para reducir la dimensionalidad de los datos la cual determina factores subyacentes explicativos tras un conjunto de datos que expliquen la variabilidad de dichos datos²¹⁸.

II.4 Resultados y Discusión

II.4.1 Datos descriptivos de casos y controles

El total de la población fue de 102 mujeres distribuidas en 51 casos (PE) y 51 controles). En los casos el promedio de edad fue $21,71 \pm 0,75$ años y en los controles de $18,65 \pm 2,96$ años sin diferencias estadísticas. El número de embarazos incluyendo el actual para los casos fue de $1,2 \pm 0,75$ y para los controles de $1,0 \pm 0$ sin diferencia estadísticamente significativa. La edad gestacional para los casos fue de $36,75 \pm 3,4$ semanas y para los controles fue de $39,04 \pm 1,13$ con diferencia estadísticamente significativa (Prueba Kolmogorov; $p < 0,005$). En cuanto a los neonatos, se encontró un peso al nacer para los hijos de los casos de $2'676,565 \pm 782,88$ g, y para los hijos de los controles de $3'175,67 \pm 359,79$ g, con diferencia estadísticamente significativa. (Prueba Kolmogorov; $p < 0,005$). La talla al nacer fue de $47,7 \pm 5,69$ cm para los casos y de $50,78 \pm 2,22$ cm para los controles con diferencia estadísticamente significativa (Prueba Kolmogorov; $p < 0,005$). El test de Apgar presentó como resultado $8,43 \pm 1,04$ para los casos y $8,86 \pm 0,53$ para los controles sin significancia estadística (Test de Apgar; $p > 0,005$). Los resultados obtenidos confirmaron otros estudios previos que reportaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad gestación, peso del neonato al nacer, talla al nacer.

II.4.2 Evaluación de los parámetros bioquímicos

Un resumen de lo obtenido con respecto a los componentes bioquímicos analizados, discriminando para casos y controles se consigna en la Tabla 1. En esta se presentan los valores de las medias y sus desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de diferentes metabolitos que fueron analizados en este trabajo. En los niveles plasmáticos de Colesterol, HDL, LDL, TG, Folatos y HCy, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 3). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas para las concentraciones plasmáticas de ácido úrico, PCR y ACA (Figura 4). Estos resultados permiten postular que en la muestra analizada, las PE presentaban un cuadro clínico de inflamación como evento desencadenante de una alteración metabólica, particularmente con relación al ácido úrico que por ser un metabolito de las rutas metabólicas finales de las purinas, puede conllevar a la formación de uratos lo que a su vez potencialmente pueden inducir daño endotelial y daño renal. Este hecho puede ser la base para explicar el inicio del proceso de inflamación a nivel del endotelio y la proteinuria por daño renal, factores que potencialmente inducirían la hipertensión arterial.

Tabla 1. Medias, desviación estándar y significancia estadística de las variables bioquímicas determinadas.

Parámetro bioquímico	Preclámpicas	Controles
Colesterol Total	242,14±46,44	232,96±29,88
HDL	52,41±6,27	54,43±7,35
LDL	170,76±28,41	165,08±18,33
TG	261,14±30,30	254,86±20,12
Folatos	7,61±1,87	8,24±2,27
HCy	5.59±1.63	4.98±1.54
Acido urico*	5.14±1.09	3.89±0.76
PCR*	4.51±1.33	2.35±0.60
ACA*	18.05±5.00	11.25±3.46

(*). Estadísticamente significativa.

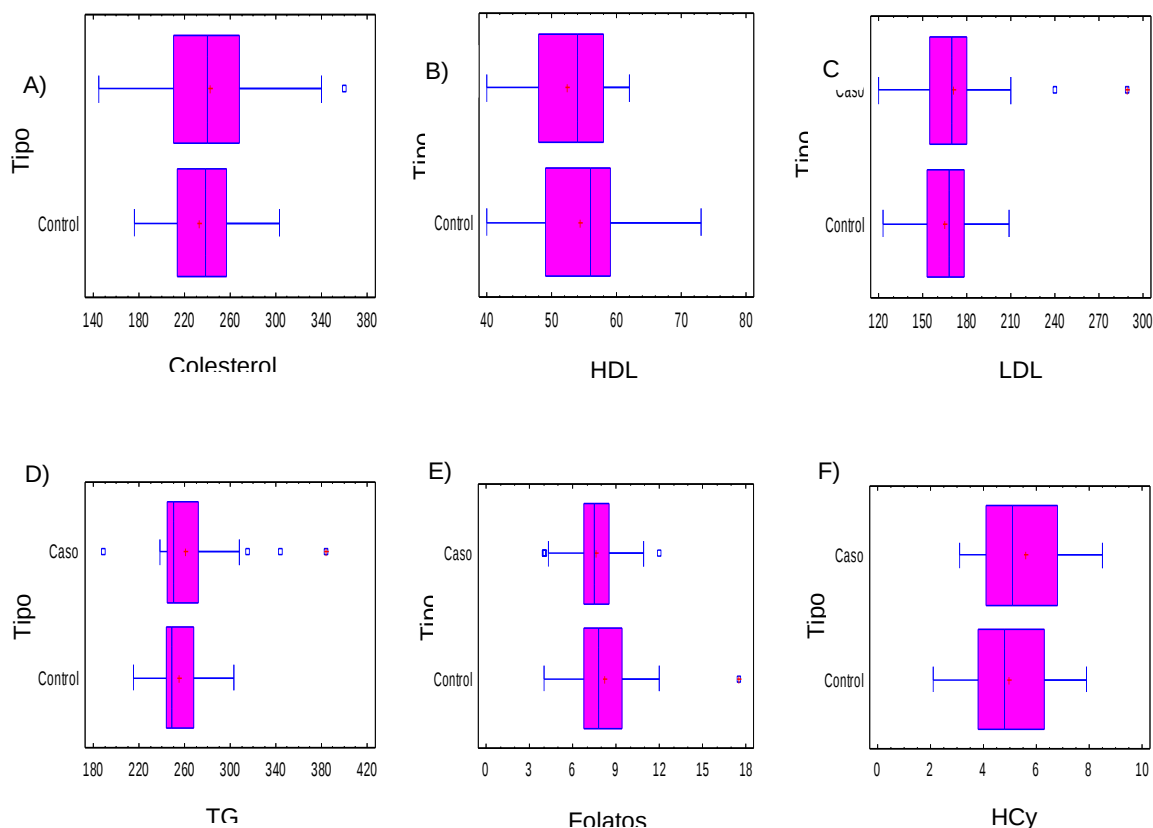


Figura 3. Concentraciones plasmáticas de A) colesterol total, B) HDL, C) LDL, D) TG, E) Folatos y F) HCy, metabolitos que no presentaron diferencia estadística al comparar los casos de PE con el grupo de mujeres control.

Con base en lo que se describió anteriormente, las concentraciones plasmáticas de ácido úrico, PCR y ACA, a diferencia de las otras variables bioquímicas medidas, si mostraron diferencias significativas entre los casos y controles (Figura 4). En este sentido, las concentraciones elevadas de ácido úrico no solamente se constituirían en un marcador de riesgo para la PE, sino que por sus efectos en el metabolismo, podría ser considerado un marcador precoz de riesgo de la enfermedad, semejante a lo previamente demostrado para la PCR ²¹⁹.

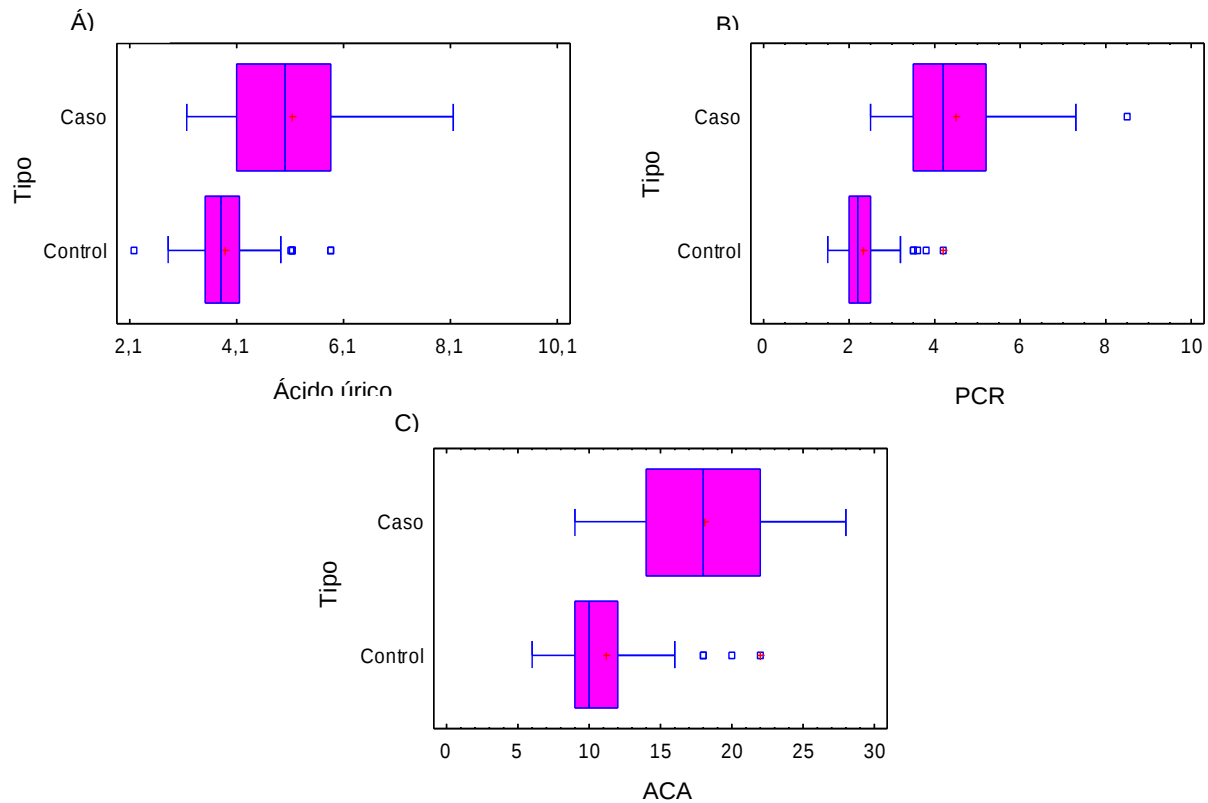


Figura 4. Concentraciones plasmáticas de A) Ácido úrico, B) PCR, y C) ACA, componentes que sí presentaron diferencia estadística al comparar controles y casos.

II.4.3 Análisis de Componentes Principales

El ACP permitió reducir nueve variables colineales a tres componentes principales que explicaban el 66,41% de la varianza total acumulada en los datos originales de acuerdo con la prueba de esfericidad de Bartlett (Tabla 2). Esta asociación se muestra gráficamente en el biplot que agrupó los dos primeros componentes del análisis (figura 5).

Tabla 2. Tabla de pesos de los componentes en el ACP. En rojo se señala el mayor peso por cada variable, destacando así, a qué componente pertenecen.

Parametro bioquímico	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Colesterol	0,31	0,48	0,12
HDL	-0,03	0,43	-0,12
LDL	0,34	0,42	-0,03
TG	0,28	0,42	-0,19
Folatos	-0,31	0,22	0,58
HCy	0,32	-0,24	-0,56
Ac. Úrico	0,35	-0,23	0,24
PCR	0,45	-0,23	0,28
ACA	0,43	-0,15	0,38

El primero de los componentes, cuyo porcentaje de varianza explicó aproximadamente un 32% del total, fue el clasificado como involucrado en procesos inflamatorios e inmunes. Estaba compuesto por las variables HCy, ácido úrico, PCR y ACA (Tabla 3), que como se había planteado anteriormente, están directamente involucradas en la etiología de la enfermedad²²⁰. El factor inmunológico ha sido referenciado ampliamente como uno de los principales hallazgos en la etiología de la enfermedad, el cual al activarse induciría procesos inflamatorios generalizados y particularmente la inflamación endotelial que desencadena la activación de la cascada del óxido nítrico y la generación de una serie de mensajeros proinflamatorios entre los que se incluyen la interleucina 4, interleucina 6, interferón y otros marcadores de inflamación, lo que a su vez contribuye al establecimiento de la hipertensión arterial^{221, 222}.

El segundo componente claramente definido, cuyo porcentaje de varianza explicó aproximadamente el 20% del total, correspondió a metabolitos lipídicos como el colesterol, LDL, TG y HDL (Tabla 3), los cuales también poseen una interrelación directa con el metabolismo del endotelio y el mantenimiento de su homeostasis, además de su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno potencialmente nocivas para el endotelio y que generar un desbalance en la regulación del metabolismo lipídico, conllevando a aterosclerosis, daño endotelial, e hipertensión arterial. Estas variables metabólicas, interactúan con los marcadores proinflamatorios mencionados anteriormente, lo cual demuestra la naturaleza multifactorial de la generación de la PE.

Tabla 3. Funciones de cada componente principal según valor dado por el ACP.

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
	HCy Ac. Úrico PCR ACA	Colesterol HDL LDL TG	Folatos
Funciones asociadas a cada componente	Procesos de inflamación e inmunes	Metabolismo lipidico	Metabolismo dieta y epigenética

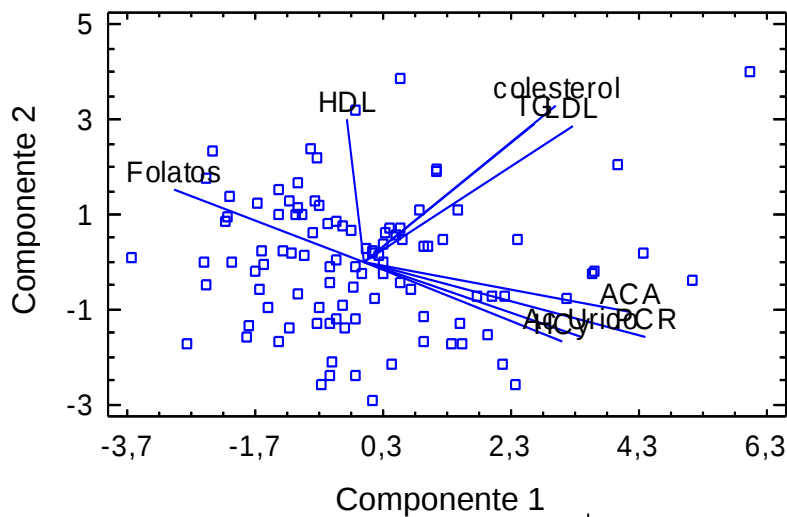


Figura 5. Biplot Bidimensional ACP

En el tercer componente, cuyo porcentaje de varianza explicó aproximadamente el 13% del total, fue conformado por la concentración plasmática de folatos, metabolito ampliamente analizado en múltiples estudios de asociación en donde lo relacionan como factor de riesgo no solo para la PE, sino también para otras anomalías como las aneuploidías, los defectos del cierre del tubo neural, cardiopatías congénitas, labio hendido entre otros. Cambios en el ciclo del folato pueden resultar, entre otras, en complicaciones del embarazo como abortos y PE²²³. El metabolismo normal de folatos tiene un rol crucial en la homeóstasis del cuerpo, ya que regula cambios en aminoácidos como la HCy y metionina, la síntesis de purinas y pirimidinas, y la metilación del ADN; éste ultimo, dada la capacidad de los folatos para transportar grupos metilo. Los procesos de metilación, permiten involucrar en la etiología de la Preclampsia, no solo factores metabólicos, sino también procesos epigenéticos

asociados a una potencial remarcación por impronta en genes codificantes para una serie de proteínas claves en los procesos metabólicos involucrados en la homeostasis endotelial. Además, estos, regularían la expresión genica y la actividad de genes específicos en diversos tejidos incluyendo el trofoblasto y el sincitiotrofoblasto indispensables para los procesos angiogénicos y de placentación. Este resultado refuerza la recomendación que se hace a mujeres en embarazo, para el consumo de ácido fólico²²⁴.

Recientemente se ha analizado más detalladamente la contribución de modificaciones epigenéticas en el desarrollo de PE²²⁵. La placenta, situada en la interface entre madre y feto, está expuesta a una variedad de cambios ambientales, incluyendo fumar, deficiencias nutricionales, excesos en la dieta, entre otros, haciendo biológicamente probables algunas alteraciones a nivel de metilación del ADN²²⁶. Numerosos artículos han sugerido la relación de esta marca epigenética con PE^{227, 228} y recientemente una ayuda para estas investigaciones surgió con la publicación del metiloma de placenta humana por Schroeder y colaboradores²²⁹. Uno de los trabajos más actuales es el realizado por Anton y colaboradores²³⁰ en el que revelaron una metilación diferencial en genes de muestras de placentas preeclámpsica prematuras y control, agrupados en grupos funcionales de adhesión celular –CDH11, COL5A1, NCAM1 y TNF-, lo que podría según los autores, explicar la migración e invasión alterada de las células del trofoblasto. De estos genes, CDH11 tuvo la alteración más alta, con un incremento del 18,3% en placenta preeclámpsica comparada con el control; a este gen se le ha atribuido un rol en la fijación de trofoblastos a la decidua materna. Otro de los trabajos actuales, relevantes en este campo, es el de Yuen y colaboradores²³¹ en el que sugieren que la hipoxia característica de PE altera el perfil epigenético de las células del trofoblasto. Ellos proponen que la expresión del factor de transcripción AP-1 es desencadenado por la hipoxia y que esto puede a su vez interactuar con ADN metiltransferasas para marcar sitios específicos de metilación en el genoma, o que la metilación del ADN ocurre como consecuencia a la desacetilación de histonas, suprimiendo la expresión de genes asociados responsables de la diferenciación sincitiotrofoblástica.

III. CAPÍTULO

GENÓMICA DE LA PREECLAMPSIA

III.1 Introducción

Uno de los aspectos más importantes PE es precisamente su condición compleja, esto es lo que más dificulta encontrar una causa exacta ya que hay muchos factores que intervienen en su desarrollo. En consecuencia, su estudio ha sido y sigue siendo abordado desde diferentes campos, pasando de la genética clásica a las ciencias ómicas. Es por esto que en los últimos años el estudio de esta enfermedad se ha enfocado en identificar biomarcadores que ayuden a su diagnóstico clínico temprano, puesto que esta es una enfermedad silenciosa en un principio y sólo se manifiestan los síntomas cuando el embarazo se encuentra en una etapa avanzada. El estudio de las moléculas que forman el “genoma funcional” se ha ido incrementando fuertemente a lo largo de la era post-genómica mediante la expansión de las tecnologías ómicas. Entre éstas, las tecnologías proteómicas y la espectrometría de masas en particular, forman una estrategia bien armada hacia análisis de alto rendimiento que pueden ofrecer nuevas perspectivas en el entendimiento de patofisiologías, así como también, en el desarrollo de terapias moleculares para su tratamiento¹². En consecuencia, una amplia gama de estudios han optado por investigar una enfermedad compleja como lo es la PE a nivel proteómico^{13, 14, 15, 16, 17}. Uno de éstos es el realizado por Epiney y colaboradores¹⁸, quienes identificaron las proteínas secretadas por células del citotrofoblasto de un grupo preeclámpsico y uno control, logrando concluir que la disminución del factor XIII -cadena A- podría estar asociado al desarrollo de PE. Otro de los estudios enfocados en encontrar patrones diferenciales a nivel proteómico, es el de Feng y colaboradores¹⁹, en el que se encontró que la proteína alfa-1-antitripsina se encuentra subregulada en mujeres con PE. En el 2011 Zhang y colaboradores²⁰ analizaron *nitroso*-proteomas de placentas humanas normotensas y preeclámpsicas, señalando la alteración significativa que presenta el *nitroso*-proteoma de placentas preeclámpsicas en comparación con placentas control y sugiriendo su rol esencial en la patofisiología de la PE.

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales objetivos de las investigaciones en este campo es establecer marcadores para diagnóstico clínico temprano. En este sentido, los trabajos de Carty y colaboradores²³², en el que se analizó el proteoma urinario de mujeres con PE y normotensas, obtuvieron 10

biomarcadores para la semana 28 de embarazo. Por otro lado, también se han detectado cambios en el proteoma de suero humano al comparar mujeres preeclámpsicas con controles como lo concluyen Liu y colaboradores²³³, quienes encontraron una expresión diferencial de 51 proteínas, 20 sub-reguladas y 31 sobre-reguladas, donde la hormona CSH fue una de las mayormente expresadas en muestras preeclámpsicas, sugiriendo su potencial biomarcador para diagnóstico de PE. Esta es una hormona que normalmente se encuentra en baja abundancia secretada por el sincitiotrofoblasto de placenta humana, éste se eleva en el suero materno en relación con el crecimiento del feto y la placenta; CSH según ha sido reportado, tiene actividad lipolítica, lo que podría explicar el efecto adverso de ácidos grasos libres en la circulación materna de mujeres con PE, ya que éste como se mencionó anteriormente, se encontró en altos niveles en muestras preeclámpsicas. Además, las apolipoproteínas, que están implicadas en el metabolismo de lípidos, también se vieron diferencialmente expresadas, sugiriendo su relación con la enfermedad y siendo consistente con estudios previos. En cuanto a los procesos biológicos predominantes de estas proteínas identificadas, se encontró que 17 de ellas estaban relacionadas con el proceso de coagulación y 15 con fase aguda de respuesta, sugiriendo un rol importante en el desarrollo de PE.

Una de las hipótesis que va tomando fuerza en el estudio de la etiología de esta enfermedad es la que sugiere un defecto a nivel mitocondrial subyacente al deterioro de la diferenciación e invasión del trofoblasto hacia la decidua materna, conllevando al desarrollo de PE. Shi y colaboradores²³⁴ encontraron en su estudio proteómico de mitocondrias 26 proteínas expresadas diferencialmente al comparar placentas de mujeres normotensas y preeclámpsicas. La mayoría de estas proteínas se encontraron relacionadas con procesos biológicos tales como la apoptosis, estrés oxidativo, generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), oxidación de ácidos grasos, daño mitocondrial y el ciclo del ácido tricarboxílico.

Avances en la relación entre variantes naturales del genoma y PE también han sido probados en diversos estudios. Entre los más recientes, se encuentran los realizados por Mrozikiewicz y colaboradores²³⁵ y Wang y colaboradores²³⁶, en los que se evaluó la asociación entre polimorfismos en ciertos genes y la PE, en poblaciones caucásicas y chinas respectivamente. En estos estudios se sugiere una relación del polimorfismo rs482843 con el genotipo mutado GG, podría generar predisposición a PE en poblaciones caucásicas, mientras que en poblaciones chinas se ha encontrado su relación con los polimorfismos rs1143627 y rs16944 del gen IL-1 β .

III.2 Objetivos

1. Identificar aquellos genes expresados en placenta que están asociados con PE.
2. Análisis de genes expresados en placenta preeclámpsica, mediante la construcción de una red de expresión genética.
3. Caracterizar la cromatina asociada tanto codificante como no codificante de los genes asociados con PE.
4. Determinar los procesos biológicos en los que participan estos genes y establecer si están asociados a la etiología de la PE.

III.3 Metodología

III.3.1 Minería de datos

Se seleccionaron 7 artículos que reportaban la expresión de genes en placenta y en PE a partir de la base de datos PubMed del NCBI, publicados hasta el 2011. De éstos se escogieron los genes diferencialmente expresados, que tenían en común dos o más artículos. De estos se promedió el valor de z-score y el Fold change para cada gen reportado.

Para realizar la búsqueda y análisis descritos a continuación, se utilizaron diferentes las bases de datos consignadas en la tabla 4. De la base de datos GeneEntrez del NCBI se obtuvo información de: Resumen, contexto genómico, interacciones y ontología del gen. De manera similar se empleó la base de datos Nucleotide, para obtener, en formato FASTA, las secuencias del ARNm de cada uno de los genes. Éstas fueron sometidas al programa BLAT de UCSC Genome Bioinformatics, con el fin de recopilar información sobre tamaño de los genes, número de exones y la información sobre el modelo del gen (Tabla 5). Adicionalmente, se hizo una exploración genómica, en una ventana de 100Kpb, de las características de la cromatina de cada uno de los genes seleccionados usando el programa BLAST del NCBI. Los datos obtenidos sobre familias y clases de los elementos repetidos (ER) fueron organizados en tablas dinámicas para su posterior análisis.

Tabla 4. Bases de datos empleadas para la minería de datos ejecutada en este trabajo.

Bases de datos	Dirección electrónica
National Center for Biotechnology Information NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Gene - Genes and mapped phenotypes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/
BioGPS (Gene LinkOut)	http://biogps.gnf.org/#goto=welcome
Nucleotide - Alphabet of Life	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/
Nucleotide BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/
BLAT Search Genome	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
GeneMANIA	http://www.genemania.org
STRING 9.1	http://string-db.org/
BioGRID	http://thebiogrid.org/
PINA2	http://cbg.garvan.unsw.edu.au/pina/
Map Viewer NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
GEO NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

Tabla 5. Variables genómicas empleadas en el análisis bioinformático.

Variable	Descripción	Tipo
Locus	Posición del gen en el cromosoma.	Cualitativa
Número de genes en 100 Kpb	Número de genes que han sido anotados en los <i>contigs</i> genómicos. Incluye genes conocidos y putativos, ubicados como resultado de alineamientos de ARNm con los <i>contigs</i> .	Cuantitativa
Tamaño del gen	Longitud del gen en pares de bases (pb) o Kilopares de bases (Kpb).	Cuantitativa
Número de exones codificantes	Número de exones codificantes.	Cuantitativa
Dinucleótidos CpG	Regiones de alto contenido de G + C en la secuencia analizada.	Cuantitativa
Elementos repetidos	Número de elementos repetitivos en la secuencia analizada.	Cuantitativa

III.3.2 Análisis Bioinformático

Se efectuó un análisis bioinformático usando los diferentes recursos del NCBI y del Genome Browser de la UCSC, consignando la información obtenida en tablas dinámicas de Microsoft™ Excel 2010 y posteriormente haciendo las respectivas gráficas. Para corroborar que los genes seleccionados se expresaban en la placenta, se consultó, el “Gene LinkOut”, además del portal BioGPS^{237, 238}.

Caracterización cromatínica: Se promediaron los valores de las variables asociadas a la cromatina codificante: Tamaño del gen, número de exones codificantes, número de genes en 100Kpb y número de dinucleótidos CpG en 100Kpb, para los 16 genes asociados y para los genes control. Para cada familia de elementos repetidos, se sumó el número registrado en los 100Kpb que rodeaban cada uno de los genes, con lo que se obtuvo el número total de integrantes de cada familia para genes asociados y para genes control.

Es importante resaltar que para realizar el paseo cromosómico y la red de interacción protéica, se tomaron los 16 genes asociados a PE mencionados anteriormente, y además se agregaron 12 genes, escogidos de la misma forma y bajo los mismos criterios, pero teniendo en cuenta los artículos publicados de 2011 a 2014, con el fin de actualizar la información. Estos genes fueron: NDRG1, SPAG4, JAG1, TREM1, HTRA4, CRH, HTRA1, PVRL4, KRT19, SLCO2A1, RDH13 y SH3PXD2A.

Paseo Cromosómico: Se colectó información característica de cada gen, como su número de exones totales, número de dinucleótidos CpG y ubicación en cromosoma, a partir de la plataforma del Genome Browser de la UCSC. Además, se realizó un paseo cromosómico en ventanas de 10Kpb rodeando cada gen hasta completar 100Kpb tanto upstream como downstream. Se extrajeron datos del número de secuencias repetidas y genes presentes en cada región utilizando el Map Viewer del NCBI. Toda esta información fue organizada en tablas dinámicas y gráficas en Microsoft™ Excel 2010 para su posterior análisis.

Construcción de la red de interacción protéica: Para la construcción de la red de expresión de genes se utilizó el programa Cytoscape 3.2²³⁹. En primer lugar, se construyó una matriz de datos base, en la cual se organizaron datos de interacción de cada uno de los genes a evaluar; estas interacciones fueron colectadas de las bases de datos PINA2, BioGRID, GeneMANIA y STRING 9.1. Posteriormente, a la red formada con estas interacciones, se le adicionaron los valores de expresión para placenta preeclámpsica. Estos valores de PE se extrajeron de la base de datos Gene Expression Omnibus GEO, específicamente del estudio realizado por Xiang y

colaboradores (2013)²⁴⁰, donde se utilizó un microarreglo NimbleGen Homo sapiens la version hg18del genoma para obtener perfiles de expresión de genes de placentas preeclámpsicas (GSE43942).

Los datos de expresión tejido específica obtenidos con este recurso fueron estandarizados, obteniendo un Z-score para cada gen aplicando la siguiente fórmula (μ Promedio, σ Desviación estándar):

$$Z - score = \frac{(Intensidad\ expresión\ del\ gen\ en\ tejido - \mu\ intensidad\ de\ todos\ los\ genes\ en\ tejido)}{\sigma\ de\ expresión\ de\ todos\ los\ genes\ en\ tejido}$$

Información sobre la ontología del gen –categorías GO- de procesos biológicos estadísticamente destacados para los genes asociados fueron extraídas de la red utilizando el plugin BiNGO. Así mismo, los datos topológicos de la red fueron recopilados de la red utilizando la aplicación del mismo, Network Analyzer.

III.3.3 Análisis estadístico

El software empleado para el análisis estadístico fue STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.02. Los valores de Z-score obtenidos para la expresión de los 31 genes (no se obtuvo información del gen control VPS29 en BioGPS) en placenta, fueron sometidos a un Análisis de Conglomerados utilizando como medida el cuadrado de la media euclidiana. Para determinar si había diferencias en la cromatina que contiene los elementos no codificantes de los genes asociados, comparados con genes control, lo mismo para la cromatina codificante asociada a los genes, se usó la Prueba Kruskal-Wallis y Friedman, para determinar diferencias significativas entre las medianas de las muestras.

En cuanto al paseo cromosómico, se sumó el número de integrantes registrados correspondientes a las secuencias SINE, LINE, Alu y MIR en 100Kpb a los lados de cada gen asociado, en intervalos de 10Kpb. Estos datos de la cromatina asociada no codificante upstream y downstream de cada gen, fueron comparados con una prueba t-student utilizando el programa Statistica 8.0²⁴¹. Los datos también fueron graficados en un diagrama de barras en el software Microsoft™ Excel 2010. También se realizó un diagrama de barras con el número de interacciones encontradas para cada gen asociado.

III.4 Resultados y discusión

III.4.1 Minería de datos

Las placentas estudiadas correspondieron a mujeres en tercer trimestre, así que las rutas que aparecen reguladas en este estudio representan el último punto de lo que presumiblemente es una cascada de eventos, que se dan a lo largo de la gestación²⁴².

Son pocos los genes asociados a PE que tienen en común los diversos estudios que se han hecho sobre el tema, comparados con el número de genes diferencialmente expresados en cada uno de ellos. Tal discrepancia se puede deber ya sea a las técnicas empleadas (extracción de ARNm, plataformas de microarreglos), a la representación de genes en las sondas, variabilidad experimental, o al análisis de datos. Además, los resultados de una sola medición de expresión génica pueden no describir el panorama completo, al depender de la vida media del ARNm, de su tasa de iniciación y degradación, estabilidad, y demás factores²⁴³. Ahora bien, tienen en común las funciones de clúster de genes diferencialmente expresados en la placenta preeclámpsica. Otro obstáculo de los estudios de expresión génica es que las diferencias observadas pueden ser resultado de la consecuencia más no de la causa de la enfermedad. Sin embargo este estudio tiene varias fortalezas, ofrece una amplia población al incluir varios estudios previamente realizados; la interpretación de los resultados de experimentos de micromatrices de ADN permite un acercamiento objetivo, y al emplear los recursos de algunas de las bases de datos más completas disponibles, se estudiaron más detalladamente las características estructurales y funcionales de cromatina asociada a los genes.

Precisamente, en dichas bases de datos, se encontraron siete artículos científicos que trataban sobre perfiles de expresión de genes (con micromatrices de ADN en muestras de Placenta) en mujeres con PE (Tabla 6). De éstos se seleccionaron 16 genes diferencialmente expresados, que tenían en común dos o más artículos. En el anexo 1 se encuentra el p-value y fold change encontrado en cada artículo (los genes están listados en el orden en el que fueron seleccionados), la distribución del Fold change promedio se puede ver en la anexo 2.

Tabla 6. Número de artículos científicos encontrados en PubMed con cada filtro.

Palabra clave	PE	+ Expression profiling	+ Microarrays	+ Placenta	Valores expresados en Fold change o P-valor
Número de resultados	25.733	76	17	15	7

La información general de cada uno de los 16 genes seleccionados tanto asociados como contro, aportada por la base de datos Reference Sequence (RefSeq) y PubMed del NCBI, está organizada en los anexos 3 y 4. Todos estos genes codifican para proteínas y están ubicados en diferentes cromosomas, con excepción de dos parejas de genes que están ubicados en un mismo cromosoma.

Los datos descriptivos de cada gen, incluyendo la información de los 12 genes asociados a PE adicionados al estudio para la construcción de la red y el paseo cromosómico, actualizados a 2014, se encuentra consignada en los anexos 5 y 5.1

III.4.2 Expresión diferencial de genes seleccionados

Al organizar los valores z score de cada uno de los genes estudiados y compararlos con el fold change promedio (Figura 6) se determinó que aquellos con mayor z-score en placenta, se expresaron diferencialmente en mujeres con PE (Figura 7). Cabe aclarar que al hablar de 16 genes asociados, se refiere a los obtenidos en revisión bibliográfica hasta 2011.

Los mecanismos regulatorios comunes pueden ser responsables de la expresión diferencial de genes con funciones relacionadas. Por ejemplo, el incremento en la expresión de genes que participan en angiogénesis (genes FLT1, LEP) puede darse como respuesta adaptativa a una oxigenación reducida luego de la placentación anormal²⁴³. Algunas vías regulatorias relacionadas con PE incluyen MAPK1/ERK2 (en la que ST5 actúa como quinasa, tabla 5) y rutas de señalización (con la participación de ENG, FSTL3, INHA, INHBA, LEP, tabla 5). Según Nishizawa y colaboradores²⁴⁴ la dislipidemia se asocia generalmente con PE; los genes asociados involucrados en el metabolismo de carbohidratos son HEXB, LEP y CA10. La respuesta inflamatoria incrementada y una mal adaptación inmune se asociaron con los genes BCL6, HEXB, INHA, LEP, PROCR que pueden actuar de dos maneras en la aparición de la enfermedad. Primero, en conjunto con la predisposición genética e influyen en la placentación deficiente. Y segundo, promoviendo la disfunción endotelial²⁴⁵.

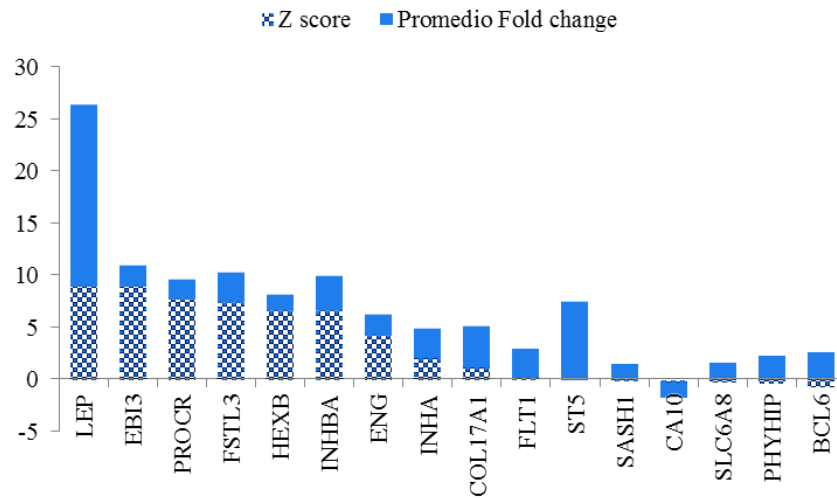


Figura 6. Distribución de los valores de Z-score y Fold change promedio para los 16 genes asociados. Se encuentran organizados según el Z score. CA10 fue el único *downregulated*.

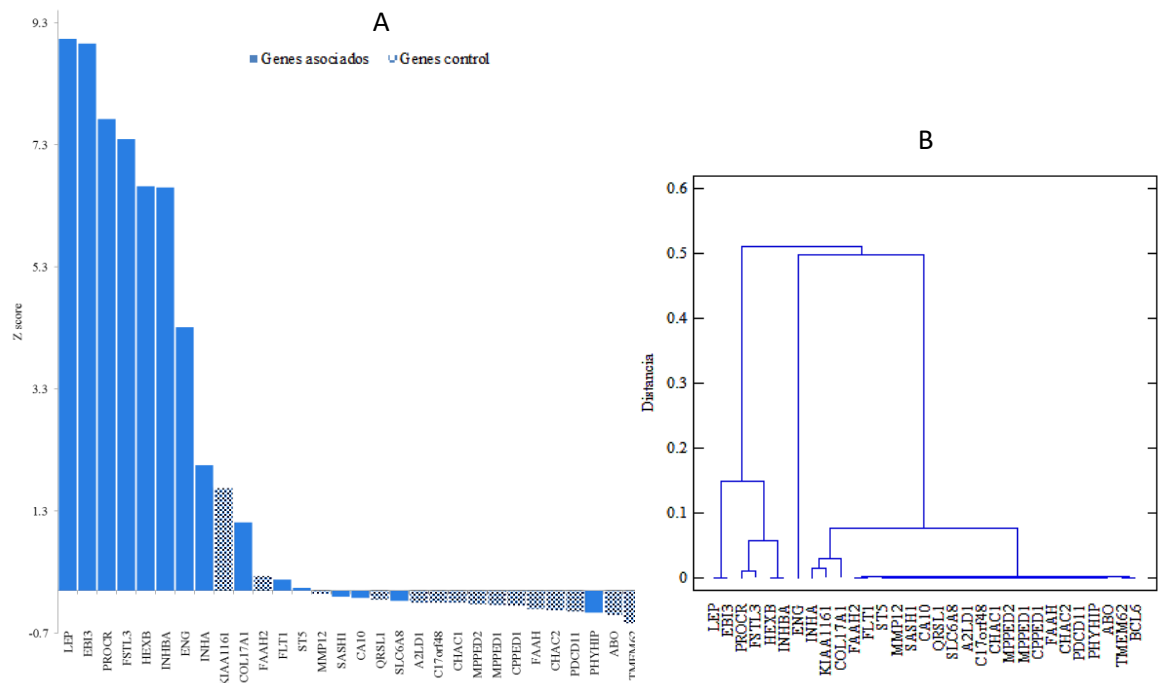


Figura 7. Expresión diferencial de genes en placenta de embarazadas preeclámpsicas. A). Distribución de los valores de Z-score de genes asociados y

controles. B). El dendrograma del Análisis de Conglomerados que muestra uno solo, con subgrupos en los que se destacan, por su elevada intensidad de expresión correlacionada con PE, los genes asociados LEP, EBI3, PROCR, FSTL3, HEXB, INHBA, ENG, INHA y COL17A1.

Uno de los resultados más destacados es que el gen de la leptina (LEP) fue el de mayor z-score en placenta y se perfila como uno de los candidatos más influyentes en la patogénesis de la enfermedad. Según Henson & Castracane²⁴⁶ se han encontrado niveles elevados de leptina (hiperleptinemia) en madre y feto, asociados con PE. Se ha demostrado que la transcripción de LEP durante el embarazo se da principalmente en el trofoblasto endocrinológicamente activo, y modula la función endocrina de la placenta al activar la liberación de citoquinas proinflamatorias. En ratones se ha demostrado que la leptina promueve *in vitro* la invasión del trofoblasto. Además, este polipéptido aumenta la síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular en células del citotrofoblasto cultivadas. Interrupciones en la señalización de LEP pueden inhibir la vía JAK/STAT. Evidencia preliminar sugiere que la hiperleptinemia podría ser una respuesta en compensación a una placenta poco perfundida, para incrementar la entrega de nutrientes.

III.4.3 Caracterización de la cromatina asociada

No se encontraron diferencias significativas en la cromatina codificante asociada a los 16 genes expresados en PE con relación a aquella de los genes control (Prueba de Kruskal-Wallis, $P= 0,0804127$) (Estadístico = 6,74699) (Figura 8, A). Sin embargo en la cromatina de las familias de elementos repetidos CR1, L1, ERV y RTE, si se encontraron diferencias entre la asociada a PE y la de los controles (Prueba de Kruskal-Wallis, $P= 0.0341824$) (Estadístico = 16.6316) (Figura 8, B).

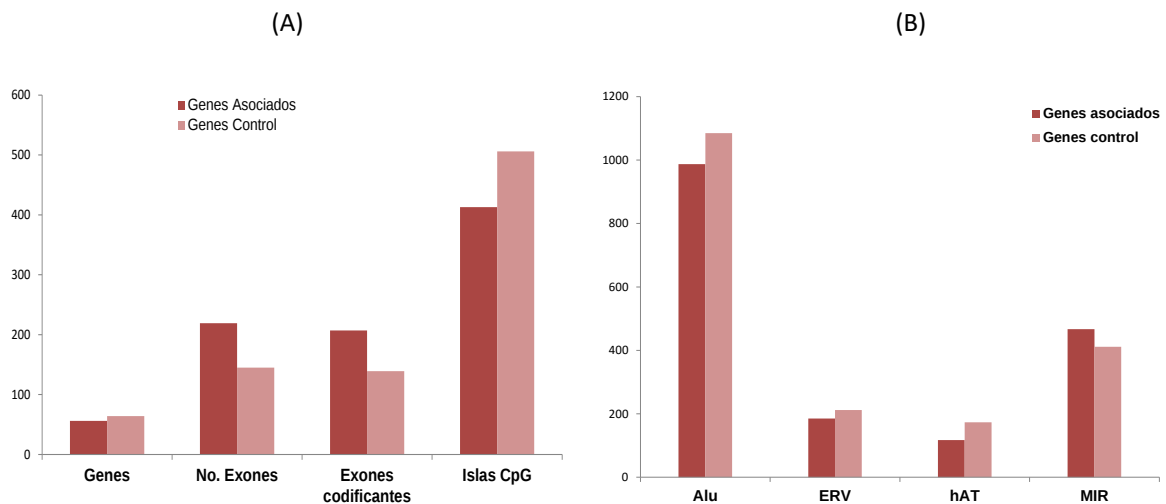


Figura 8. Comparación, entre los genes asociados y los controles, de las diferentes variables genómicas analizadas. A) Variables asociadas a la cromatina codificante. B) Variables asociadas a la cromatina no codificante que incluyó las familias de ER CR1, L1, ERV y RTE.

De acuerdo con estos resultados, la expresión diferencial de los genes podría relacionarse con la región no codificante de su cromatina asociada, particularmente con las familias de repeticiones CR1, L1, ERV y RTE. Se ha reportado que las inserciones de elementos LINES (L1, CR1 y RTE) pueden alterar funciones genéticas porque tienen secuencias funcionales, tales como promotores transcripcionales, señales poliadenilación, donantes y aceptores de *splicing* del ARN, y sitios de adhesión a la matriz nuclear (en humanos sólo L1 es activo)²⁴⁷. Los efectos de L1 en la composición del genoma y la expresión génica son numerosos. Además de sus implicaciones en enfermedades genéticas y en tumorigénesis, también es responsable de la movilización de retrotransposones no autónomos, entre los que se incluyen los elementos Alu, y de la generación de pseudogenes²⁴⁸.

El número de familias por gen, encontradas en la región de 100Kpb alrededor, se presenta en la Figura 9. Se determinó que los genes asociados no mostraron diferencias en el número de familias; sin embargo en los controles las familias CPPED1 y MPPED2 son los más diversos en cuanto a esta variable.

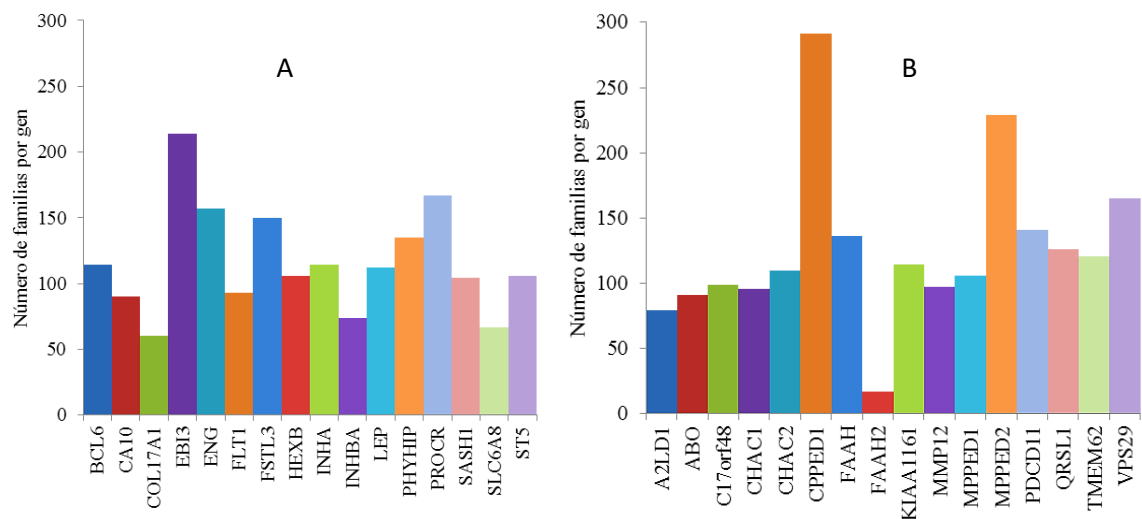


Figura 9. Distribución del número de familias por cada gen A) asociado y B) control.

La distribución del número de genes por cada familia (Anexo 7), el número de clases por gen (Anexo 8), la distribución del número de genes por cada clase (Anexo 9), y el número de integrantes de cada clase en los 16 genes asociados y control (Anexo 10), también fueron graficados.

III.4.4 Paseo cromosómico

En cuanto a la cromatina no codificante asociada a los genes evaluados, se encontró dominancia a ambos lados de cada gen de las secuencias SINE, LINE, Alu y MIR, si embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el número de éstas al comparar las zonas 100Kpb upstream y downstream (Figura 10). Esto se confirmó con una prueba t-student ($p > 0,01$). Cabe resaltar que a partir del paseo cromosómico, y en adelante, se trabajaron además de los 16 genes colectados a 2011, los 12 genes obtenidos de la revisión bibliográfica actualizada a 2014.

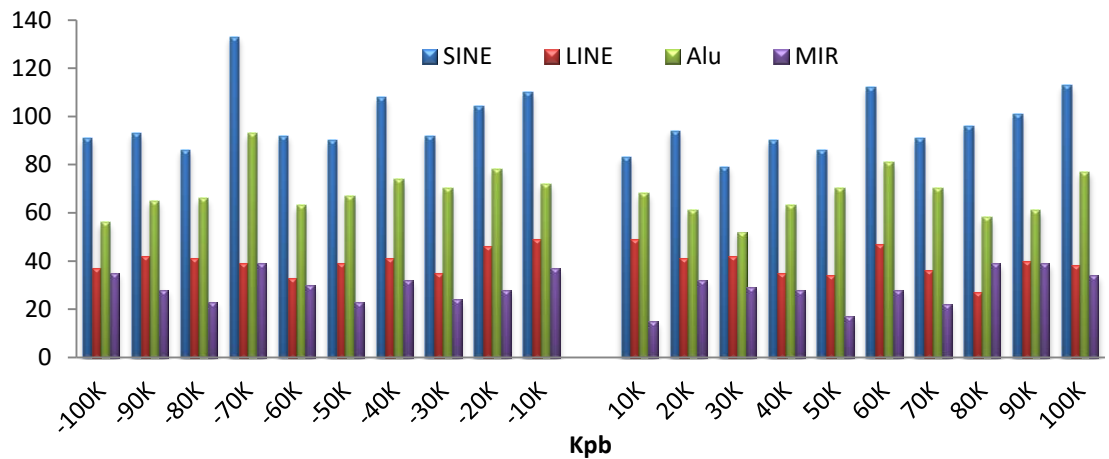


Figura 10. Distribución de elementos repetidos obtenida del paseo cromosómico de 100Kpb alrededor de genes asociados con PE, se resaltan las secuencias repetidas SINE, LINE, Alu y MIR.

A pesar de esto, es importante tener en cuenta a estos elementos repetidos, puesto que recientemente se ha demostrado la importancia de la cromatina no codificante en la funcionalidad del genoma²⁴⁹. Un ejemplo de ello, es la hipermetilación diferencial en elementos repetidos del ADN -como lo son las secuencias LINE-, que ha sido reportada en molas parcialmente hidatiformes, a su vez también relacionadas con PE²⁵⁰; con esto se podría postular que la expresión diferencial de ciertos genes en placentas preeclámpsicas puede deberse, aunque sea en parte, a las diferencias en metilación de éstas secuencias, y no solo de las islas CpG que han sido mucho más estudiadas.

III.4.5 Red de interacción protéica de genes asociados

La proteína codificada por el gen BCL6, según la figura 11, fue la de mayor número de interacciones protéicas con 117, seguida de NDRG1 con 89, KRT19 con 42 y FLT1 con 29. De último se situaron las proteínas codificadas por los genes HTRA 4 y SLCO2A1.

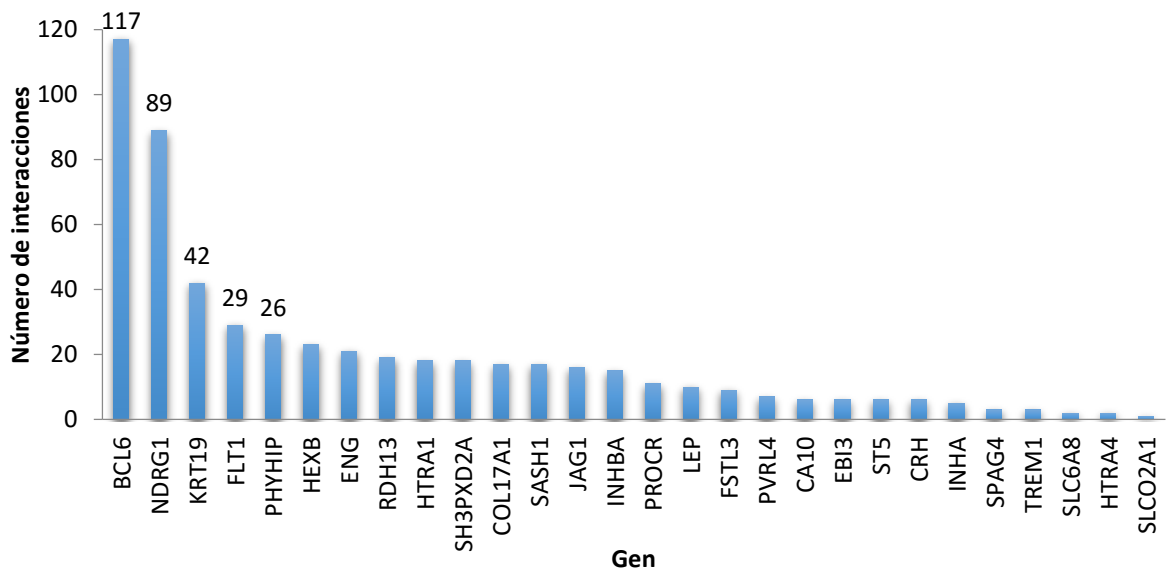


Figura 11. Número de interacciones de tipo proteico encontradas para cada gen asociado a PE en la red construida.

La red de expresión obtenida para placenta preeclámpsica se muestra en la figura 12. En esta se destacan los genes de elevado nivel de expresión, EBI3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 y KRT19. También, entre los genes con menor expresión se destacó BCL6 y LEP. La estructura de la red mostro dos nodos principales, con mayor número de interacciones; el más grande de ellos estaba formado alrededor del gen BCL6 y el segundo formado alrededor de NDRG1, es por esto que a pesar de no mostrarse como altamente expresados, se postularia que algún fallo en estos, puede ocasionar un cambio brusco en la funcionalidad de la red.

Los parámetros topológicos de la red indicaron la presencia de 531 nodos, y un número promedio de vecinos por gen, de 2,049 (Tabla 7). La densidad de la red fue de 0,004, valor cercano a cero, el cual indica, como también se observa en la figura 1, que la mayoría de nodos que conforman la red, no tienen una población alta a su alrededor.

Tabla 7. Datos topológicos de la red construida en el programa Cytoscape.

Parametros topológicos	Valor
Coeficiente de agrupamiento	0,013
Componentes conectados	16
Diámetro de la red	8
Radio de la red	1
Centralización de la red	0,216
Trayectorias más cortas	243620 (86%)
Longitud de trayectoria característica	4,027
Número promedio de vecinos	2,049
Número de nodos	531
Densidad de la red	0,004
Heterogeneidad de la red	3,463
Nodos aislados	0
Número de auto-bucles	7
Par de nodos multi-borde	35

Los genes que resultaron como más expresados según la red construida para placenta preeclámpsica, han sido ampliamente reportados en la literatura por su relación con PE^{251, 252, 253}. La ENG es un co-receptor del factor transformante de crecimiento $\beta 1$ y $\beta 3$ sobre membranas de células del endotelio y sincitiotrofoblásticas. Ésta es altamente incrementada en el suero materno de mujeres con PE y puede actuar en conjunto con sFLT1 e inducir a PE severa²²⁸. Por otro lado, puede reducir la señalización endotelial del óxido nítrico al inhibir TGF- $\beta 1$, causando la disfunción endotelial característica de esta enfermedad²²⁸.

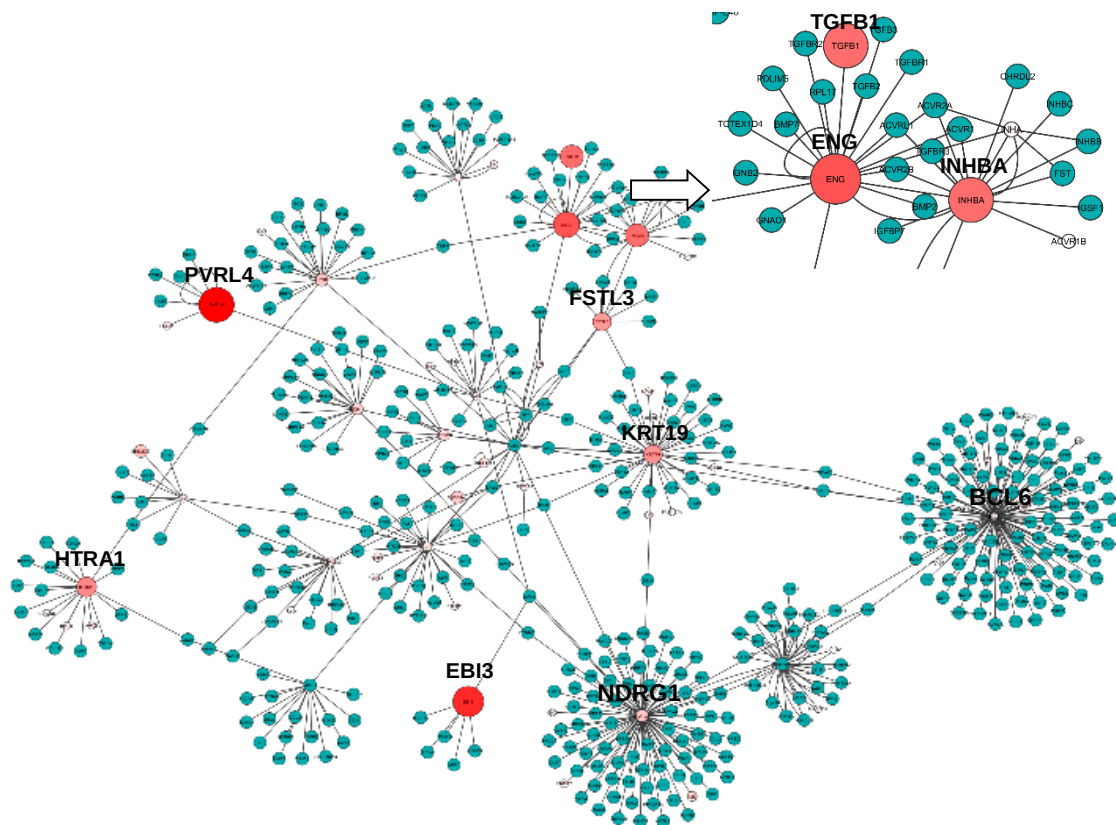


Figura 12. Red de expresión para placenta preeclámpsica obtenida mediante la aplicación del programa Cytoscape 3.2. Los círculos más grandes y de color rojo resaltan los genes de mayor expresión.

La respuesta inmune es uno de los temas que más relevancia ha tenido en el estudio de la PE, debido a que durante la placentación, las células natural killer (NK), linfocitos del sistema inmune innato, producen una parte importante de la respuesta inflamatoria decidual, éstas facilitan la placentación al secretar citoquinas que promueven la infiltración de las arterias espirales por el trofoblasto invasor²⁵⁴. Por lo tanto se ha concluido que una falla en esta respuesta inmune, conllevaría al desarrollo de la PE. Uno de los genes relacionados con esta respuesta es EBI3, éste se expresa altamente en células placentarias, incluyendo sincitiotrofoblastos y trofoblastos extravelllosos, además de ser regulado positivamente en la circulación de mujeres embarazadas²⁵⁵. Esta información junto con el descubrimiento de que el péptido EBI3 es presentado por HLA-G, ha sugerido que este gen es un modulador inmune crucial en la relación materno-fetal^{228, 253}. Su expresión diferencial mostrada en las redes construidas y previamente coincide con la literatura, y muestra que existe una fuerte reacción inmune como respuesta a un cambio que el cuerpo de la madre reconoce como negativo, sin embargo no se conoce exactamente qué causa este incremento ni su relación exacta con la PE.

Los genes PVRL4 y KRT19 por su parte, no han sido ampliamente relacionados con esta enfermedad, sin embargo, en recientes estudios se han reportado como expresados altamente en placentas preeclámpsicas^{256, 257}. PVRL4 codifica para la proteína receptora asociada al poliovirus 4, y su forma secretada, ha sido encontrada en pacientes con cáncer de mama. En este punto, es importante resaltar lo que menciona Louwen y colaboradores²²⁸, esto es, que el desarrollo de tumores, y el embarazo comparten muchas características, como lo son la inmunotolerancia y la invasión. Así, cuando se presentan desregulaciones en el proceso normal del embarazo, se conlleva a la PE. En este contexto, se podría pensar que efectivamente, una falla en la regulación del gen PVRL4 aportaría al desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado, el gen KRT19, que codifica para una proteína de función estructural, sin embargo, según una de las categorías ontológicas en las que está involucrada es la diferenciación celular involucrada en el desarrollo de la placenta embrionaria. La desregulación de este gen entonces, podría llevar a pensar en un mal funcionamiento de este proceso y su relación con el desarrollo de la PE. Sin embargo, se necesitan posteriores estudios para encontrar más evidencias de la relación de estos dos genes con esta enfermedad.

Los genes INHBA, FSTL3 y HTRA1 también han sido reportados previamente. El primero, codifica para la proteína inhibina beta A, y hace parte de la vía de señalización del factor transformante de crecimiento beta $-TGF\beta-$, el cual a su vez está involucrado en la regulación del desarrollo vascular y la angiogénesis, incluyendo el brote de angiogénesis²⁵⁸. Esta proteína también está relacionada con el desarrollo de diversos tipos de tumores^{259, 260}, por lo que su estudio de asociación con PE debería ser profundizado. El gen FSTL3, que codifica para una glicoproteína secretada, al igual que INHBA, también participa en la vía de señalización del factor transformante de crecimiento beta $-TGF\beta-$, y ha sido ampliamente reportado como expresado en placenta preeclámpsica^{261, 262}. Por último, el gen HTRA1 que codifica para la proteína high temperature requirement A 1, está involucrada en la invasión y migración del trofoblasto, y además ha sido relacionado con PE por su alta expresión en pacientes con la enfermedad^{263, 264, 265}. Es importante aclarar, de la red construida, que la baja expresión de genes como BCL6, LEP y FLT1, que han sido reportados en diversos estudios por su expresión en placenta preeclámpsica^{266, 228, 267}, no implica que no estén asociados con PE, sino que en comparación con los otros genes, estos tuvieron un menor valor de intensidad.

Las categorías GO para procesos biológicos de los genes asociados se presentan en la tabla 8. Se muestran las primeras 15 categorías ontológicas con su respectivo ID y p-value (corrección de Bonferroni), éstas corresponden a los procesos biológicos estadísticamente más representativos de la red. Se destacaron procesos

como la regulación negativa del proceso apoptótico, vascularización, el modelado de vasos sanguíneos y el brote de angiogénesis, entre otros, los cuales han sido ampliamente relacionados con el desarrollo de un embarazo normal, sugiriendo que cualquier fallo en estas funciones podría conllevar al desarrollo de PE.

Tabla 8. Categorías GO para procesos biológicos dadas para la red de interacción proteína-proteína. Se anota el número de proteínas asociadas a cada proceso biológico.

GO-ID	Descripción	No. proteínas asociadas	P-value Bonferroni
48519	Regulación negativa del proceso apoptótico	6462	9,57E-36
48523	Regulación negativa de la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento transformante beta	5889	7,33E-34
48518	Regulación positiva de la fagocitosis	8527	2,55E-33
48522	Regulación positiva de la división celular	6464	4,91E-32
48513	Desarrollo de órganos	3647	6,74E-27
50793	Regulación de la diferenciación celular	2914	1,79E-26
48856	Brote de angiogénesis	6805	1,74E-24
48731	Modelado de vasos sanguíneos	5603	3,81E-24
9892	Regulación negativa de la cascada de JNK	3559	1,56E-23
50789	Regulación negativa de la señalización TOR	27452	6,30E-23
31324	Regulación negativa del proceso biosintético de la interleucina-6	3158	8,94E-23
10604	Regulación positiva de la autofosforilación de proteínas	3758	1,82E-22
10605	Regulación negativa de la actividad quinasa JUN	3103	3,68E-22
32502	Vasculogénesis	7984	3,95E-22
30154	Proceso apoptótico involucrado en la morfogénesis	4709	1,08E-21

Explicando un poco más a fondo algunos de los procesos biológicos que se ven alterados en PE, se tiene que la apoptosis, que como se mencionó anteriormente, se ve regulada negativamente en un embarazo normal, en una mujer con PE se ve aumentada. Según la teoría sugerida por Reister y colaboradores²⁶⁸, este aumento se debería a que la mala invasión del trofoblasto a la decidua materna, lo cuál atraería y activaría macrófagos de la madre, que liberarían TNF- α , estimulando la apoptosis en las células del trofoblasto invasor. Esto explicaría también la acumulación de macrófagos observada en mujeres con PE. Por otro lado, el proceso biosintético de la IL-6 se ve alterado en el desarrollo de ésta enfermedad; se da un aumento de éste factor soluble el cuál es influenciado por el TNF- α y la IL-1. Al darse

éste incremento, potenciado por los factores solubles TNF α soluble y la IL-8, se presenta permeabilización vascular que permite la filtración de líquido intersticial y proteínas, lo que conlleva al desarrollo de edemas y proteinuria, características de la PE²⁶⁹.

La regulación de la vía de señalización del receptor de TGFB también se ve afectada como se muestra en las categorías GO obtenidas de la red. Esto se explicaría porque la endoglina soluble se une al TGFB1, impidiendo que éste se una a la endoglina ubicada en la membrana de las células endoteliales y conllevando a la baja producción de NO endotelial. Este proceso genera acumulación de plaquetas y posterior vasoconstricción, causando la alta presión arterial de la madre, que surgiría como una compensación para lograr transferir al feto los nutrientes y oxígeno necesario para su crecimiento²⁷⁰.

IV. CAPÍTULO

BIOLOGÍA SISTÉMICA DE LA PREECLAMPSIA

IV.1 Introducción

Dado que a la fecha no existe una técnica definida efectiva y eficiente de tamizaje que permita detectar precozmente a las mujeres con alto riesgo de presentar PE, y a fin de instaurar un manejo precoz que impida o minimice los efectos negativos concomitantes^{271, 272} y al mismo tiempo, ayude a investigar como la expresión de genes maternos y fetales contribuyen al mecanismo fisiopatológico no dilucidado de la enfermedad²⁷³, se han desarrollado nuevos métodos de estudio e investigación. Estos métodos incluyen la genómica funcional²⁷⁴, proteómica²⁷⁵, lipidómica²⁷⁶, metabolómica²⁷⁷, técnicas de microarreglos de mRNA²⁷⁸, epigenética²⁷⁹. Estas son técnicas suplementarias de tipo tradicional que pueden acceder a la madre y al feto las cuales han permitido identificar agentes metabólicos y genéticos relacionados con el curso clínico y relacionados con el proceso preeclámpico²⁸⁰, haciendo uso de herramientas bioinformáticas.

Entre los principales factores que han favorecido el desarrollo de esta disciplina, se encuentra el impresionante volumen de datos sobre secuencias generadas por los distintos proyectos genoma (tanto el humano como el de otros organismos); los nuevos enfoques experimentales, basados en biochips que permiten obtener datos genéticos a gran velocidad, bien de genomas individuales (mutaciones, polimorfismos), o de enfoques celulares (expresión génica); así como el desarrollo de Internet y la World Wide Web, que permite el acceso mundial a las bases de datos de información biológica. El término Bioinformática es relativamente reciente, y apareció en la literatura a principios de 1990, cuando comenzaba a estructurarse el llamado "Proyecto Genoma Humano" y el NCBI de los Estados Unidos, daba sus primeros pasos. En los primeros momentos, su vinculación con la Informática Médica (IM) se debió solamente a la similitud sintáctica, así como al indispensable uso de las computadoras por parte de ambas disciplinas²⁸¹.

El campo de la bioinformática tiene como reto principal ofrecer una respuesta a la avalancha de datos procedentes de la genómica. Mientras, que hace unos años, los resultados de los experimentos podían interpretarse sobre el cuaderno de laboratorio, hoy se necesitan bases de datos y técnicas de visualización sólo para almacenarlos y comenzar a estudiarlos. Esta evolucionó desde un conjunto de técnicas hacia una verdadera ciencia, al aportar el componente de análisis, para

entender la genómica e integrar sus datos que permitieran crear modelos predictivos para los sistemas biológicos²⁸².

No obstante, con el advenimiento del nuevo milenio, el procesamiento de la información genética (bioinformática) y de la información clínica (informática médica) amenaza con fundir ambas disciplinas en una sola, que algunos autores han definido como Informática Biomédica. En la medida que se genera información sobre el genoma humano y ésta se vincula con el conocimiento médico de las enfermedades, esta definición ha comenzado a hacerse realidad. Los datos que maneja la bioinformática tienen cada vez más presencia en la práctica médica; por tanto, conseguir la unificación de la información clínica con la información molecular representa el desafío más importante de esta disciplina durante el presente siglo²⁸³. Por tanto, los avances que se han producido en el conocimiento del genoma humano han tenido y van a tener en los próximos años un gran impacto tanto en biomedicina, como en las ciencias de la computación, sobre todo en el ámbito de la informática aplicada a la integración de la información genómica en la investigación epidemiológica tradicional^{284, 285}, ya que a raíz de los nuevos enfoques derivados de la genómica y la postgenómica, resultará difícil concebir la investigación y práctica de la medicina si no es integrando la información genética, proteómica y otras disciplinas relacionadas, bajo el nombre común de "ómicas", con los datos clínicos, de manera que se espera una considerable repercusión de la aplicación de la bioinformática en la investigación así como su aplicación en el campo de la medicina²⁸⁶. Se demanda por tanto, cada día más, programas diseñados específicamente para integrar los resultados de distintas procedencias (secuenciación del ADN, genotipado, *microarrays*, bases de datos hospitalarias, etc.). Esta disciplina, relativamente genérica y extensa, está enfocada principalmente hacia los aspectos de desarrollo, innovación y producción en los sistemas de información médicos^{287, 288}.

Las principales aplicaciones de la bioinformática son la gestión, la simulación, la minería de datos y el análisis de la información generada en el PGH, con aplicación también en la predicción de estructuras proteicas, estudios de secuencias y otras actividades derivadas de la investigación en biología²⁸⁹. El término simulación hace referencia a la experimentación con un modelo a partir de una hipótesis de trabajo, para comprender la estructura íntima del sistema o realizar una predicción. Por minería de datos se entiende el conjunto de técnicas para la inducción de conocimiento útil a partir de masas ingentes de datos. Debido a que en sus orígenes a través de la bioinformática principalmente se desarrollaban bases de datos genómicas y proteómicas y se construían herramientas *software* para el análisis y

presentación de dichos datos, se la sigue considerando como un campo de apoyo más que como una "ciencia" en sentido real. Quizás, abunde aún más en esa idea de "campo de apoyo", la consideración por parte del National Center for Biotechnology Information (NCBI), de que el fin último de esta disciplina es facilitar el descubrimiento de nuevas ideas biológicas, así como crear perspectivas globales a partir de las cuales se puedan discernir principios unificadores en biología²⁹⁰. En el aspecto metodológico, la bioinformática, a diferencia de la informática médica, utiliza una aproximación en sentido ascendente, es decir desde la información genómica a las funciones fisiológicas, teniendo en cuenta a su vez la regulación del fenotipo a través de la interacción gen-ambiente. El desarrollo de esta disciplina es cada vez más importante en el estudio de problemas biomédicos^{291, 292}. Según Kanehisa y Bork, el fin último de la bioinformática es extraer conocimiento a partir de una gran cantidad de datos para obtener una representación de las células y organismos así como predecir sistemas de gran complejidad, como son las redes de interacción en los procesos celulares y el fenotipo de los organismos. En su esquema de representación cronológica acerca del desarrollo de la bioinformática, los autores consideran que en estos momentos ésta aborda el entendimiento de las funciones del organismo a nivel molecular y celular, investigando la comprensión de los principios básicos de mayor complejidad de los sistemas biológicos²⁹³.

En este contexto, surge la biología de sistemas con su enfoque holístico, que permite comprender de manera integrada el funcionamiento de procesos biológicos, ha sido utilizada en investigaciones sobre enfermedades complejas como la PE²⁹⁴. Avances en este campo que emplea la bioinformática se han destacado, puesto que con ayuda de ésta, se logran complementar los estudios de laboratorio, analizando la gran cantidad de datos obtenidos de éstos, así como también, construyendo redes que agrupan genes asociados con PE y Heat Maps que muestran su expresión diferencial obtenida de micromatrices de ADN²⁹⁵. Algunos de estos trabajos, son los realizados por Tejera y colaboradores²⁹⁶, Triche y colaboradores²⁹⁷ y Walentin y colaboradores²⁹⁸ en los que el principal objetivo fue encontrar genes candidatos para PE mediante el uso de herramientas computacionales. Este tipo de estudios, han logrado priorizar algunos genes como lo son NDRG1, LYN e INHBA, así como también, confirmando genes ampliamente relacionados con la enfermedad como LEP, FLT1 y ENG.

Todos estos avances en genómica, proteómica y bioinformática han permitido identificar factores de riesgo importantes en la etiopatogenia de la PE y permiten relacionarlos con genes específicos y dan luces acerca de posibles métodos y

tecnologías para la identificación temprana de la enfermedad o del riesgo de padecerla ²⁹⁹.

IV.2 Objetivos

1. Asociar los perfiles de expresión de genes asociados a PE con la patofisiología de la enfermedad, empleando datos depositados en plataformas bioinformáticas de micromatrices de ADN.
2. Identificar genes candidatos a biomarcadores de la PE con base en su expresión diferencial en placentas Preeclámpsicas y control, utilizando recursos bioinformáticos.

IV.3 Metodología

IV.3.1 Minería de datos

Con el objetivo de determinar genes biomarcadores de expresión diferencial en placenta durante la PE, se analizó la expresión global de genes a partir de varios experimentos de micromatrices de DNA consignados en la base de datos Gene Expression Omnibus GEO del NCBI.

De una exploración de las micromatrices asociadas a la expresión de genes en placentas preeclámpsicas, se seleccionaron para análisis, siete que cumplieron con el requisito de inclusión de tener placentas preeclámpsicas en mujeres de diferentes edades y condiciones de severidad de la patología con controles de placentas de mujeres normales equivalentes en edad. En total se analizaron un total de 76 placentas provenientes de mujeres preeclámpsicas con edades que variaron de 20 a 30 años de edad, diagnosticadas como preeclámpsicas por examen clínico complementado con pruebas bioquímicas. Adicionalmente se incluyeron en el análisis 96 mujeres normales seleccionadas con los mismos criterios de edad e historia clínica sin signos de PE (tabla 9).

Se incluyeron en el análisis los valores de expresión de 14,653 genes de las plataformas de micromatrices de DNA incluidas. De estos se seleccionaron 330 genes cuyos valores de incremento de expresión (fold change) fueron mayores que 1,5. De los 330 genes seleccionados de acuerdo con el criterio de incremento $>1,5$, fueron sometidos a un análisis de exclusión, del cual se seleccionaron 22 de ellos con la mayor frecuencia en las muestras de placentas tanto preeclámpsicas como de los controles.

Tabla 9. Número de plataformas y de muestras de preeclámpsica y controles extraídas de la base de datos GEO

Plataformas	Muestras		Total
	PE	Control	
GSE30186	6	6	12
GSE10588	17	26	33
GSE24129	8	8	16
GSE25906	23	37	60
GSE43942	5	7	12
GSE4707	10	4	14
GSE44711	8	8	16
Total	77	96	173

IV.3.2 Análisis de Chi-cuadrado

Se realizó un análisis de Chi cuadrado con el fin de comparar las muestras de placenta Preeclámpsica y normal. Se incluyeron las diferentes variables obtenidas de la información consignada en cada una de las micromatrices: Fenotipo, origen del estudio, sexo del feto y edad gestacional. Este análisis se ejecutó con el programa SPSS 20.0.

IV.3.3 Análisis Multivariado

El ACP se ejecutó con el programa SPSS 20.0, con el fin de jerarquizar la expresión de cada uno de los genes expresados en placenta preeclámpsica y los controles; el número de componentes seleccionadas se estimó considerando una varianza $\geq 60\%$, la sedimentación y el criterio del valor propio. Además se llevó a cabo un ACJ con la expresión de 22 genes asociados a PE en 76 placentas preeclámpsicas y 93 controles, empleando el programa Cytoscape 3.2.

IV.4 Resultados y discusión

IV.4.1 Análisis Chi-cuadrado

A partir de un análisis de Chi cuadrado en el que se incluyeron diferentes variables obtenidas de la información consignada en cada una de las micromatrices, se determinaron diferencias significantes en el fenotipo (PE vs control), y en la edad gestacional (Tabla 10). Estas dos variables son de importancia para seleccionar aquellos genes que tienen expresión diferencial en las placentas preeclámpsicas en comparación con las normales.

Tabla 10. Análisis de Chi cuadrado de diferentes variables de línea base, valoradas tanto en mujeres preeclámpsicas como en los controles normales

Variable	Chi cuadrado	Valor de P
Fenotipo ¹	43,46	3,64E-10 ^S
Origen del estudio ²	10,38	0,58 ^{NS}
Sexo del feto ³	2,55	0,28 ^{NS}
Edad gestacional ⁴	21,41	0,00 ^S

1. PE o control. 2. micromatrices GSE30186, GSE10588, GSE24129, GSE25906, GSE43942, GSE4707, y GSE44711. 3. Hombre o mujer con base en la expresión de los genes, UTY y USP9Y ligados al cromosoma Y. d. En tiempo de gestación de 25-30 semanas; de 31–33 semanas; de 34–36 semanas, o de 37–40 semanas. S. estadísticamente significativa. NS. No significativa.

IV.4.2 Análisis de asociación

Un análisis de asociación mostró que los z-score de estos 22 genes se agruparon en tres diferentes categorías, las cuales se asociaron no solo con la expresión sino con el tiempo de gestación de 25 a 36 semanas (Figura 13). De acuerdo con lo que se muestra en la figura 13, los genes del grupo PE1, que incluyó placentas de 25 a 33 semanas tuvieron como biomarcador de elevada expresión al gen que codifica para la Leptina; en PE2, que incluyó las placentas preeclámpsicas de mujeres entre las 34 y 36 semanas, los genes de elevadas expresión fueron Leptina, LEP (Z-score=2.51) y el semejante a Folistatina 3 proteína de secreción, FSTL3 (Z-score=1,84); ya en PE3, que incluyó la franja de edad de 37 a 40 semanas de gestación, el gen de mayor expresión de el de Leptina (Z- score=1,09).

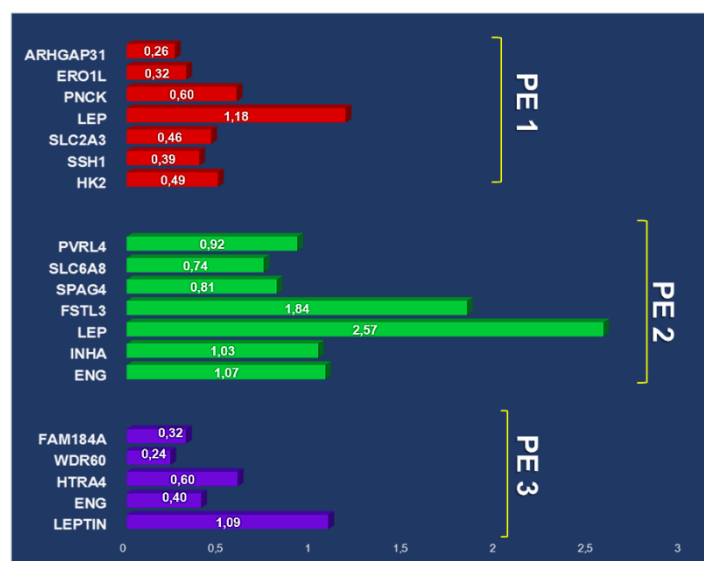


Figura 13. Clasificación en tres grupos de la expresión de diferentes genes cuya expresión fue elevada en los experimentos con micromatrices de ADN. En esta situación se determinaron los genes biomarcadores en tres tipos de placentas preeclámpsicas.

IV.4.3 Análisis de Componentes Principales

Con base en la prueba de esfericidad de Bartlett y el criterio de valor propio se determinó la aplicabilidad de una ACP efectuado sobre 22 genes en 76 muestras de placentas de mujeres con PE redujo de R^{76} a R^6 el número de componentes incluyó representaron el 68,49% del total de la varianza (Tabla 11).

Tabla 11. Contribución del porcentaje da la varianza del resultado del ACP de sesis componentes varianza total

Componente	% de la varianza	% acumulado
1	33,30	33,30
2	11,12	44,41
3	7,99	52,41
4	5,85	58,26
5	5,55	63,80
6	4,68	68,49

La distribución de los 22 genes cuyos valores de z-score se obtuvieron de 76 placentas preeclámpsicas se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de contribución de la varianza de cada uno de los genes asociados con PE en cinco componentes principales que incluyeron el 63,80% de la varianza total calculada

Gen	C1	C2	C3	C4	C5
ARHGAP31	-0,20	0,44	0,41	0,53	-0,28
ENG	0,86	-0,01	-0,18	-0,03	-0,03
ERO1L	0,76	-0,07	-0,03	-0,21	0,05
FSTL3	0,90	0,13	0,08	0,08	0,05
FAM184A	0,34	-0,19	0,63	-0,24	-0,28
HK2	0,82	0,20	0,03	-0,01	0,08
INHA	0,91	-0,14	-0,10	0,07	-0,03
HTR4	0,06	-0,38	-0,04	0,18	0,33
LEP	0,88	-0,03	0,04	0,16	-0,16
PNCK	0,70	0,31	0,20	-0,00	-0,12
PVR	0,26	0,51	0,01	-0,18	0,21
SLC22A3	-0,37	-0,27	0,38	0,40	0,16
SLC6A18	0,18	0,10	-0,47	0,60	-0,26
SPAG4	0,90	-0,09	-0,03	0,03	-0,05
SSH1	-0,30	0,28	0,53	-0,07	-0,12
WDR60	0,53	-0,25	0,45	-0,08	-0,11
AQP1	0,06	-0,39	0,39	0,06	0,62
BCL6	0,85	-0,11	-0,02	-0,01	0,04
ISG15	0,10	0,66	0,29	0,19	0,19
PRL	0,13	0,64	-0,16	-0,13	0,45
RBP4	-0,09	0,63	0,00	-0,11	0,02
SSX2IP	-0,35	0,05	-0,07	-0,46	-0,34

De acuerdo con el análisis gráfico de Biplot, los genes PCNK, NK2, FSTL3 formaron un grupo de coexpresión a parte de otro conformado por los genes ISG15, PRL y PVR (Figura 14, A). Esta distribución fue diferente a la obtenida del análisis de los mismos genes en 93 placentas de mujeres controles sin Preeclampsia, observándose un grupo de genes conformado por PVR, AQP1, REP4 y PNCK (Figura 14, B).

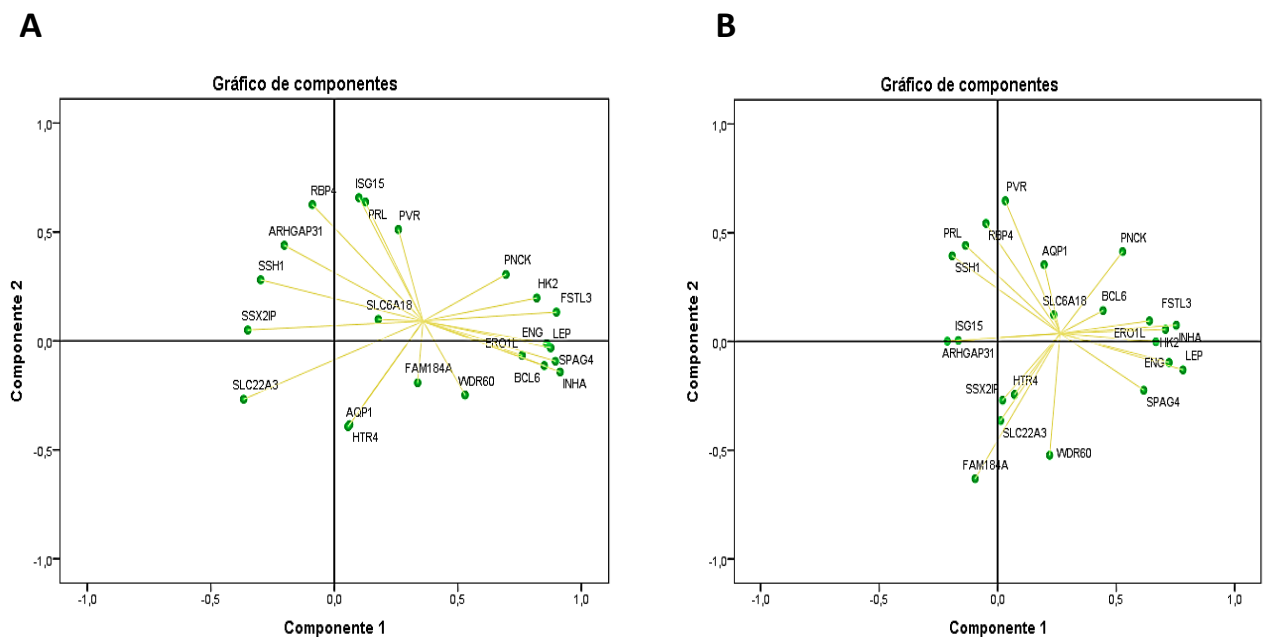


Figura 14. Distribución en dos componentes del plano cartesiano de 22 genes A) Asociados a PE cuyos valores de z-score se obtuvieron de 76 placentas de mujeres con PE y B) Placentas control.

IV.4.4. Análisis de Clúster Jerárquico

En el ACJ realizado a partir de los valores de distancia de medianas, se pudieron diferenciar tres agrupamientos de las 76 placentas preeclámpsicas con valores de z-score diferenciales para determinados genes. Un primer grupo incluyó aquellas placentas en las que se registraron los valores de z-score altos para los genes ENG, FSTL3 y LEP (Figura 15 Grupo 1), un segundo grupo en el que la expresión de estos genes fue muy baja, y un tercero el que los valores de z-score para los genes, antes mencionados, fueron variables.

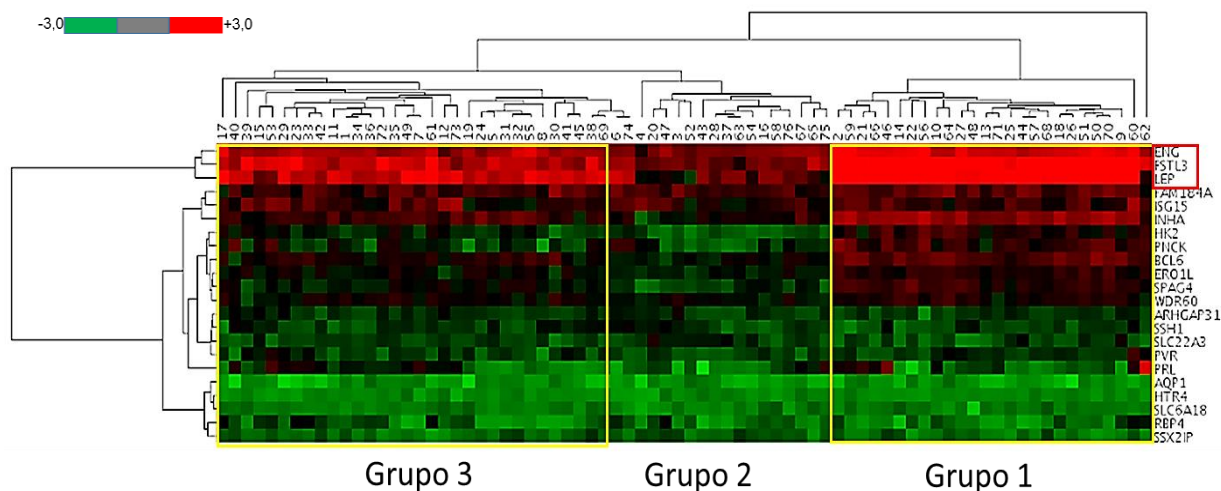


Figura 15. Representación en Heat Map del ACJ de los valores de z-score de 22 genes asociados a PE en 76 muestras de placentas preeclámpsicas. En la escala de colores las zonas en rojo se determinan un elevado nivel de expresión génica mientras las zonas verdes corresponden a genes subexpresados con valores de z-score negativos.

IV.4.5 Información descriptiva de muestras placentarias

Con el fin de analizar si algunas de las variables de las muestras de placentas preeclámpsicas puede explicar la distribución obtenida en el ACP, se obtuvo información sobre edad gestacional, toma de la muestra durante el trabajo de parto y el sexo del feto. Una variable común de las placentas clasificadas en el grupo 1, es que todas proviene de mujeres en el tercer trimestre de embarazo, ni el sexo fetal, ni tampoco la toma de la muestra durante el trabajo de grado fueron significantes (Tabla 13).

Tabla 13. Descripción de variables relacionadas con las características de aquellas placentas preeclámpsicas del grupo 1, donde se detectó elevada expresión de los genes ENG, FSTL3 y LEP

Número	Muestra	Lote	Fenotipo	Edad Gestacional	En trabajo de parto	Sexo fetal
2	GSM747299	GSE30186	PE	36	No	M
9	GSM225499	GSE10588	PE	34	ND	F
10	GSM225500	GSE10588	PE	34	ND	F
13	GSM225503	GSE10588	PE	34	ND	M
14	GSM225504	GSE10588	PE	34	ND	M
17	GSM225507	GSE10588	PE	34	ND	F
18	GSM225508	GSE10588	PE	34	ND	F
20	GSM225510	GSE10588	PE	34	ND	M
21	GSM225511	GSE10588	PE	34	ND	F
22	GSM225512	GSE10588	PE	34	ND	F
25	GSM594058	GSE24129	PE	31	No	M
26	GSM594059	GSE24129	PE	31	No	F
27	GSM594060	GSE24129	PE	31	No	F
44	GSM635906	GSE25906	PE	37	SI	M
46	GSM635908	GSE25906	PE	38	SI	M
48	GSM635914	GSE25906	PE	38	SI	F
50	GSM635920	GSE25906	PE	35	SI	F
51	GSM635922	GSE25906	PE	32	SI	F
56	GSM635937	GSE25906	PE	29	SI	M
57	GSM635940	GSE25906	PE	28	SI	F
59	GSM635945	GSE25906	PE	34	SI	M
60	GSM635947	GSE25906	PE	33	SI	F
68	GSM1074813	GSE43942	PE	35	ND	F
70	GSM1089229	GSE44711	PE	32	ND	M

V. CAPÍTULO

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta investigación se logró realizar una integración, de manera novedosa, partiendo de la hipótesis multifactorial de la etiología de PE, agrupando los principales agentes potencialmente causantes según su función en el metabolismo y los estudios más recientes en bioinformática. De esta forma se dio un enfoque holístico a la etiología de la enfermedad, proponiendo un modelo de interacción genético-metabólico que podría permitir la identificación temprana a mujeres con alto riesgo de padecer PE. Esto, posiblemente, aplicando un protocolo de tratamiento que permita controlar la hipertensión, prevenir el daño hepático y renal y evitar sus principales complicaciones como son la eclampsia y el síndrome HELLP, principales causantes de la mortalidad asociada a la enfermedad; además de poder lograr la continuidad del embarazo a etapas tardías permitiendo que el neonato nazca con adecuado peso y talla, previniendo otras complicaciones en su desarrollo.

Los resultados de este trabajo dan luces acerca del proceso etiológico de la enfermedad, puesto que se identificaron marcadores de riesgo de fácil medición en nuestro medio como lo son la PCR y los ACA con respecto al análisis bioquímico, y los genes LEP, ENG y FSTL3 principalmente como biomarcadores por su expresión diferencial en placentas control y preeclámpsicas con respecto al análisis bioinformático. La integración de todos los posibles genes involucrados en una red de interacción, permitió analizar desde la biología sistémica, la asociación de estos genes con la patofisiología de la PE, y destacando los procesos biológicos que se ven afectados con el desarrollo de la enfermedad. Finalmente, el entendimiento de los eventos moleculares asociados a PE puede proveer la base del diseño de nuevas estrategias de prevención y tratamiento para mejorar los resultados en términos reproductivos, como por ejemplo la construcción de secuencias que neutralicen los genes involucrados en la patogénesis, como se está haciendo con sFLT y ENG. Así pues, la aplicación de las herramientas bioinformáticas se convierte en un instrumento potente para el análisis integrado de la expresión de genes y su papel en la patogénesis de la PE.

Hasta el momento, ha sido muy complejo discriminar entre los factores causantes y las consecuencias de la enfermedad puesto que las rutas regulatorias y procesos parecen entrelazarse de manera circular; los genes asociados participan en varias vías, o en su defecto están involucrados en funciones intermedias. Para ello

posiblemente habría que tener perfiles de expresión de genes de varias etapas del embarazo, incluso desde antes de la concepción, para así corroborar a cuál de los genes, o mejor de su expresión diferencial, es atribuible la etiología de la enfermedad. Sin embargo, el gen de la leptina (LEP) se perfila como uno de los candidatos más influyentes en la patogénesis de la enfermedad. Finalmente, sería importante continuar con estudios que se enfoquen en la epigenómica de la PE, investigando a fondo la remodelación cromatínica que conlleva al silenciamiento o activación de ciertos genes. Al tener éste enfoque, de gran componente ambiental, se podrían generar nuevos tratamientos preventivos a nivel de dietas o suplementos que promuevan o disminuyan las marcas epigenéticas en los genes señalados como biomarcadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cifuentes B. R. OBSTETRICIA DE ALTO RIESGO, Aspromédica Cali 1994
2. Moodley J. Maternal deaths due to hypertensive disorders in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008; 22: 559-67.
3. Moster D, Lie RT, Markestad T. Long-term medical and social consequences of preterm birth. *N Engl J Med.* 2008; 359: 262-73.
4. Diehl CL, Brost BC, Hogan MC, Elesber AA, Offord KP, Turner ST et al. Preeclampsia as a risk factor for cardiovascular disease later in life: validation of a preeclampsia questionnaire. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198: e11-3.
5. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Preeclampsia. *Lancet* 2005; 365:785-89.
6. Presidencia de la República, Departamento Nacional de Planeación, Ministerio de Salud y otros. "Mortalidad Materna en Colombia". Santafé de Bogotá, Agosto 1996.
7. Díaz-Martínez LA, Serrano-Díaz NC. Oportunidades de investigación en preeclampsia, desde la perspectiva de prevención primaria. Un artículo de reflexión. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2008; 59:3
8. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Preeclampsia. *Lancet.* 2005; 365: 785-89.
9. República de Colombia. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. Defunciones 2006. Visitado en 2008 Ago 07. Disponible en: http://www.dane.gov.co/index.php?option=com_content&task=category§ionid=16&id=395&Itemid=891.
10. Cáceres FM, Díaz LA. Mortalidad materna en el Hospital Universitario Ramón González Valencia, 1994-2004. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2007; 58: 99-107.
11. Boada CL, Cotes M. Plan de choque para la reducción de la mortalidad materna. Visitado en 2008 Ago 07. Disponible
12. Anagnostopoulos A, Tsangaris G. Proteomics advancements in fetomaternal medicine. *J Clin Biochem.* 2008; 46(6): 487-96.
13. Behrouz G, Farzaneh G, Leila J, Jaleh Z, Eskandar K. Presence of auto-antibody against two placental proteins, annexin A1 and vitamin D binding protein, in sera of women with pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 99(1-2):10-16.
14. Klein J, Buffin-Meyer B, Mullen W, Carty D, Delles C, Vlahou A et al. Clinical proteomics in obstetrics and neonatology. *Expert Rev Proteomics.* 2014; 11(1): 75-89.
15. Lee H, Jeong S, Na K, Lee M, Lee S, Lim J et al. Comprehensive genome-wide proteomic analysis of human placental tissue for the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *Journal of Proteome Research.* 2013; 12(6): 2458-2466.
16. Ma K, Jin H, Hu R, Xiong Y, Zhou S, Ting P et al. A proteomic analysis of placental trophoblastic cells in preeclampsia-eclampsia. *Cell Biochem Biophys.* 2014; 69(2): 247-258.

17. Myers J, Tuytten R, Thomas G, Laroy W, Kas K, Vanpoucke G et al. Integrated proteomics pipeline yields novel biomarkers for predicting Preeclampsia. *Hypertension*. 2013; 61: 1281-1288.
18. Epiney M, Ribaux P, Arboit P, Irion O, Cohen M. Comparative analysis of secreted proteins from normal and preeclamptic trophoblastic cells using proteomic approaches. *J Proteomics*. 2012; 75(6): 1771-1777.
19. Feng Y, Zhou C, Li X, Liang X. Alpha-1-antitrypsin acts as a preeclampsia-related protein: a proteomic study. *Gynecology and Obstetric Investigation*. 2012; 73(3): 252-259.
20. Zhang H, Wang Y, Chen D. Analysis of Nitroso-Proteomes in normotensive and severe preeclamptic human placentas. *Biol Reprod*. 2012; 84: 966-975.
21. Ness R, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of Preeclampsia: A hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 175: 1365-70
22. Stampalija T, Gyte GM, Alfirevic Z. Utero-placental Doppler ultrasound for improving pregnancy outcome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 8;9: CD008363
23. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010; 37(2): 239-53.
24. Shenoy V, Kanasaki K, Kalluri R. Pre-eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(9): 529-36. Epub 2010 Jun 18.
25. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, et al. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *Br Med J*. 1998; 316: 1343-7.
26. Stone JL, Lockwood ChJ, Berkowitz GS. Risk Factors for Severe Preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*. 1994; 83: 357-61.
27. Mauriceau F. *Traité des maladies des femmes grosses, et celles qui sont accouchées, enseignant la bonne et véritable méthode pour bien aider*. Paris: d'Houry 1694; 28.
28. Hinselmann H. *Die eklampsie*. Bonn: Cohen; 1924
29. Chesley LC. History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1984; 27: 801-820
30. Torres L, Sanabria M, Mejias L, Hernández C, Fleitas F. Primeras experiencias de la Unidad de Hipertensión Inducida por el Embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 1992; 53: 23-26.
31. Bodnar LM, Catov JM, Klebanoff MA, Ness RB, Roberts JM. Prepregnancy body mass index and the occurrence of severe hypertensive disorders of pregnancy. *Epidemiology*. 2007; 18: 234-9.
32. Haelterman E, Qvist R, Barlow P, Alexander S. Social deprivation and poor access to care as risk factors for severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 111: 25-32.

33. Herrera JA, Herrera-Miranda R, Herrera-Escobar JP & Nieto-Díaz A. Reducción de la mortalidad materna por Preeclampsia en Colombia – un análisis de series de tiempo interrumpido. *Colomb Méd.* 2014; 45(1): 25-31
34. Rey E, Couturier A. The prognosis of pregnancy in women with chronic hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:410-416.
35. Sibai BM, Lindheimer M, Hauth J, Caritis S, VanDorsten P, Klebanoff M, et al. Risks factors for preeclampsia, abruptio placentae and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. *N Engl Med.* 1998; 339: 667-671.
36. Malone FD, Kaufman GE, Chelmow D, Athanassiou A, Nores JA, D'Alton ME. Maternal morbidity associated with triplet pregnancy. *Am J Perinatol.* 1998; 15:73-77.
37. Garner PR, D'Alton ME, Dudley DK, Huard P, Hardie MI. Preeclampsia in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 163: 505-508.
38. Hamburger JL. Diagnosis and management of Grave's disease in pregnancy. *Thyroid.* 1999; 2: 219-223.
39. Feeney JG, Scott JS. Preeclampsia and changed paternity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1990; 11: 35-38.
40. Robillard P, Hulse TC, Alexander GR, Keenan A, de Caunes F, Papiernik E. Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multipara. *J Reprod Immunol.* 1998; 24: 1-12.
41. Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA.* 1999; 262: 3143-3147.
42. O'Brien WF. The prediction of preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1998; 35:351-364.
43. Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population based Swedish cohort study. *Am J Med Genet A.* 2004; 130A: 365-71.
44. Serrano NC, Díaz LA. ¿Qué tanto influyen los factores genéticos y medioambientales en la susceptibilidad para desarrollar preeclampsia? *Med UNAB.* 2005; 8: 159-64.
45. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 37: 240–249
46. Fisher SJ, Roberts JM. Defects in placentation and placental perfusion. In: Chelsey's Hypertensive Disorders in Pregnancy, edited by Lindheimer MD, Roberts JM, and Cunningham FG. Stanford, CT: Appleton & Lange. 1999: 377–394.
47. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161: 1200–1204
48. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111: 649–658,

49. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN Jr et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181: 915–920.
50. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens.* 1991; 4: 700–708.
51. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT₁ receptor. *J Clin Invest.* 1999; 103: 945–952
52. Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: newer insights. *Semin Nephrol.* 2004; 24: 548–556.
53. Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. *Endocrinology.* 2004; 145: 4835–4837.
54. Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP. Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int.* 2005; 67: 2101–2113
55. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension.* 2005; 46: 1077–1085.
56. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 992–1005.
57. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004; 350: 672–683.
58. Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, Shibata E, Hubel CA, Karumanchi SA et al. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta.* 2005; 26: 563–573
59. Shibata E, Rajakumar A, Powers RW, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar LM et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 4895–4903.
60. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 770–775
61. Thadhani RI, Johnson RJ, Karumanchi SA. Hypertension during pregnancy: a disorder begging for pathophysiological support. *Hypertension.* 2005; 46: 1250–1251
62. Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH et al. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193: 16–22

63. Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension*. 2007; 50: 137–142
64. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004; 113: 17–20
65. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int*. 2007; 71: 977–984
66. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A et al. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291: R1085–R1093
67. Page EW. The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia, *Am J Obstet Gynecol*. 1939; 37: 291.
68. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005; 365: 785–799
69. Sibai B, Ewell M, Levine R, Klebanoff M, Esterlitz J, Catalano P et al. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 177: 1003–1010
70. Robert JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know, *Semin Perinatol*. 2000; 24: 24-8.
71. Robert JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161: 1200-04.
72. Karumanchi SA, Lam C. Mécanismes impliqués dans la pré-éclampsie: progrès récents. In: Lesavre P, Drüke T, Legendre P, Niaudet P, editors. *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker Jean Hamburger*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. 2004: 167-76.
73. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca B, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294: H541-H550.
74. LaMarca B, Gilbert J, Grange JP. Recent Progress Toward the Understanding of the Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia. *Hypertension*. 2008; 51(4): 982-988.
75. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986; 93: 1049-59.
76. Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation, *Br Obstet Gynaecol*. 1981; 88: 876-81.

77. Dekker GA. Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1999; 42: 422-435.
78. Casper FW, Seufert RJ. Atrial natriuretic peptide (ANP) in preeclampsia-like syndrome in a rat model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995; 103: 292-96.
79. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Amn*. 1972; 1: 177-91.
80. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997; 277: 1669-72.
81. Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16: 5-15.
82. Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am Obstet Gynecol*. 1995; 172: 202-203.
83. Cokell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension*. 1997; 30: 247-51.
84. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ, Clemens JD et al. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA*. 1999; 282: 356-62.
85. Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine*. 1981; 60: 267-76.
86. Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol*. 1992; 27: 101-08.
87. Robert JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001; 357: 53-56.
88. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentration of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently developed preeclampsia. *Lancet*. 2003; 361: 1511-17.
89. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ et al. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*. 2000; 405: 797-800.
90. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT (1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001; 7: 1003-09.
91. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111: 649-58.
92. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis,

- elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1405-23.
93. Henderson J, Whitlock E, O'Connor E, Senger C, Thompson J, Rowland M. Low-dose aspirin for prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2014; 160(10): 695-703.
 94. Jabeen M, Yawar M, Imdad A, Bhutta Z. Impact of interventions to prevent and manage preeclampsia and eclampsia on stillbirths. *BMC Public Health.* 2011; 11(Suppl 3:S6):1-11.
 95. Sibai, B. Therapy: Low-dose aspirin to reduce the risk of pre-eclampsia? *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11(1): 6-8.
 96. Duley L, Henderson-Smart D, Meher S, King J. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 2: CD004659.
 97. Shigekito T, Uno Y, Tomonari A et al. Type I Congenital plasminogen deficiency is not a risk factor for thrombosis. *Thromb Hemost.* 1992; 67:189
 98. Simioni P, Prandoni P, Burlina A, Tormene D, Sardella C, Ferrari V, Benedetti L, Girolami A. Hyperhomocysteinemia and deep-venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1997; 77: 883-6.
 99. Hoque MM, Bulbul T, Mahal M, Islam NA, Ferdausi M. Serum homocysteine in pre-eclampsia and eclampsia. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2008; 34(1): 16-20.
 100. Hasanzadeh M, Ayatollahi H, Farzadnia M, Ayati S, Khoob MK. Elevated plasma total homocysteine in preeclampsia. *Saudi Med J.* 2008; 29(6): 875-8.
 101. Dodds L, Fell DB, Dooley KC, Armson BA, Allen AC, Nassar BA, Perkins S, Joseph KSEffect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clin Chem.* 2008; 54(2): 326-34.
 102. Kajdy A, Niemiec T. Homocysteine metabolism disorders as a potential predictor of preeclampsia. *Ginekol Pol.* 2008; 79(11): 775-9.
 103. Selhub J. health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull.* 2008; 29(2 Suppl): S116-25.
 104. Clouse L, Comp P. The regulation of hemostasis: the protein C system. *New Engl J Med.* 1995; 314: 1298
 105. Engesser L, Boekmans W, Briet E, et al. Hereditary Protein S Deficiency: Clinical Manifestations. *Ann Intern Med.* 1997; 106: 677-682.
 106. Córdoba A, Blanco F, Gonzalez F. Hiperhomocisteinemia, un nuevo marcador de riesgo vascular: territorios vasculares afectados; papel en la patogénesis de la arterioesclerosis y la trombosis y tratamiento. *Med clin (Barc)* 1997; 109: 715-25.
 107. Córdoba A, Ceballos J, Meneses B. Causas moleculares de la hiperhomocisteinemia. *Act Med Col.* 2000; 25: 122-33.

108. Van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, Von Blomberg BM et al. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180(5): 1146-1150.
109. Rajkovic A, Catalano P, Malinov R. Elevated Homocysteine levels with Preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1997; 90: 168-71.
110. Rajkovic A, Mahomed K, Malinov R, et al. Plasma Homocysteine concentrations in Eclamptic and Preeclamptic African women postpartum. *Obstet Gynecol.* 1999; 94: 355-60.
111. Vadachkoria S, Sanchez SE, Qiu C, Muy-Rivera M, Malinow MR, Williams MA. Concentrations homocysteine are associated with an increased risk of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2004; 58(3): 133-9
112. Fayed MR, Youssef M, Odah MM. Hyperhomocysteinemia is A risk marker for development of maternal pre-eclampsia *Boll Chim Farm.* 2004; 143(7): 281-7
113. Yilmaz H, Unlüçerçi Y, Gürdöl F, Isbilen E, Isbir T. Association of pre-eclampsia with hyperhomocysteinaemia and methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in a Turkish population. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2004; 44(5): 423-7
114. Harma M, Harma M, Kocyigit A. Correlation between maternal plasma homocysteine and zinc levels in preeclamptic women. *Biol Trace Elem Res.* 2005; 104(2): 97-105
115. Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol.* 2004; 104(2): 336-43.
116. Also-Rallo E, Lopez-Quesada E, Urreizti R, Vilaseca MA, Lailla JM, Balcells S, Grinberg D. Polymorphisms of genes involved in homocysteine metabolism in preeclampsia and in uncomplicated pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 120(1): 45-52
117. Daly S, Cotter A, Molloy AE, Scott J. Homocysteine and folic acid: implications for pregnancy. *Semin Vasc Med.* 2005; 5(2): 190-200.
118. Maruotti G, Del Bianco A, Amato AN, Lombardi L, Fulgeri AM, Pietropaolo F. Preeclampsia and high serum levels of homocysteine. *Minerva Ginecol.* 2005; 57(2): 165-70
119. Makedos G, Papanicolaou A, Hitoglou A, Kalogiannidis I, Makedos A, Vrazioti V, Goutzioulis M. Homocysteine, folic acid and B12 serum levels in pregnancy complicated with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2007; 275(2): 121-4.
120. Hoque MM, Bulbul T, Mahal M, Islam NA, Ferdausi M. Serum homocysteine in pre-eclampsia and eclampsia. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2008; 34(1): 16-20
121. Hasanzadeh M, Ayatollahi H, Farzadnia M, Ayati S, Khoob MK. Elevated plasma total homocysteine in preeclampsia *Saudi Med J* 2008; 29(6): 875-8
122. Dodds L, Fell DB, Dooley KC, Armson BA, Allen AC, Nassar BA, Perkins S, Joseph KS. Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on

- gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clin Chem*. 2008; 54(2): 326-34.
123. Kajdy A, Niemiec T. Homocysteine metabolism disorders as a potential predictor of preeclampsia. *Ginekol Pol*. 2008; 79(11): 775-9
 124. Patrick TE, Powers RW, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. Homocysteine and folic acid are inversely related in black women with preeclampsia. *Hypertension*. 2004; 43(6): 1279-82.
 125. Herrmann W, Isber S, Obeid R, Herrmann M, Jouma M. Concentrations of homocysteine, related metabolites and asymmetric dimethylarginine in preeclamptic women with poor nutritional status. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43(10): 1139-46
 126. González M, Pérez C, Santiuste Puente LR, Desviat M, Ugarte ML, Pérez A et al. Estudio del polimorfismo C677T del gen MTHFR y las concentraciones plasmáticas de homocisteína. *Química Clínica*. 2005; 24(1): 41-45.
 127. Fernández M, Fernández G, Diez-Ewald M, Torres E, Vizcaíno G, Fernández N et al. Plasma homocysteine concentration and its relationship with the development of preeclampsia. Effect of prenatal administration of folic acid. *Invest Clin*. 2005; 46(2): 187-95
 128. Wen SW, Chen XK, Rodger M, White RR, Yang Q, Smith GN et al. Folic acid supplementation in early second trimester and the risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198(1): 45.e1-7
 129. Manizheh SM, Mandana S, Hassan A, Amir GH, Mahlisha KS, Morteza G. Comparison study on the effect of prenatal administration of high dose and low dose folic acid. *Saudi Med J*. 2009; 30(1): 88-97
 130. Holmes VA, Wallace JM, Alexander HD, Gilmore WS, Bradbury I, Ward M et al. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. *Clin Chem*. 2005; 51(3): 629-34.
 131. Napolitano PG, Wakefield CL, Elliott DE, Doherty DA, Magann EF. Umbilical cord plasma homocysteine concentrations at delivery in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2008; 48(3): 261-5
 132. Braekke K, Ueland PM, Harsem NK, Karlsen A, Blomhoff R, Staff AC. Homocysteine, cysteine, and related metabolites in maternal and fetal plasma in preeclampsia. *Pediatr Res* 2007; 62(3):319-24.
 133. Baksu A, Taskin M, Goker N, Baksu B, Uluocak A. Plasma homocysteine in late pregnancies complicated with preeclampsia and in newborns. *Am J Perinatol*. 2006; 23(1):31-5
 134. Ophir E, Dourleshter G, Hirsh Y, Fait V, German L, Bornstein J. Newborns of pre-eclamptic women: a biochemical difference present in utero. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006; 85(10): 1172-8.
 135. Stořkova V, Ivanov S, Mazneřkova V, Tsoncheva A. Serum homocysteine levels in pregnant women with preeclampsia. *Akush Ginekol (Sofiiia)*. 2005; 44(6): 16-9.
 136. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12

- levels with the severity of preeclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy*. 2009; 28(2): 190-200
137. Brown M, Hague W, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, et al. The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: Executive summary. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*. 2000; 40:133-138.
 138. Kuo V, Koumanantakis G, Gallery E. Proteinuria and its assessment in normal and hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1992; 167: 723-728.
 139. Redman C, Beilin L, Bonnar J, Wilkinson R. Plasma urate measurements in predicting fetal death in hypertensive pregnancy. *Lancet*. 1976; 1: 1370-1373.
 140. Chesley L. Diagnosis of preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 1985; 65: 423-425.
 141. Mazzali M, Hughes J, Kim Y, Jefferson J, Kang D, Gordon K, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension*. 2001; 38: 1101-1106.
 142. Lam C, Lim KH, Kang DH, Karumanchi SA. Uric acid and preeclampsia. *Semin Nephrol*. 2005; 25(1): 56-60.
 143. Bainbridge S. Increased Xanthine Oxidase in the Skin of Preeclamptic Women. *Reproductive Sciences* 2009; 16(5):468-478.
 144. Bainbridge S, Roberts J, von Versen-Höynck F, Koch J, Edmunds L, Hubel C. Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 297: C440-C450.
 145. Mejia Montilla J, Reyna Villasmil N, Torres Cepeda D, Peña-Paredes E. Concentraciones de ácido úrico en pacientes con preeclampsia y eclampsia. *Clínica e investigación en ginecología y obstetricia*. 2008; 35(5): 160-165.
 146. Reyna-Villasmil E, Torres-Cepeda D, Peña-Paredes E, Mejia-Montilla J, Reyna-Villasmil N, González-Rodríguez P. Ácido úrico como indicador pronóstico de severidad de la excreción urinaria de proteínas en 24 horas. *Gac Méd Caracas*. 2008; 116(3): 219-223.
 147. Roberts J, Bodnar L, Lain K, Hubel C, Markovic N, Ness R, Powers R. Uric Acid Is as Important as Proteinuria in Identifying Fetal Risk in Women With Gestational Hypertension. *Hypertension*. 2005; 46: 1263-1269
 148. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 2010; 44(10): 1125-1171.
 149. Iruretagoyena JI, Shah D. A case of severe preeclampsia leading to the diagnosis of de novo abnormal fatty acid metabolism and ACE gene deletion. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010; 32(7): 695-697.
 150. Ware-Jauregui S, Sanchez SE, Zhang C, Laraburre G, King IB, Williams MA. Plasma lipid concentrations in preeclamptic and normotensive Peruvian women. *Int J Gynaecol Obstet*. 1999; 67: 147-155.
 151. Sattar N, Bedomir A, Berry C, Shepherd J, Greer IA, Packard CJ. Lipoprotein subfraction concentrations in preeclampsia: pathogenic parallels to atherosclerosis. *Obstet Gynecol*. 1997; 89: 403-408.

152. Hubel CA, McLaughlin MK, Evans RW, Hauth BA, Sims CJ, Roberts JM. Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours postpartum. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174: 975-982.
153. Wakatsuki A, Ikenoue N, Okatani Y, Shinohara K, Fukaya T. Lipoprotein particles in preeclampsia: susceptibility to oxidative modification. *Obstet gynecol.* 2000; 96: 55-59.
154. Winkler K, Wetzka B, Hoffmann MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, et al. Triglyceride-rich lipoproteins are associated with hypertension in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 1162-1166.
155. Williams MA, Woelk GB, King IB, Jenkins L, Mahomed K. Plasma carotenoids, retinol, tocopherols, and lipoproteins in preeclamptic and normotensive pregnant Zimbabwean women. *Am J Hypertens.* 2003; 16: 665-672.
156. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. Divergent metabolic and vascular phenotypes in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: relevance of adiposity. *J Hypertens.* 2004; 22: 2177-2183.
157. Manten GTR, van der Hoek YY, Sikkema JM, Voorbij HAM, Hameeteman TM, Visser GHA, et al. The role of lipoprotein (a) in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Med Hypoth.* 2005; 64: 162-169.
158. Enquobahrie DA, Williams MA, Butler CL, Frederick IO, Miller RS, Luthy DA. Maternal plasma lipid concentrations in early pregnancy and risk of Preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2004; 17: 574-581.
159. Osorio JH. Metabolismo de los lípidos durante el embarazo. <http://www.encolombia.com/obstetricia51200metabolismo>.
160. Sattar N, Greer IA, Loudon J, Lindsay G, McConnell M, Shepherd J, et al. Lipoprotein subfraction changes in normal pregnancy: threshold effect of plasma triglyceride on appearance of small, dense low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2483-2491.
161. Munzel T, Harrison DG. Increased superoxide in heart failure a biochemical baroreflex gone awry. *Circulation.* 1999; 100:216-218.
162. Sattar N, Bendoric A, Berry C, Shepherd J, Greer IA, Packard CJ. Lipoprotein subfraction concentrations in preeclampsia: pathogenic parallels to atherosclerosis. *Obstet Gynecol.* 1997; 89: 403-408.
163. Ogura K, Miyatake T, Fukui O, Nakamura T, Kameda T, Yoshino G. Low-density lipoprotein particle diameter in normal pregnancy and preeclampsia. *J Atheroscler Thromb.* 2002; 9: 42-47.
164. Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis.* 2002; 162: 425-432.
165. Lorentzen B, Endresen MJ, Hovig T, Haug E, Henriksen T. Sera from preeclamptic women increases the content of triglycerides and reduce the release of prostacyclin in cultured endothelial cells. *Thromb Res.* 1991; 63:363-372

166. Hubel CA, McLaughlin MK, Evans RW, Hauth BA, Sims CJ, Roberts JM. Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours postpartum. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174: 975-982.
167. Var A, Kuscu NK, Koyuncu F, Uyanik BS, Onur E, Yildirim Y, et al. Atherogenic profile in Preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2003; 268: 45-47.
168. Cekmen MB, Erbagci AB, Balat A, Duman C, Maral H, Ergen K, et al. Plasma lipid and lipoprotein concentrations in pregnancy induced hypertension. *Clin Biochem.* 2003; 36: 575-578.
169. Sattar N, Bedomir A, Berry C, Shepherd J, Greer IA, Packard CJ. Lipoprotein subfraction concentrations in preeclampsia: pathogenic parallels to atherosclerosis. *Obstet Gynecol.* 1997; 89: 403-408.
170. Sattar N, Greer IA, Loudon J, Lindsay G, McConnell M, Shepherd J, et al. Lipoprotein subfraction changes in normal pregnancy: threshold effect of plasma triglyceride on appearance of small, dense low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2483-2491.
171. Munzel T, Harrison DG. Increased superoxide in heart failure a biochemical baroreflex gone awry. *Circulation.* 1999; 100: 216-218.
172. Ogura K, Miyatake T, Fukui O, Nakamura T, Kameda T, Yoshino G. Low-density lipoprotein particle diameter in normal pregnancy and preeclampsia. *J Atheroscler Thromb.* 2002; 9: 42-47.
173. Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis.* 2002; 162: 425-432.
174. Lorentzen B, Endresen MJ, Hovig T, Haug E, Henriksen T. Sera from preeclamptic women increases the content of triglycerides and reduce the release of prostacyclin in cultured endothelial cells. *Thromb Res.* 1991; 63: 363-372.
175. Ware-Jauregui S, Sanchez SE, Zhang C, Laraburre G, King IB, Williams MA. Plasma lipid concentrations in preeclamptic and normotensive Peruvian women. *Int J Gynaecol Obstet.* 1999; 67: 147-155.
176. Var A, Kuscu NK, Koyuncu F, Uyanik BS, Onur E, Yildirim Y, et al. Atherogenic profile in Preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 268:45-7.
177. Cekmen MB, Erbagci AB, Balat A, Duman C, Maral H, Ergen K, et al. Plasma lipid and lipoprotein concentrations in pregnancy induced hypertension. *Clin Biochem.* 2003; 36:575-578.
178. Lei KJ, Liu. Genomic DNA sequence for human C-reactive protein. *J Biol Chem.* 1985; 260(24): 13377-13383.
179. Shrive AK. Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat Struct Biol.* 1996; 3(4): 346-354.
180. Pepys MB, C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003; 111(12): 1805-12.
181. Black S. C-reactive Protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(47):48487-48490.

182. Calabro P. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2003; 108(16): 1930-1932.
183. Capelini F, Durazo F. La proteína C reactiva ultrasensible, un marcador de riesgo cardiovascular *Rev Mex Patol Clin*. 2008; 55(2): 55-58.
184. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*. 2001; 103: 1813-1818.
185. Koenig W et al. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham score. *Circulation*. 2004; 109:1349-1353.
186. Bautista LE, López-Jaramillo P, Vera LM, Casas JP, Otero AP, Guaracao AI. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J Hypertens*. 2001; 19(5): 857-861
187. Pearson TA et al. New AHA/CDC Guidelines Support the use of usCRP Testing in Intermediate Risk CVD Patients. *Circulation*. 2003; 107: 499-511.
188. Rifai N, Ridker PM. Proposed cardiovascular risk assessment algorithm using high sensitivity C-reactive protein and Lipid screen. *Clin Chem*. 2001; 47(1): 28-30.
189. Nissen SE et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352: 29-38.
190. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S and Lapaire O. Potential markers of preeclampsia – a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009; 7: 1-14.
191. De Jonge LL, Steegers EA, Ernst GD, Lindemans J, Russcher H, Hofman A, Jaddoe VW, C-reactive protein levels, blood pressure and the risks of gestational hypertensive complications: the Generation R Study. *J Hypertens*. 2011; 29(12): 2413-2421.
192. Can M, Sancar E, Harma M, Guven B, Mungan G, Acikgoz S Inflammatory markers in preeclamptic patients. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49(9): 1469-1472.
193. Adali E, Kurdoglu M, Adali F, Cim N, Yildizhan R, Kolusari A. The relationship between brachial artery flow-mediated dilatation, high sensitivity C-reactive protein, and uterine artery doppler velocimetry in women with pre-eclampsia. *J Clin Ultrasound*. 2011; 39(4): 191-197.
194. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Bekő G, Karádi I, Prohászka Z, Molvarec JR. Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9: 1-9.
195. Ertas IE, Kahyaoglu S, Yilmaz B, Ozel M, Sut N, Guven MA, Danisman N Association of maternal serum high sensitive C-reactive protein level with body mass index and severity of pre-eclampsia at third trimester *J Obstet Gynaecol Res*. 2010; 36(5): 970-977.
196. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12

- levels with the severity of preeclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy*. 2009; 28(2): 190-200.
197. Hawfield A, Freedman BI. Pre-eclampsia: the pivotal role of the placenta in its pathophysiology and markers for early detection *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2009; 3(1): 65–73.
 198. Scholl TO, Chen X, Goldberg GS, Khusial PR, Stein TP. Maternal diet, C-reactive protein, and the outcome of pregnancy. *J Am Coll Nutr*. 2011; 30(4): 233-240.
 199. Kim H, Hwang JY, Ha EH, Park H, Ha M, Lee SJ, Hong YC, Chang N. Association of maternal folate nutrition and serum C-reactive protein concentrations with gestational age at delivery. *Eur J Clin Nutr*. 2011; 65(3): 350-356.
 200. Boutsikou T, Mastorakos G, Kyriakakou M, Margeli A, Hassiakos D, Papassotiriou I, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A. Circulating Levels of Inflammatory Markers in Intrauterine Growth Restriction. *Mediators of Inflammation*. 2010; 10(11): 55-57.
 201. Kvehaugen AS, Dechend R, Ramstad HB, Troisi R, Fugelseth D, Staff AC. Endothelial function and circulating biomarkers are disturbed in women and children after preeclampsia *Hypertension*. 2011; 58(1): 63-69.
 202. Vallejo-Vaz AJ, Guisado ML, García-Junco PS, Andreu EP, Morillo SG, Ortiz JV. Differences in the prevalence of metabolic syndrome and levels of C-reactive protein after puerperium in women with hypertensive disorders during pregnancy. *Hypertens Res*. 2010; 33(10): 1012-1017.
 203. Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P, Lopez-Jaramillo P. Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2001; 75(3): 243-249.
 204. García R, Celedón J, Alarcón M, Luengas C, Silva F, López-Jaramillo P. Concentraciones aumentadas de PCR e IL6 y una menor vasodilatación mediada por flujo temprano en la gestación predicen el desarrollo de hipertensión inducida por el embarazo. *Acta Med Colomb*. 2005; 30: 92-99.
 205. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010 Sep 3. [Epub ahead of print]
 206. Manuck T, Branch DW, Lai Y, Sibai B, Spong CY, Wendel G Jr, Wenstrom K, Samuels P, Caritis SN, Sorokin Y, Miodovnik M, O'Sullivan MJ, Conway D, Wapner RJ; Antiphospholipid antibodies and pregnancy outcomes in women heterozygous for factor V Leiden. *J Reprod Immunol*. 2010; 85(2): 180-185.
 207. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and preeclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11: 309-316.
 208. El-Roely A, Collicher N. Definition of Normal Autoantibody levels in apparently healthy population. *Obstet Gynecol*. 1988; 72: 596-602.
 209. Fields RA, Toubbeh H, Scarles RP. The Prevalence of the Anticardiolipin antibodies in healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 1989; 16: 623-625.

210. Branch D, Andres R, Digre K et al. The association of Antiphospholipid Antibodies with Severe Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1989; 73:541-5.
211. Pampus van MG, Wolf H, Buller HR et al. Underlying disorders associated with severe Preeclampsia and Hellp syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 175: s 26.
212. Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A. Prospective Studies of the Association Between Anticardiolipin Antibody and Outcome of Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1995; 86:555-559.
213. Kupfermink M, Eldor A, Steinman N et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Eng J Med.* 1999; 340: 9-13
214. Faden, D. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in a general obstetric population: preliminary results on the prevalence and correlation with pregnancy outcome. Anti-B2 glycoprotein I antibodies are associated with some obstetrical complications, mainly preeclampsia-eclampsia. *Europ Jour Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997; 73: 37- 42.
215. Katano K, Aoki K, Sasa H et al. B2-Glycoprotein I dependent anticardiolipin antibodies as a predictor of adverse pregnancy outcomes in healthy pregnant women. *Hum Reprod.* 1996; 11: 509-512.
216. Rajah SB, Moodley J, Pudifin D et al. Anticardiolipin Antibodies in Hypertensive emergencies. *Clin and exper hypertens pregnancy.* 1990; B9: 267-77.
217. Ruíz Muñoz David, *Manual de Estadística* Ed. Eumet.net Barcelona 2004
218. Johnson R.A., Wichern D.W. *Applied Multivariate Statical Analysis* 4^a Ed. John Wiley New Jersey 1998.
219. Onuegbu AJ, Olisekodiaka JM, Udo JU, Umeononihu O, Amah UK, Okwara JE, Atuegbu C. Evaluation of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipid profile in southeastern Nigerian women with pre-eclampsia. *Med Princ Pract.* 2015; 24(3): 276-279.
220. Kestlerová A, Feyereisl J, Frisová V, Mechurová A, Sula K, Zima T, Belacek J, Madar J. Immunological and biochemical markers in preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2012; 96(1-2): 90-94.
221. Matthiensen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. Immunology of preeclampsia. *Chem Immunol Allergy.* 2005; 89: 49-61.
222. Martínez-Varea A, Pellicer B, Perales-Marín A, Pellicer A. Relationship between maternal immunological response during pregnancy and onset of Preeclampsia. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 1-15.
223. Seremak-Mrozikiewicz A. The significance of folate metabolism in complications of pregnant women. *Ginekol Pol.* 2013; 84(5):377-384.
224. Endeshaw M, Abebe F, Bedimo M, Asart A. Diet and Pre-eclampsia: a prospective multicentre case-control study in Ethiopia. *Midwifery.* 2015; 31(6):617-624.

225. Anderson C, Ralph J, Wright M, Linggi B, Ohm J. DNA methylation as a biomarker for preeclampsia. *Biol Res Nurs*. 2014; 16(4): 409-420.
226. Choudhury M, Friedman J. Epigenetics and microRNAs in Preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2012; 34(5): 334-341.
227. He J, Zhang A, Fang M, Fang R, Ge J, Jiang Y, Zhang H, Han C, Ye X, Yu D, Huang H, Liu Y, Dong M. Methylation levels at IGF2 and GNAS DMRs in infants born to preeclamptic pregnancies. *BMC Genomics*. 2013; 14(472): 1-7.
228. Louwen F, Muschol-Steinmetz C, Reinhard J, Reitter A, Yuan J. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in Preeclampsia. *Oncotarget*. 2012; 3(8): 759-773.
229. Schroeder D, Blair J, Lott P, Ken H, Hong D, Crary F, Ashwood P, Walker C, Korf I, Robinson W, LaSalle J. The human placenta methylome. *PNAS*. 2013; 110(15): 6037-6042.
230. Anton L, Brown A, Bartolomei M, Elovitz M. Differential methylation of genes associated with cell adhesion in preeclamptic placentas. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e100148.
231. Yuen R, Chen B, Blair J, Robinson W, Nelson D. Hypoxia alters the epigenetic profile in cultured human placental trophoblasts. *Epigenetics*. 2013; 8(2): 192-202.
232. Carty D, Siwy J, Brennand J, Zürbig P, Mullen W, Franke J, McCulloch J, North R, Chappell L, Mischak H, Poston L, Dominiczak A, Delles C. Urinary proteomics for prediction of Preeclampsia. *Hypertension*. 2011; 57(2): 561-569.
233. Liu C, Zhang N, Yu H, Chen Y, Liang Y, Deng H, Zhang Z. Proteomic analysis of human serum for finding pathogenic factors and potential biomarkers in Preeclampsia. *Placenta*. 2011; 32(2): 168-174.
234. Shi Z, Long W, Zhao C, Guo X, Shen R, Ding H. Comparative proteomics analysis suggests that placental mitochondria are involved in the development of Pre-eclampsia. *PLoS ONE*. 2013; 8(5): e64351.
235. Mrozikiewicz P, Bogacz A, Omielanczyk M, Wolski H, Bartkowiak-Wieczorek J, Grzeskowiak E et al. The importance of rs1021737 and rs482843 polymorphisms of cystathionine gamma-lyase in the etiology of preeclampsia in the Caucasian population. *Ginekol Pol*. 2015; 86(2): 119-125.
236. Wang X, Jiang F, Liang Y, Xu L, Li H, Liu Y et al. Interleukin-1 β -31C/T and -511T/C polymorphisms were associated with Preeclampsia in Chinese han population. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e106919.
237. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et. al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(16): 6062-6067.
238. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology*. 2009; 10(11): R130.

239. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. 2003; 13: 2498-2504.
240. Xiang Y, Cheng Y, Li, Xiaotian, Li Q, Xu J. Up-regulated expression and aberrant DNA methylation of LEP and SH3PXD2A in Preeclampsia. *PLoS ONE*. 2013; 8(3): 1-9.
241. StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
242. Hoegh AM, Borup R, Nielsen FC, Sørensen S, Hviid TVF. Gene Expression Profiling of Placentas Affected by Pre-Eclampsia. *J Biomed Biotechnol*. 2010; ID 787545:11.
243. Winkler K, Contini C, Pecks U, Hoffmann MM, Pütz G. Low density lipoprotein composition during normal pregnancy and in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2015; 5(1): 69.
244. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Undagawa Y. Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placenta tissue derived from early and late onset severe preeclampsia. *Placenta*. 2007; 28(5-6): 487-97
245. Said J, G. Dekker G. Pre-eclampsia and thrombophilia. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2003; 17(3): 441–458
246. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod*. 2006; 74:218-29.
247. Ichiyanagi K, Okada N. Mobility Pathways for Vertebrate L1, L2, CR1, and RTE Clade Retrotransposons. *Mol Biol Evol*. 2001; 25(6): 1148–1157.
248. Khazina E, Weichenrieder O. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. *PNAS*. 2009; 106(3): 731–736.
249. Kellis M, Wold B, Snyder MP, Bernstein BE, Kundaje A, Marinov GK, Ward LD et al. Defining functional DNA elements in the human genome. *PNAS*. 2014; 111(17): 6131-6138.
250. Perrin D, Ballestar E, Fraga MF, Frappart L, Esteller M, Guerin JF, Dante R. Specific hypermethylation of LINE-1 elements during abnormal overgrowth and differentiation of human placenta. *Oncogene*. 2007; 26: 2518-2524.
251. Bell MJ, BSN RN, Conley YP. A systematic review of endoglin gene expression in Preeclampsia. *Biol Res Nurs*. 2013; 15(2): 129-136.
252. Toft JH, Lian IA, Tarca AL, Erez O, Espinoza J, Eide IP, Bjorge L, Sun C, Draghici S, Romero R, Austgulen R. Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008; 21(4): 267-273.
253. Van Der Hoorn ML, Keijser R, Ris-Stalpers C, Afink G, Claas FH, Van Der Post JA, Scherjon SA. Increased EBI3 expression in placentas of preeclamptic patients. *J Reprod Immunol*. 2010; 81: 1-61.
254. Reyna-Villasmil E, Briceño-Pérez C, Torres-Cepeda D. Inmunología, inflamación y Preeclampsia. *Rev Obst Ginecol Ven*. 2009; 69(2): 97-110.

255. Devergne O, Coulomb-L'Herminé A, Capel F, Moussa M, Capron F. "Expression of the Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol.* 2001; 159(5): 1763-1776
256. Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe preeclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9(107): 1-12.
257. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vartun A, Acharya G. Differential placental gene expression in severe Preeclampsia. *Placenta.* 2009; 30: 424-433.
258. Dijke PT, Arthur HM. Extracellular control of TGF β signaling in vascular development and disease. *Nature Reviews.* 2007; 8: 857-869.
259. Okano M, Yamamoto H, Ohkuma H, Kano Y, Kim H, Nishikawa S et al. Significance of INHBA expression in human colorectal cancer. *Oncology.* 2013; 30(6): 2803-2908.
260. Oshima T, Yoshihara K, Aoyama T, Hasegawa S, Sato T, Yamamoto N et al. Relation of INHBA gene expression to outcomes in gastric cancer after surgery. *Anticancer Research.* 2014; 34(5): 2303-2309.
261. Guo J, Tian T, Lu D, Xia G, Wang H, Dong M. Alterations of maternal serum and placental follistatin-like 3 and myostatin in pre-eclampsia. *J Obstet Gynecol Res.* 2012; 38(7): 988-996.
262. Keinrouweler CE, Van Uitert M, Moerland PD, Ris-Stalpers C, Van der Post JA, Afink GB. Differentially expressed genes in the pre-eclamptic placenta: A systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2013; 8(7): 1-9.
263. Ajayi F, Kongoasa N, Gaffey T, Asmann YW, Watson WJ, Baldi A, Lala P, Shrinidhar V, Brost B, Chien J. Elevated expression of serine protease Htra1 in Preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion. *American J Obstet Gynecol.* 2008; 199(5): 557e1-557e10
264. Inagaki A, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inuzuka H, Miyamura H, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Up-regulation of HTRA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia. *Placenta.* 2012; 33: 919-926.
265. Wang L, Cheong M, Lee Y, Lee M, Chen H. High-Temperature Requirement Protein A4 (HtrA4) suppresses the fusogenic activity of Syncytin-1 and promotes trophoblast invasion. *Molecular and Cellular Biology.* 2012; 32(18): 3707-3717.
266. Iciek R, Wender-Ozegowska E, Zawiejska A, Mikolajczak P, Mrozikiewicz PM, Pietryga M, Brazert J. Placental leptin and its receptor genes expression in pregnancies complicated by type 1 diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64(5): 579-585.
267. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: The role of antiangiogenic factor and implications for later cardiovascular disease. *Circulation.* 2011; 123:2856-2869.

268. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001; 81(8): 1143-1152.
269. Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, Buhimschi C, Huang SJ, Krikun G, Schatz F. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol.* 2008; 172(6):1571-1579.
270. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology.* 2009; 24:147-158.
271. Vascotto C, Salzano AM et al. Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia. *J Proteome Res.* 2007; 6(1): 160-170.
272. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Undagawa Y. Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placenta tissue derived from early and late onset severe preeclampsia. *Placenta.* 2007; 28(5-6):487-497.
273. Park WS, Kim NR, Han J. Patent application: Method of screening placental protein responsible for pathophysiology of preeclampsia, and marker for early diagnosis a prediction of preeclampsia. <http://www.fags.org/patents/app/20090023168-ixzz0Z9lfbZZd>.
274. Hoegh AM, Borup R, Nielsen FC, Sørensen S, Hviid TV. Gene expression profiling of placentas affected by pre-eclampsia. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 787545.
275. Rasanen J, Girsan A, Lu X, Lapidus JA, Standley M, Reddy A, Dasari S, Thomas A, Jacob T, Pouta A, Surcel HM, Tolosa JE, Gravett MG, Nagalla SR. Comprehensive maternal serum proteomic profiles of preclinical and clinical preeclampsia. *J Proteome Res.* 2010; 9(8): 4274-4281.
276. Morrison AC, Srinivas SK, Elovitz MA, Puschett JB. Genetic variation in solute carrier genes is associated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 Aug 4. [Epub ahead of print]
277. Jin H, Ma KD, Hu R, Chen Y, Yang F, Yao J, Li XT, Yang PY. Analysis of expression and comparative profile of normal placental tissue proteins and those in preeclampsia patients using proteomic approaches. *Anal Chim Acta.* 2008; 629(1-2): 158-164.
278. Nagy B, Füle T, Tarca AL, Karászi K, Schönleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigó JJr, Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG. Várkonyi T Microarray Profiling Reveals That Placental Transcriptomes of Early-onset HELLP Syndrome and Preeclampsia Are Similar. *Placenta* 2010 Jun 11. [Epub ahead of print]
279. Pozharny Y, Lambertini L, Clunie G, Ferrara L, Lee MJ. Epigenetics in women's health care. *Mt Sinai J Med.* 2010; 77(2): 225-235.
280. Galbiati S, Causarano V, Pinzani P, Francesca S, Orlando C, Smid M, Pasi F, Castiglioni MT, Cavoretto P, Rovere-Querini P, Pedroni S, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of a panel of circulating DNA, RNA and protein

- potential markers for pathologies of pregnancy. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48(6):791-794.
281. Hagen JB. The origin of bioinformatics. *Nat Rev Genet*. 2000; 1(3):231-6.
 282. Kohane IS. Bioinformatics and clinical informatics: the imperative to collaborate. *J Am Med Inform Assoc* 2000; 7(5):512-516.
 283. Coltell Óscar, Arregui María, Fabregat Antonio, Portolés Olga. Integration of clinical and biological data in clinical practice using bioinformatics. *Rev Méd Chile*. 2008; 136: 640-647
 284. Collins FS, Mckusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA*. 2001; 285: 540-554.
 285. Knaup P, Ammenwerth E, Brandner R, Brigl B, Fischer G, Garde S et al. Towards clinical bioinformatics: advancing genomic medicine with informatics methods and tools. *Methods Inf Med*. 2004; 43: 302-307.
 286. Hanai T, Hamada H, Okamoto M. Application of bioinformatics for DNA microarray data to bioscience, bioengineering and medical fields. *J BiosciBioeng*. 2006; 101: 377-384.
 287. Van Bemmelen JH, Musen MA (eds.) *Handbook of Medical Informatics*. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag; 1997.
 288. Sackman H. *Biomedical Information Technology. Global Social Responsibilities for the Democratic Age*. San Diego, CA (USA): Academic Press; 1997.
 289. Maojo V, Martin F, Crespo J, Billhardt H. Theory, abstraction and design in medical informatics. *Methods Inf Med*. 2002; 41: 44-50.
 290. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Home Page, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. A Science Primer, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>.
 291. Hagen JB. The origins of bioinformatics. *Nat Rev Genet*. 2000; 1: 231-6.
 292. Gibas C, Jambeck P. *Developing bioinformatics computer skills*. 1st ed. Sebastopol, CA (USA): O'Reilly; 2001; 3-4. Disponible en <http://books.google.es/booksid>.
 293. Kanehisa M, Bork P. Bioinformatics in the post-sequence era. *Nat Genet*. 2003; 33: 305-10.
 294. Polsani S, Phipps E, Jim B. Emerging new biomarkers of Preeclampsia. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2013; 20(3): 271-279.
 295. Tejera E, Bernardes J, Rebelo I. Preeclampsia: a bioinformatics approach through protein-protein interaction networks analysis. *BMC Systems Biology*. 2012; 7(97): 1-9.
 296. Tejera E, Bernardes J, Rebelo I. Co-expression network analysis and genetic algorithms for gene prioritization in Preeclampsia. *BMC Med Genomics*. 2013; 6(51): 1-10.
 297. Triche E, Uzun A, DeWan A, Kurihara I, Liu J, Occhiogrosso R, Shen B, Parker J, Padbury J. Bioinformatic approach to the genetics of Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*. 2014; 123(6): 1155-1161.

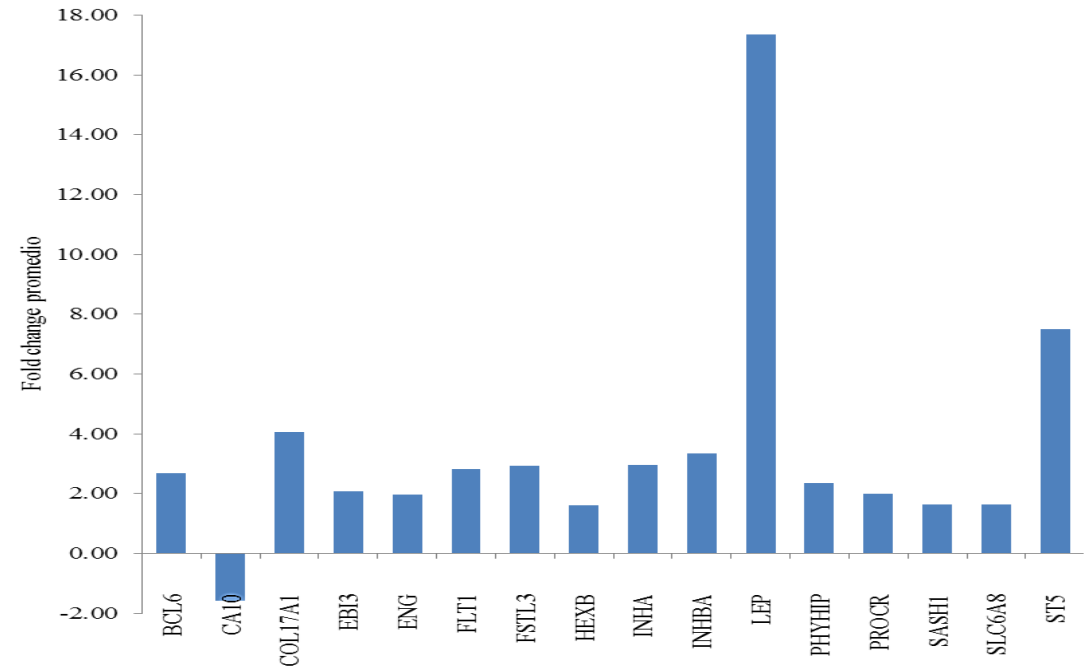
298. Walentin K, Hinze C, Werth M, Haase N, Varma S, Morell R, Aue A, Pötschke E, Warburton D, Qiu A, Barasch J, Purfürst B, Dieterich C, Popova E, Bader M, Dechend R, Staff A, Yurtdas Z, Kilic E, Schmidt-Ott K. A Grhl2-dependent gene network controls trophoblast branching morphogenesis. *Development*. 2015; 142(6): 1125-1136.
299. Valderrama A, Gallo D, Cifuentes R ¿Cuáles son los avances de la genómica y la proteómica en el tamizaje y/o predicción de la preeclampsia? *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2011; 62: 64-70.

ANEXOS

Anexo 1. Genes seleccionados, P -valor y *Fold change* de en los 7 artículos científicos.

Gen	Equobahrie <i>et al.</i> 2008	Hansson <i>et al.</i> 2006	Hoegh <i>et al.</i> 2010	Nishizawa <i>et al.</i> 2007	Reimer <i>et al.</i> 2002	Winn <i>et al.</i> 2009	Herse <i>et al.</i> 2007
	Fold change	P-valor	Significance weights	Fold change	P-valor	Fold change	Fold change
SASH1				1,56	0,041		
LEP	5,52	0,0020		2,94	0,025	0,00000509	43,6
FLT1	2,76	0,0005				0,00001330	11,79
						0,00007120	2,87
EBI3	2,07	0,0127				0,00015200	2,81
PROCR	1,99	0,0043	1.72			0,00007410	
INHA	1,88	0,0002				4,4	2,60
BCL6	1,78	0,0154				5,5	2,60
HEXB	1,60	0,0120				0,00001180	1,84
ST5			1.80			7,5	1.69
SLC6A8			0.39				
INHBA				2,06	0,007	0,00000440	1,65
COL17A1				1,50	0,039		3,89
ENG						0,00027500	2,57
CA10						0,00004180	1,97
PHYHIP							-1,57
						3,4	1,32
FSTL3	1,86	0,0220					

Anexo 2. Distribución de Fold change promedio para los 16 genes asociados



Anexo 3. Información general sobre genes asociados seleccionados.

Símbolo	Nombre en inglés	Ubicación	Funciones y procesos
BCL6	<i>B-cell CLL/lymphoma 6</i>	3q27	Involucrado en la regulación de respuesta inmune, en la regulación negativa de apoptosis de las células B y del crecimiento celular.
CA10	<i>Carbonic anhydrase X</i>	17q21.33	Cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono en varios procesos fisiológicos.
COL17A1	<i>collagen, type XVII, alpha 1</i>	10q24.3	Componente estructural de hemidesmosomas, media la adhesión de queratinocitos a la membrana subyacente.
EBI3	<i>Epstein-Barr virus induced 3</i>	19p13.3	Al formar interleucina 27 (IL-27) regula las células T y la respuesta inflamatoria.
ENG	<i>Endoglin</i>	9q33-q34.1	Regulación negativa de la proliferación celular endotelial y la modelación de vasos sanguíneos.
FLT1	<i>Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular Endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)</i>	13q12	Interactúa con el factor de crecimiento endotelial vascular y se une al factor de crecimiento de la placenta. Juega un papel importante en angiogénesis y vasculogénesis. Se expresa en células endoteliales vasculares y células del trofoblasto
FSTL3	<i>Follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)</i>	19p13	Es una proteína de unión a activina que regula positivamente la adhesión célula-célula y la transcripción.
HEXB	<i>Hexosaminidase B (beta polypeptide)</i>	5q13	Involucrado en unión a azúcar, metabolismo de carbohidratos, desarrollo celular y de los sistemas inmune y linfático.
INH A	<i>Inhibin, alpha</i>	2q33-q36	Regula negativamente la secreción de la hormona folículo estimulante, regula la proliferación celular, apoptosis, respuesta inmune y secreción hormonal
INHBA	<i>Inhibin, beta A</i>	7p15-p13	Inhibe la secreción de FSH en la pituitaria, regula negativamente la proliferación celular, tiene actividad supresora de tumores. Dado que su expresión en tejidos gonadales y extragonadales puede variar de manera tejido-específica, se ha propuesto que puede ser un factor de crecimiento/diferenciación y una hormona. Tiene actividad de citoquina.
LEP	<i>Leptin</i>	7q31.3	Involucrado en metabolismo de carbohidratos, desarrollo de la placenta, respuesta inmune e inflamatoria, hematopoyesis, angiogénesis y curación de heridas
P HYHIP	<i>Phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein</i>	8p21.3	Juega un papel en el desarrollo del sistema central

PROCR	<i>Protein C receptor, endothelial</i>	20q11.2	Está involucrado en la respuesta inmune, crecimiento y proliferación celular, respuesta inflamatoria y coagulación sanguínea –promueve la activación de la proteína C-.
SASH1	<i>SAM and SH3 domain containing 1</i>	6q24.3	Función de unión de proteínas y actividad supresora de tumores.
SLC6A8	<i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8</i>	Xq28	Transporta creatina dentro y fuera de la célula, está involucrada en el metabolismo del nitrógeno celular, contracción muscular y transporte de neurotransmisores.
ST5	<i>Suppression of tumorigenicity 5</i>	22p15	Regula la cinasa MAPK1/ERK2, está relacionada con la morfología y crecimiento celular, tiene función de unión a proteína.

Anexo 4. Información general sobre genes control seleccionados.

Símbolo	Nombre en inglés	Ubicación	Funciones y procesos
A2LD1	<i>AIG2-like domain 1</i>	13q32.3	Ayuda en la degradación proteolítica de la fibrina entrecruzada rompiendo isodipéptido L-gama-glutamyl-L-epsilon-lisina, un subproducto de la degradación de la fibrina. La reacción catalizada por la gama-glutamylaminociclotransferasa codificada produce 5-oxo-L-prolina y una alquilamina libre.
ABO	<i>ABO blood group (transferase A, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase; transferase B, alpha 1-3-galactosyltransferase)</i>	9q34.2	Proteína relacionada con el primer sistema de grupo sanguíneo descubierto, ABO. El alelo que esté presente en el individuo determina el grupo sanguíneo. Individuos con los alelos A, B y AB expresan actividad glicosiltransferasa que convierte el antígeno H en antígeno A o B.
C17orf48	<i>Chromosome 17 open reading frame 48</i>	17p13.1	ADP-ribosa/CDP-alcohol pirofosfatasa.
CHAC1	<i>ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)</i>	15q15.1	ChaC, similar a regulador de transporte de cationes isoforma 1.
CHAC2	<i>ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)</i>	2p16	ChaC, regulador de transporte de cationes homólogo 2.
CPPED1	<i>Calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1</i>	16p13.12	Contiene dominio fosfoesterasa similar a calcineurina containing 1
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>	1p35-p34	Responsable de la hidrólisis de amidas de ácidos grasos primarias y secundarias, incluyendo los compuestos neuromodulatorios anandamida y oleamida.
FAAH2	<i>Fatty acid amide hydrolase 2</i>	Xp11.21	Cataliza la hidrólisis de una amplia gama de lípidos bioactivos, incluyendo aquellos de las tres principales clases de amidas de ácidos grasos. Esta enzima tiene una preferencia por cadenas acil monoinsaturadas como sustrato.
KIAA1161	<i>KIAA1161</i>	9p13.3	Proteína hipotética LOC57462.

MMP12	<i>Matrix metalloproteinase 12</i>	11q22.3	Esta enzima degrada elastina soluble e insoluble. Puede que participe en la formación de aneurisma y estudios en ratones muestran su papel en el desarrollo de enfisema.
MPPED1	<i>Metallophosphoesterase domain containing 1</i>	22q13.31	Contiene dominio metalofosfoesterasa 1
MPPED2	<i>Metallophosphoesterase domain containing 2</i>	11p13	Contiene dominio metalofosfoesterasa 2.
PDCD11	<i>Programmed cell death 11</i>	10q24.33	Es una proteína de unión NF-kappa-B (NFKB1; 164011) que colocaliza con ARN U3 (MIM 180710) en el nucléolo y es requerida para la maduración del ARNr y la generación del ARNr 18S.
QRSL1	<i>Glutaminyl-tRNA synthase</i>	6q21	Glutaminil-ARNt sintasa.
TMEM62	<i>Transmembrane protein 62</i>	15q15.2	Proteína transmembrana 62.
VPS29	<i>Vacuolar protein sorting 29 homolog (S. cerevisiae)</i>	12q24	El gen pertenece a un grupo de genes que clasifican proteínas vacuolares (VPS) que, cuando son funcionalmente afectados, se interrumpe la distribución eficiente de hidrolasas vacuolares. Esta proteína es un componente de un gran complejo multimérico, llamado complejo retrómero, que está involucrado en el transporte retrógrado de proteínas de los endosomas a la red trans-Golgi.

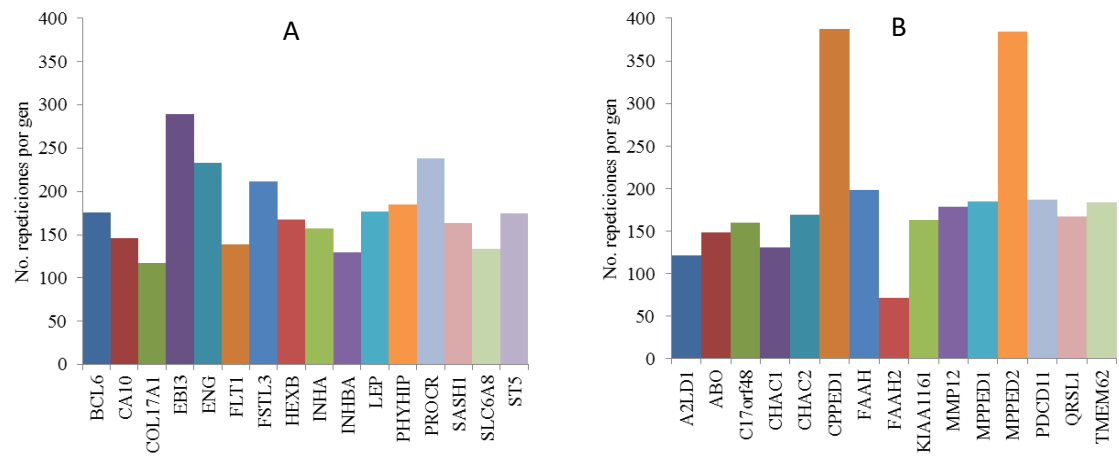
Anexo 5. Caracterización de genes asociados en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen.

Gen	Locu s	No. Exones	No. exones codificantes	No. Genes región 100-	No. Genes región 100+	No. Rep. región 100-	No. Rep. región 100+	CpG región100-	CpG región100+
NDRG1	8q 24.22	16	15	0	0	170	173	0	149
SPAG4	20q 11.22	12	12	2	5	191	209	194	138
JAG1	20p 12.2	26	26	2	2	132	134	0	255
TREM1	6p 21.1	4	4	6	3	147	154	0	241
HTRA4	8p 11.22	9	9	1	2	185	201	77	152
CRH	8q13. 1	2	1	3	4	205	173	50	0
HTRA1	10q 26.13	9	9	0	0	147	182	301	0
PVRL4	1q 23.3	9	9	5	7	257	202	88	313
KRT19	17q 21.2	6	6	6	6	151	173	0	104
SLCO2A1	3q 22.1 - 3q 22.2	14	14	2	4	188	115	172	93
RDH13	19q 13.42	7	7	6	10	224	196	130	657
SH3PXD2A	10q 24.33	14	14	1	2	153	154	286	110

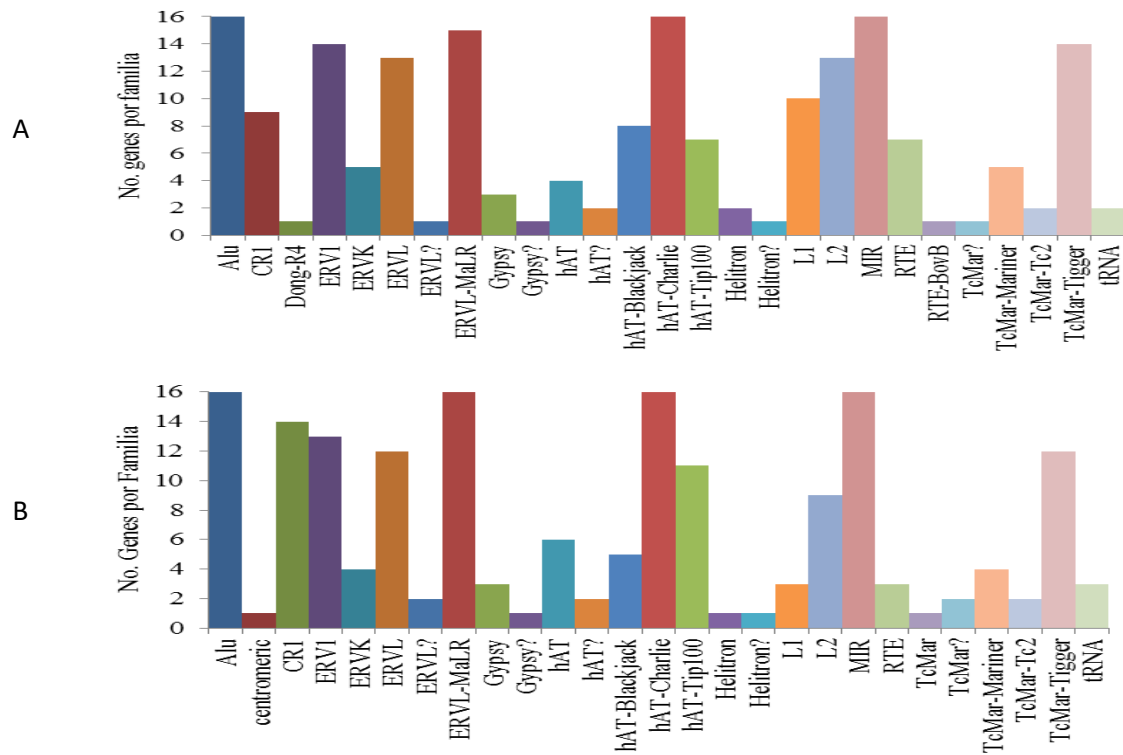
Anexo 5.1. Continuación: caracterización de genes asociados en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen.

Gen	Locus	No. Exones	No. exones codificantes	No. Genes región 100-	No. Genes región 100+	No. Rep. región 100-	No. Rep. región 100+	CpG región100-	CpG región100+
BCL6	3q27.3	10	8	1	0	142	144	49	0
CA10	17q21.3 3-q22	10	9	2	1	199	217	72	61
COL17A1	10q24.3 3 - 10q25.1	56	55	0	0	130	125	200	244
EBI3	19p13.3	5	5	3	6	297	271	578	482
ENG	9q34.11	15	15	1	6	271	193	0	301
FLT1	13q12.2 - 13q12.3	30	30	1	1	145	133	1908	514
FSTL3	19p13.3	5	5	6	6	159	241	160	56
HEXB	5q13.3	14	14	1	0	129	138	971	125
INHA	2q35	2	2	0	0	111	158	0	26
INHBA	7p14.1	3	2	2	1	140	143	272	255
LEP	7q32.1	3	2	2	1	132	103	131	53
PHYHIP	8p21.3	5	4	4	7	158	140	0	44
PROCR	20q11.2 2	4	4	7	3	231	232	593	476
SASH1	6q24.3	20	20	2	3	149	165	0	44
SLC6A8	Xq28	13	13	2	4	148	135	593	476
ST5	11p15.4	20	19	5	6	140	146	158	285

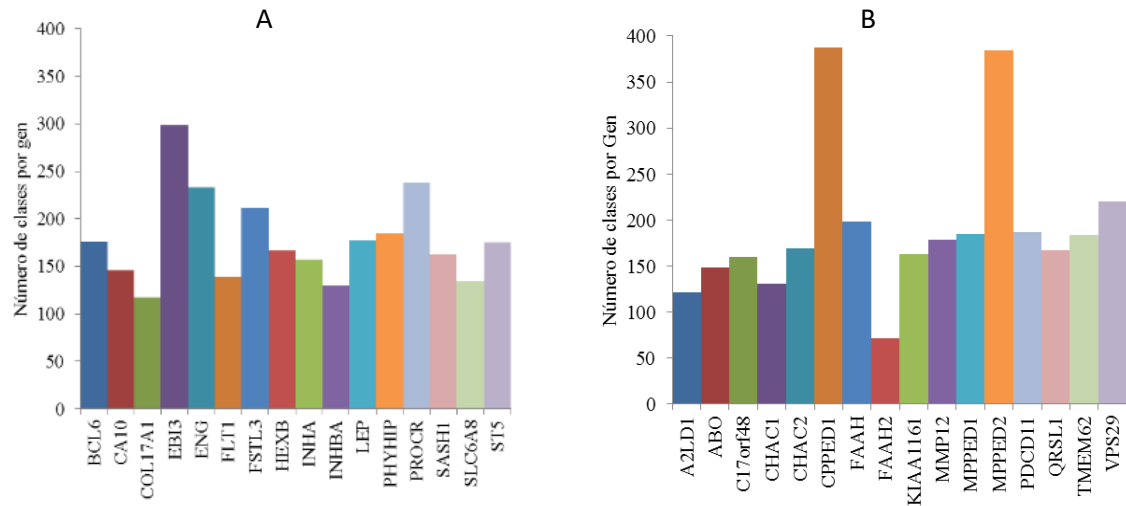
Anexo 6. Distribución del número de elementos repetidos por cada gen asociado A) y control B). Los genes asociados no muestran muchas diferencias, mientras que los controles CPPED1 y MPPED2 son los que más repeticiones tienen.



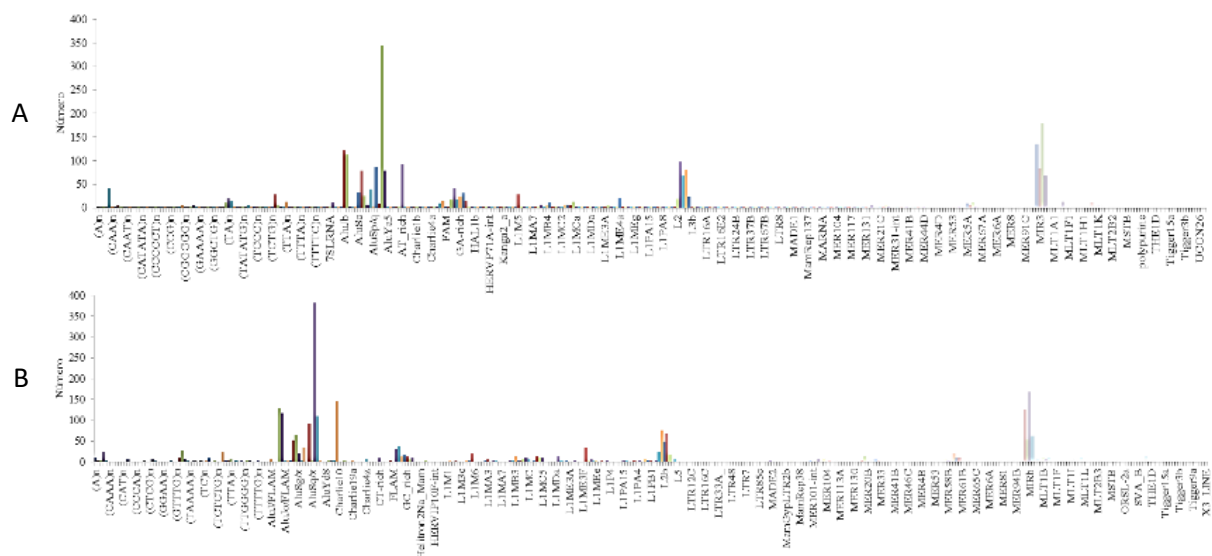
Anexo 7. Distribución del número de genes por cada familia. Todos los genes A) asociados y B) control, contienen familias en común –Alu, ERV, hAT, L1, L2, Mir, TcMar-, pero las demás son particulares a pocos genes.



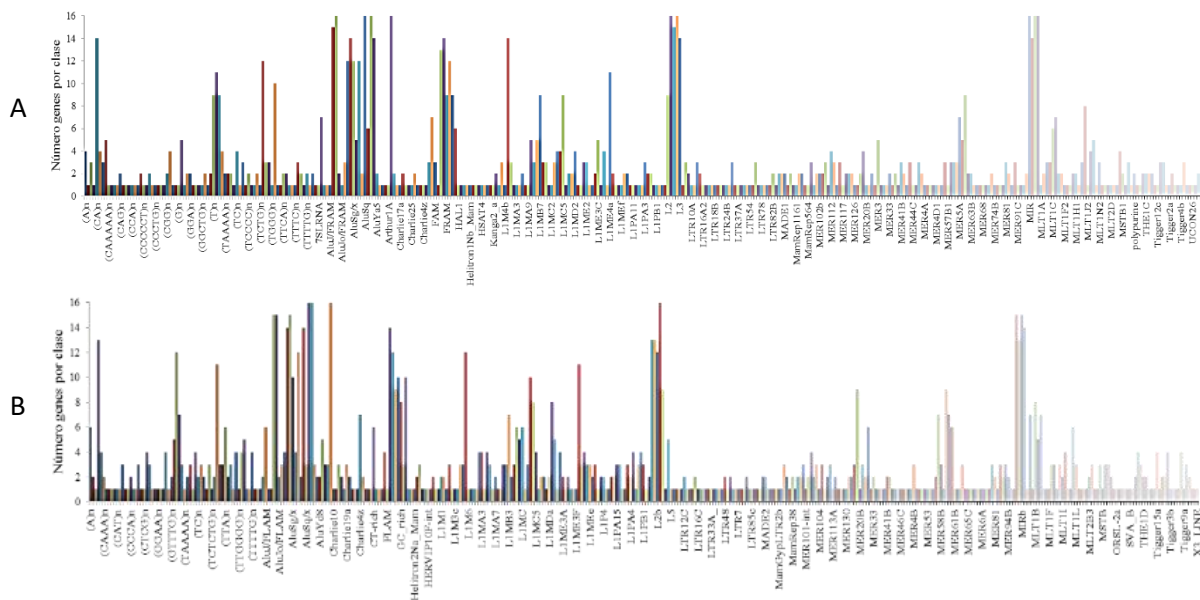
Anexo 8. Distribución del número de clases por cada gen A) asociado y B) control. Los genes asociados no muestran muchas diferencias, mientras que los controles CPPED1 y MPPED2 se distinguen por ser los más diversos en cuanto a esta variable.



Anexo 9. Distribución del número de genes por cada clase. Todos los genes A) asociados y B) control, contienen pocas clases en común, la mayoría de clases son particulares a uno o dos genes.



Anexo 10. Número de integrantes de cada clase en los 16 genes A) asociados y los 16 genes B) control. En ambos grupos son aproximadamente 15 las clases numerosas, las demás tienen pocos integrantes.



Anexo 11. Ponencias y artículos de investigación realizados en el desarrollo del trabajo



COMPLEJIDAD DE LAS REDES DE INTERACCIÓN EN GENES ASOCIADOS A PREECLAMPSIA.

Alejandra Rodríguez¹, José María Satizábal¹, Adalberto Sánchez¹, Julio Montoya^{1,2}, Felipe García Vallejo¹.

1. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia. 2. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Occidente. Cali. Colombia

RESUMEN

La Preeclampsia es un desorden multisistémico estudiado ampliamente por ser la principal causa de mortalidad materna tanto en Colombia como en el mundo. Investigaciones previas han mostrado la asociación de ciertos genes con esta enfermedad, e incluso se han encontrado patrones de metilación diferencial en algunos de estos y en secuencias repetidas que los rodean. El propósito de este estudio fue cuantificar la interacción de genes asociados a partir de datos de experimentos de micromatrices de ADN en placentas preeclámpsicas. Procedimientos básicos: Usando el programa Cytoscape 3.1, se construyó una red de expresión génica, utilizando valores de z score obtenidos de una micromatriz de expresión de genes depositada en la base de datos "Gene Expression Omnibus". Además, se caracterizó la cromatina asociada a estos genes, realizando un paseo cromosómico en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen, empleando recursos del *Genome Browser* y de la base de datos *National Center of Biotechnology Information*. Principales hallazgos: Se encontró una predominancia de las secuencias Alu, MIR, SINE y LINE, sin embargo no se encontraron diferencias significativas al comparar las regiones upstream y downstream asociadas a cada gen. La red mostró a los genes EBI3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 y KRT19, como altamente expresados en placenta preeclámpsica. Principales conclusiones: Las categorías ontológicas de la red corroboraron la asociación de estos genes con la Preeclampsia. Se puede inferir que la expresión diferencial de genes expresados en placenta preeclámpsica, se convierte en un criterio de discriminación diagnóstica de la patología.

Palabras clave: Preeclampsia, Bioinformática, Micromatrices de ADN, Red de Expresión Génica, secuencias repetidas.

EXPRESIÓN DE 38 GENES HSA21/DSCR EN CEREBRO HUMANO SANO (METENCÉFALO)

Juan Ramiro Orjuela Vásquez¹, Dianora Fajardo Colorado, Adalberto Sánchez Gómez¹, José María Satizábal Soto¹ Julio César Montoya Villegas^{1,2}, Felipe García-Vallejo¹.

1. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia. 2. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Autónoma de Occidente. Cali. Colombia.

RESUMEN

Las neuropatologías son la causa más común de alteraciones en la estructura del cerebro, deterioro cognitivo, demencia, disminución de los diferentes tipos de motricidad y pérdida de la memoria. Algunas, como el Síndrome de Down pueden sumar otras patologías como enfermedades congénitas del corazón, cáncer y leucemia. Se analizaron los perfiles de transcripción de 38 genes HSA21/DSCR a partir de información consignada en la plataforma en línea Allen Human Brain Atlas, los datos correspondieron a experimentos con microarreglos de ADN en Metencéfalo de un cerebro sano de donante masculino de 55 años. Para ello se realizó un análisis cuantitativo de la transcripción global de los genes, un análisis de conglomerados y un ACP (R38>R4). Se determinó una expresión diferencial y específica de los genes HSA21/DSCR en las diferentes estructuras analizadas; la expresión promedio más alta la registraron el Complejo Olivar Superior –SOC- (genes ERG y BACE2) y el Núcleo Dentado –Dt- (genes CSTB y DSCR5), y la más baja la registró CxCb. Los patrones de expresión diferencial y específica se asociaron a estrictos eventos de regulación transcripcional, mientras los altos perfiles de expresión registrados por SOC y Dt se relacionaron con el aporte a las funciones generales que se le atribuyen al Metencéfalo (auditiva, cognitiva y motora), posibles alteraciones en estos perfiles de expresión génica podrían explicar algunas de las características fenotípicas SD. Finalmente se sugirió potenciar el desarrollo y uso de las herramientas bioinformáticas en el estudio de enfermedades de importancia mundial.

Palabras clave: DSCR, Expresión, Gen, HSA21, Metencéfalo, Síndrome de Down y Z-score

GLOBAL EXPRESSION OF X-LINKED MENTAL RETARDATION (MRX) RELATED GENES ALONG SEVERAL AREAS OF NORMAL HUMAN BRAIN.

Dianora Fajardo¹, dianoraf@hotmail.com
José María Satizábal¹,
Julio Cesar Montoya^{1,2}, jcmontoya@uao.edu.co
Adalberto Sánchez¹, Adalberto.sanchez@corrounivalle.edu.co
Felipe García Vallejo¹, labiomol@gmail.com

Laboratory of Molecular Biology and Pathogenesis. Department of Physiological Sciences.
School of Basic Sciences. Faculty of Health. Universidad del Valle. Cali. Colombia.
2. Faculty of Basic Sciences, Universidad Autónoma de Occidente, Cali,

ABSTRACT

Scope of the study: Recently the analysis of the human transcriptome allow to expand the knowledge of genomic functions of human brain, and its potential application to the analysis of global expression in X-linked mental retardation (MRX) related genes. These are a group of genes whose mutation or deletion results in simple phenotypes of generalized or specific cognitive impairment in patients, such as, low intelligence and poor social adaptability. Basic Procedures: Based upon gene expression data from experiments of DNA microarrays available at the databases of human brain project of the Brain Atlas of Allen Institute for Brain Sciences (<http://human.brainmap.org/content/WholeBrainMicroarray>), the expression profiles of 22 MRX genes along substructures of the cerebral nuclei, the limbic, frontal and temporal lobes and cerebellum were analyzed. Principal Findings: DLG3 and FACIL4 were the genes with highest z-score in limbic lobe. OPHN1 had the highest level of expression in cerebral nuclei. Frontal and temporal lobes were areas with low global transcription. Finally in cerebellum cortex PQBP1 gene registered the highest level of expression. Overall the results evidenced a differential expression of MRX genes along the structures analyzed, besides registering higher levels of global transcription in certain areas of the brain, which seem to be associated with some learning, cognitive and memory processes. Main conclusions: Differential global transcription which was correlated with cerebral location and its potential functional role, lead to propose the hypothesis about the complexity of gene transcription networks to explain not only the functioning of normal brain but also most of X- linked mental retardation as complex diseases.

Keywords: X-linked genes. Mental retardation. Brain transcriptome. Inborn errors of metabolism.

METILACIÓN CpG EN LA REGIÓN CRÍTICA DEL SÍNDROME DE DOWN (DSCR)

Karla Vinasco¹, José María Satizábal¹, Adalberto Sánchez¹, Julio Cesar Montoya^{1,2}, Felipe García Vallejo¹.

1. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia. 2. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Occidente. Cali. Colombia

RESUMEN

Propósitos del estudio: La metilación CpG en el ADN es un mecanismo epigenético implicado en la regulación de la expresión génica, cuyos patrones son específicos para el tipo de tejido, y su conocimiento resulta importante para el entendimiento de enfermedades como el Síndrome de Down (SD). Procedimientos básicos: Se tomaron como referencia los valores de metilación CpG consignados en las bases de datos del NCBI, UCSC y el proyecto Name21, para genes de la Región Crítica del Síndrome de Down (DSCR), en la corteza prefrontal, en promotores (Leucocitos normales, fibroblastos normales, HEK293, HepG2 fibroblastos trisómicos 21) y la metilación génica (Hela-S3, HepG2, IMR90 y Hepatocitos). Principales hallazgos: En la corteza prefrontal, los genes DSCR6 y RCAN1, presentaron un elevado nivel metilación CpG. En los de promotores de DYRK1A, KCNJ6, BACE2 y RUNX1 se registraron los más altos porcentajes de metilación CpG. *In toto*, no se encontraron diferencias significativas entre la metilación de promotores en fibroblastos normales y trisómicos, aunque se observaron diferencias entre los genes DSCR6, CLIC6, DSCAM y SH3BGR. Finalmente en las líneas celulares HEK293 y HeLa-S3 se determinó el mayor grado de metilación. Principales conclusiones: Se puede concluir que la metilación en la corteza prefrontal para la región DSCR es diferencial al igual que en las líneas celulares analizadas. Los niveles de metilación obtenidos en los genes DSCR permiten inferir que algunos rasgos fenotípicos como cardiopatías, déficit cognitivo que son característicos del SD, estarían bajo un control por metilación CpG de genes localizados en la DSCR.

Palabras clave: Epigenética, Cerebro Humano, Corteza Prefrontal, Metilación de ADN, Islas CpG, Líneas Celulares.

INTERACCIÓN METABÓLICA EN LA PREECLAMPSIA BASADA EN CORRELACIONES CLÍNICO-MOLECULARES

José María Satizábal¹, josemariasatizabal@yahoo.es; Lina Moreno, linajohannamoreno@yahoo.es, Programa de Especialización en Pediatría, Escuela de Medicina. Facultad de Salud. Universidad del Valle; Adalberto Sánchez¹, adalberto.sanchez@correounivalle.edu.co; Julio Cesar Montoya, jcmontoya@uao.edu.co, Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Occidente; Felipe García Vallejo¹labiomol@gmail.com.

¹Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle

Resumen.

La Preeclampsia (PE) se caracteriza por un aumento de la presión arterial mayor de 140/90 mm de Hg después de la semana 20 de gestación, con proteinuria mayor de 300mg/L en 24 horas y constituye en la principal causa de mortalidad materna en Colombia. La mayoría de los casos de PE ocurren en primigestantes saludables, y por ello es importante establecer los factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de esta patología. En el presente estudio se analizó, en una población de 102 mujeres gestantes (51 casos de PE y 51 controles) de la ciudad de Cali, la asociación de niveles sanguíneos de lípidos, homocisteína, folatos, proteína C reactiva, anticuerpos antifosfolípidos y presencia de los polimorfismos genéticos del Factor V de Leiden; Protrombina 20210A, y de Metilentetrahidrofolato reductasa 677, con el riesgo de padecer preeclampsia. Un análisis de componentes principales demostró que la mayor contribución de la varianza en el componente 1, fue para las concentraciones plasmáticas de ácido úrico, la Proteína C reactiva ultrasensible y los anticuerpos anticardiolipinas, que hemos denominamos componente inflamatorio. El segundo componente a los metabolitos lipídicos que incluyeron los niveles de Colesterol, LDL, triglicéridos y HDL; éstos poseen una interrelación directa con el metabolismo del endotelio y el mantenimiento de su homeostasis. En su conjunto, con los resultados obtenidos se diseñó un protocolo que permite la identificación temprana de factores de riesgo de Preeclampsia en pacientes Colombianos a fin de instaurar un tratamiento profiláctico que minimice la morbilidad y mortalidad materna y neonatal asociada.

Palabras clave: Preeclampsia, Metabolismo lipídico, Inflamación, Análisis de Componentes Principales

PERFILES TRANSCRIPCIONALES DE GENES LOCALIZADOS EN LA REGIÓN CRÍTICA DEL SÍNDROME DE DOWN EN EL CEREBELO Y LOS LÓBULOS TEMPORAL Y FRONTAL.

Dianora Fajardo Colorado¹, dianoraf@hotmail.com. Julio Cesar Montoya¹, jcmontoya@uao.edu.co. José María Satizábal¹, josemariasatizabal@yahoo.es. Felipe García Vallejo¹, labiomol@gmail.com.

¹Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle.

Resumen:

La modelación in silico brinda la posibilidad de extraer y analizar información consignada en bases de datos, acerca del nivel de expresión génica a lo largo de diferentes estructuras cerebrales, con el fin de definir más detalladamente estos eventos moleculares, además de determinar su implicación en la homeostasis cerebral. En este estudio correlacionaron los niveles de transcripción de 38 genes localizados en la región crítica del cromosoma 21, asociada a Síndrome de Down, con la localización en diferentes estructuras del cerebelo y de las cortezas temporal y frontal y su papel en el correcto funcionamiento del cerebro. A partir de datos de expresión génica provenientes de experimentos de microarrays de ADN disponibles en la base de datos del proyecto cerebro humano del Atlas del Cerebro del "Allen Institute for Brain Sciences", se construyeron los perfiles de expresión de éstos genes en la corteza y núcleos cerebelares, y en varias zonas de las cortezas temporal y frontal. En general se determinó una baja expresión diferencial de estos genes a lo largo de las estructuras analizadas, sin embargo el gen TIAM1 mostró el mayor nivel de expresión en la corteza cerebelar (z-score=3,00). Se correlacionó la transcripción diferencial con la localización cerebelar y su potencial papel funcional.

Palabras Clave: Cerebelo, Corteza frontal, Corteza temporal, Micromatrices de ADN, Región crítica del síndrome de Down, TIAM1.

Palabras Clave: Epigenetics, Down Syndrome Critical Region. DNA methylation. Histone modifications. Human brain

COMPLEJIDAD Y CONSTRUCCIÓN DE UNA RED DE GENES ASOCIADOS A PREECLAMPSIA.

COMPLEXITY AND CONSTRUCTION OF A NETWORK OF GENES ASSOCIATED PREECLAMPSIA

Alejandra Rodríguez¹, José María Satizábal¹, Adalberto Sánchez¹, Julio Montoya^{1,2}, Felipe García Vallejo¹

¹Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de ciencias fisiológicas. Escuela de ciencias básicas. Facultad de salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia.

²Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Occidente. Cali. Colombia

Recibido: Septiembre 30 de 2014

Aceptado: Octubre 10 de 2014

*Correspondencia del autor: Escuela de ciencias básicas. Facultad de salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia

RESUMEN

Propósitos del estudio: La Preeclampsia es un desorden multisistémico estudiado ampliamente por ser la principal causa de mortalidad materna tanto en Colombia como en el mundo. Investigaciones previas han mostrado la asociación de ciertos genes con esta enfermedad, e incluso se han encontrado patrones de metilación diferencial en algunos de estos y en secuencias repetidas que los rodean. El propósito de este estudio fue cuantificar la interacción de genes asociados a partir de datos de experimentos de micromatrices de ADN en placenta preeclámpsica. **Procedimientos básicos:** Usando el programa Cytoscape 3.1, se construyó una red de expresión génica, utilizando valores de z score obtenidos de una micromatriz de expresión de genes depositada en la base de datos "Gene Expression Omnibus". Además, se caracterizó la cromatina asociada a estos genes, realizando un paseo cromosómico en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen, empleando recursos del *Genome Browser* y de la base de datos *National Center of Biotechnology Information*. **Principales hallazgos:** Se encontró una predominancia de las secuencias Alu, MIR, SINE y LINE, sin embargo no se encontraron diferencias significativas al comparar las regiones upstream y downstream asociadas a cada gen. La red mostró a los genes EBI3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 y KRT19, como expresados altamente en placenta preeclámpsica. **Principales conclusiones:** Las categorías ontológicas de la red corroboraron la asociación de estos genes con la Preeclampsia. Se puede inferir que la expresión diferencial de genes expresados en placenta preeclámpsica, se convierte en un criterio de discriminación diagnóstica de la patología.

Palabras claves: Preeclampsia, Bioinformática, Micromatrices de ADN, Red de Expresión Génica, secuencias repetidas.

Preeclampsia, problema de salud pública latente: Etiología genética y molecular



Serie Orígenes. Dibujo. 1978. Lacy Tajada

JOSÉ MARÍA SATEÁBAL SOTO*
LINA J. MORENO GIRALDO**
JULIO CÉSAR MONTAÑA***
FELIPE GARCÍA VALLEJO****

Resumen

La preeclampsia (PE) es un trastorno que afecta la gestación humana, constituye la principal causa de mortalidad materna en Colombia y se asocia al nacimiento de niños con bajo peso al nacer. La mayoría de los casos de preeclampsia ocurren en primigestas saludables, y por ello es importante establecer los factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de esta patología. Una disfunción endotelial generalizada podría explicar una gran parte de los aspectos clínicos de la preeclampsia: la hipertensión arterial por alteración del control endotelial del tono vascular, la proteinuria por un aumento de la permeabilidad glomerular, la coagulopatía como resultado de la expresión anormal de los

* Médico, M.Sc. en Bioquímica. Docente de la Facultad de Salud, Universidad del Valle. josemariastrabal@yahoo.es

** Médica. Directora Médica Genómica, IPS Especializada en Genética Médica. Integrante del Grupo de Investigación Errores Inatos del Metabolismo. medina@genomica.com_lina.johannan.moreno@yahoo.es

*** Magister en Bioquímica, Ph.D.(C) en Ciencias Biotécnicas. Docente de la Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Occidente y de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. jcmontana@uao.edu.co

**** Ph.D. en Bioquímica. Director Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Docente de la Facultad de Salud, Universidad del Valle. labiomol@gmail.com

Fecha de recepción: mayo 13 de 2010

Fecha de aceptación: septiembre 14 de 2010

Genomic study of the critical region of chromosome 21 associated to Down syndrome

JULIO CÉSAR MONTOYA, MSc¹, JULIANA SOTO, BSc², JOSÉ MARÍA SATIZÁBAL, MD, MSc³,
ADALBERTO SÁNCHEZ, PhD⁴, FELIPE GARCÍA, PhD⁵

SUMMARY

Introduction: Previous reports have identified a region of chromosome 21 known as Down syndrome critical region (DSCR) in which the expression of some genes would modulate the main clinical characteristics of this pathology. In this sense, there is currently limited information on the architecture of the DSCR associated.

Objective: To obtain *in silico* a detailed vision of the chromatin structure associated with the evaluation of genomic covariables contained in public data bases.

Methods: Taking as reference the information consigned in the *National Center for Biotechnology Information*, the Genome Browser from the University of California at Santa Cruz and from the HapMap project, a chromosome walk along 21 Mb of the distal portion of chromosome 21q arm was performed. In this distal portion, the number of single nucleotide polymorphisms (SNP), number of CpG islands, repetitive elements, recombination frequencies, and topographical state of that chromatin were recorded.

Results: The frequency of CpG islands and Ref genes increased in the more distal 1.2 Mb DSCR that contrast with those localized near to the centromere. The highest level of recombination calculated for women was registered in the 21q22.12 to 22.3 bands. DSCR6 and 9 genes showed a high percentage of methylation in CpG islands in DNA from normal and trisomic fibroblasts. The DSCR2 gene exhibited high levels of open chromatin and also methylation in some lysine residues of the histone H3 as relevant characteristics.

Conclusion: The existence of a genomic environment characterized by high values of recombination frequencies and CpG methylation in DSCR 6 and 9 and also DSCR2 genes led us to postulate that in non-disjunction detected in Down syndrome, complex genomic, epigenetic and environmental relationships regulate some processes of meiosis.

Keywords: Down syndrome; Down syndrome critical region; Genomics; Chromatin architecture; Epigenetics; Non-disjunction.

Colomb Med. 2011; 42: 28-38

Estudio genómico de la región crítica del cromosoma 21 asociada con el síndrome de Down

RESUMEN

Introducción: Análisis previos han identificado una región del cromosoma 21, conocida como región crítica del síndrome de Down (DSCR) en donde se localizan algunos genes cuya expresión modularía las principales características clínicas de

1. Associate Professor, Department of Physiological Sciences, School of Basic Sciences, Faculty of Health, Universidad del Valle. Professor, Faculty of Basic Sciences, Universidad Autónoma de Occidente, Cali, Colombia. e-mail: jcmontoya@uao.edu.co
2. COLCIENCIAS Young Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Pathogenesis, Department of Physiological Sciences, School of Basic Sciences, Faculty of Health, Universidad del Valle, Cali. e-mail: dendroapsis@gmail.com
3. Full Professor, Department of Physiological Sciences, School of Basic Sciences, Faculty of Health, Universidad del Valle, Cali, Colombia. e-mail: josemariasatizabal@yahoo.es
4. Associate Professor, Department of Physiological Sciences, School of Basic Sciences, Faculty of Health, Universidad del Valle, Cali, Colombia. e-mail: asanchez6911@yahoo.com
5. Full Professor and Scientific Director of the Laboratory of Molecular Biology and Pathogenesis, Department of Physiological Sciences, School of Basic Sciences, Faculty of Health, Universidad del Valle, Cali, Colombia. e-mail: labiomol@gmail.com

Received for publication February 16, 2010 Accepted for publication June 30, 2010

Perspectiva y comprensión bioquímica del síndrome de Down



JULIO CÉSAR MONTAÑA VILLEGAS*
JOSÉ MARÍA SATEZÁBAL SOTO**
FELIPE GARCÍA VALLIDO***
ADALBERTO SÁNCHEZ GÓMEZ****

Resumen

El síndrome de Down (SD) es una alteración cromosómica numérica consistente en un cromosoma 21 extra o una porción del mismo en el complemento normal de un individuo, convirtiéndose en la causa genética más común de retardo mental en humanos con una incidencia de 1/600 – 1/1.000 nacidos vivos lo que genera una gran carga para el sistema de salud y condiciona en alto grado el desarrollo y atención de estos niños. La etiología embriológica del SD es principalmente debida a la no disyunción del cromosoma 21 durante la división meiótica I materna, evento cuya naturaleza molecular no se ha aclarado plenamente. La única variable aceptada en todo el mundo relacionada con la aparición de este síndrome es

* Magister en Bioquímica, PhD (C) en Ciencias Biotécnicas, Profesor Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Occidente, Profesor Facultad de Salud, Universidad del Valle, jmontoya@uao.edu.co

** Médico, Magister en Bioquímica, Profesor Facultad de Salud, Universidad del Valle, josemaria.satezabal@yahoo.es

*** Doctor en Bioquímica Director Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Profesor Facultad de Salud, Universidad del Valle, labiomol@gmail.com

**** Doctor en Genética, Profesor Facultad de Salud, Universidad del Valle, asanchez911@yahoo.com

Fecha de recibir: noviembre 16 de 2007

Fecha de aceptación: marzo 28 de 2008

ANÁLISIS SISTÉMICO *IN SILICO* DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES LOCALIZADOS EN LA REGIÓN CRÍTICA DEL SÍNDROME DE DOWN (DSCR) EN EL CEREBRO HUMANO

JULIO CÉSAR MONTAÑA VILLEGAS Ph.D.¹, ÁNGELA PEÑA GONZÁLEZ B.Sc.²,
JOSÉ MARÍA SATIZÁBAL SOTO MD, M.Sc.³ Y FELIPE GARCÍA-VALLEJO Ph.D.⁴

¹ Profesor asociado Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Occidente y Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

² Investigadora asociada a LABIOMOL, estudiante de Maestría, GeorgiaTech University, USA

³ Profesor titular Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

⁴ Profesor Titular y Director Científico del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

Resumen

Uno de los retos más importantes de este siglo en la neurología genómica es construir mapas de expresión espacial de genes a lo largo de las distintas estructuras cerebrales con el fin de correlacionarlos con ciertas neuropatologías. Se analizaron los perfiles de transcripción de ocho genes HAS21 localizados en la región crítica del síndrome de Down en diferentes estructuras del cerebro humano normal. Se tomaron como referencia los valores de expresión de ocho genes HAS21/DSCR provenientes de experimentos de micromatrices de ADN de cerebros humanos normales y cuyos valores están disponibles en la base de datos del proyecto cerebro humano del Atlas del Cerebro del Allen Institute for Brain Sciences en Seattle, Washington (<http://www.brain-map.org>). Se determinó una expresión diferencial de estos genes HAS21/DSCR a lo largo de las estructuras localizadas en el lóbulo frontal, el lóbulo límbico y en los núcleos centrales. En el putamen, el núcleo caudado, el giro parahipocámpico y en las áreas centrales se registraron los mayores niveles de transcripción global; estas áreas del cerebro parecen estar asociadas con diversos procesos de aprendizaje y de memoria. Se correlacionó la transcripción diferencial de genes DSCR con la localización cerebral y su potencial papel funcional.

Palabras claves: Análisis de micromatrices, perfilación de la expresión génica, biología computacional, cerebro, síndrome de Down.

IN SILICO SYSTEMIC ANALYSIS OF THE DIFFERENTIAL EXPRESSION OF GENES LOCALIZED IN THE DOWN SYNDROME CRITICAL REGION (DSCR) IN NORMAL HUMAN BRAIN

Abstract

One of the most important challenges of the 21st Century Neurology is to build gene expression profiles along the different structures of human brain trying to correlate them with some neuropathologies. The expression profiles of eight HAS21 genes located on the Down syndrome critical region in

* Correspondencia: Dr. Felipe García Vallejo, Director Científico del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Profesor Titular, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Sede de San Fernando, Calle 4B# 36-00, Cali, Colombia. Teléfono: +2-5185601. Fax: +2-5185617. E-mail: labiomol@gmail.com.