

**EXPRESION DE FACTOR TISULAR, TROMBOMODULINA y PAI-1 EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO O PREECLAMPSIA**



**PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ**

**Bacterióloga**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS - ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA**

**BOGOTÁ, COLOMBIA**

**2011**

**EXPRESION DE FACTOR TISULAR, TROMBOMODULINA y PAI-1 EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO O PREECLAMPSIA**

**PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar el título de Magíster en Ciencias Biológicas**

**MARTHA BERMUDEZ DE RINCON PhD**

**Directora**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

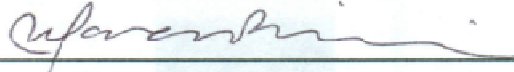
**BOGOTÁ, COLOMBIA**

**2011**

"La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia"

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946

Nota de Aceptación:



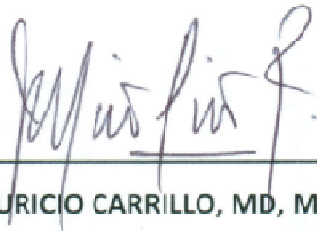
---

MARTHA BERMUDEZ DE RINCON. PhD  
DIRECTOR



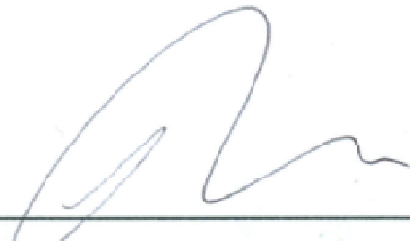
---

JUAN CARLOS PRIETO, MD, MSc  
JURADO



---

MAURICIO CARRILLO, MD, MSc, GO  
JURADO



---

HARVY VELASCO, MD, Esp. Genética y Bioética, MSc.  
JURADO

PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ

**Nota de aceptación**

---

**MANUEL FRANCO.MD, PhD  
DIRECTOR DE POSTGRADOS**

---

**INGRID SCHULER, PhD  
DECANA ACEDÉMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ**

*A mi esposo que me dio todo su amor, apoyo y acompañamiento y  
es la persona que me incentivó a realizar este trabajo*

*A mi hija por ser el motor de mi vida*

*A mis papás y a mi hermana*

*por su apoyo incondicional*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Vicerrectoría Académica de la Pontificia universidad Javeriana quien aportó los recursos para desarrollar este estudio
- Al Instituto de Genética Humana y a la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo
- A la Universidad Los Andes de Santiago de Chile, por aportar recursos para desarrollar este estudio y por permitirme utilizar las instalaciones de dicha universidad para el desarrollo de este trabajo
- Al Dr. Sebastian Illanes de la Universidad Los Andes de Santiago de Chile por su gran acogida y por compartir sus conocimientos conmigo.
- A Romina Fornes, Alejandra Pérez y María José Torres por su ayuda, colaboración y acompañamiento en la estadía en Chile.
- Al departamento de Ginecoobstetricia del Hospital Universitario San Ignacio por su colaboración en la consecución de las muestras
- A la Dra. Martha Bermúdez por compartir sus conocimientos y enseñanzas conmigo, por su gran paciencia, apoyo y comprensión durante la realización de este trabajo.

- Al Dr. Jaime Bernal, al Dr. Iván Solarte y a la Pontificia Universidad Javeriana por brindarme apoyo económico y tiempo para el desarrollo de este trabajo.



## TABLA DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN .....   | 18 |
| SUMMARY .....   | 19 |
| 1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN ..... | 20 |
| 2. MARCO TEÓRICO O ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS:.....        | 22 |
| 2.1 LA PLACENTA.....  | 22 |
| 2.1.1 DESARROLLO DE LA PLACENTA .....                       | 22 |
| 2.2 COMUNICACIÓN MATERNO-FETAL.....                         | 26 |
| 2.3 HEMOSTASIS EN EL EMBARAZO.....                          | 28 |
| 2.3.1 HEMOSTASIS EN LA PLACENTA .....                       | 28 |
| 2.4 ENFERMEDADES EN EL EMBARAZO DE ORIGEN PLACENTARIO ..... | 35 |
| 2.4.1 RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO (RCIU).....   | 35 |
| 2.4.2 PREECLAMPSIA.....                                     | 40 |
| 2.5 PAPEL DE LA HEMOSTASIA EN PREECLAMPSIA Y RCIU .....     | 43 |
| 2.6 ACIDOS NUCLEICOS PLASMATICOS LIBRES CIRCULANTES.....    | 45 |
| 3. OBJETIVOS .....  | 48 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL.....                                   | 48 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                             | 48 |
| 3.3 HIPOTESIS .....   | 48 |
| 4. METODOLOGÍA .....  | 49 |
| 4.1 RCIU.....   | 49 |
| 4.1.1 TIPO DE ESTUDIO.....                                  | 49 |
| 4.1.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....                           | 49 |
| 4.1.4 ASPECTOS ETICOS.....                                  | 51 |
| 4.1.5 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN.....                    | 51 |
| 4.1.6 TOMA DE MUESTRAS.....                                 | 52 |
| 4.1.7 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....                    | 53 |
| 4.2 PREECLAMPSIA.....                                       | 57 |
| 4.2.1 TIPO DE ESTUDIO.....                                  | 57 |
| 4.2.2 POBLACION DE ESTUDIO.....                             | 57 |
| 4.2.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....                           | 57 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.4 ASPECTOS ETICOS.....   | 58  |
| 4.2.5 RECOLECCION DE LA INFORMACION.....                           | 59  |
| 4.2.6 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO DE PLACENTA..... | 59  |
| 4.2.7 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....                           | 59  |
| 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                                      | 61  |
| 5. RESULTADOS.....   | 62  |
| 5.1 RCIU.....  | 62  |
| 5.1.1 CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACION.....            | 62  |
| 5.1.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA.....                      | 63  |
| 5.1.3 PCR EN TIEMPO REAL.....                                      | 66  |
| 5.2 PREECLAMPSIA.....  | 83  |
| 5.2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACIÓN.....            | 83  |
| 5.2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA.....                      | 83  |
| 5.2.3 PCR EN TIEMPO REAL.....                                      | 84  |
| 6. DISCUSIÓN.....  | 93  |
| 7. CONCLUSIONES.....   | 104 |
| 8. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES.....                                | 105 |
| 9. BIBLIOGRAFIA.....   | 107 |
| 10. ANEXOS.....  | 124 |

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 01. Características de los primers.....   | 56 |
| Tabla 02. Características demográficas de la población .....  | 63 |
| Tabla 03. Cuantificación de RNA de plasma .....   | 64 |
| Tabla 04. Cuantificación de RNA de placenta.....  | 66 |
| Tabla 05. Condiciones estandarizadas de la PCR para cada gen .....  | 66 |
| Tabla 06. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>hPL</i> .....                                   | 67 |
| Tabla 07. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>GAPDH</i> .....                                 | 69 |
| Tabla 08. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>FT</i> .....                                    | 70 |
| Tabla 09. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>TM</i> .....                                    | 72 |
| Tabla 10. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>PAI-1</i> .....                                 | 73 |
| Tabla 11. Valores de la curva estándar.....   | 75 |
| Tabla 12. Resultados de la cuantificación absoluta de <i>hPL</i> en plasma .....                              | 76 |
| Tabla 13. Cuantificación absoluta de <i>GAPDH</i> .....   | 78 |
| Tabla 14. Valores sin normalizar y normalizando con GAPDH de los niveles de mRNA de <i>FT</i><br>.....        | 79 |
| Tabla 15. Valores sin normalizar y normalizando con GAPDH de los niveles de mRNA de<br><i>TM</i> .....        | 81 |
| Tabla 16. Valores sin normalizar y normalizando con GAPDH de los niveles de mRNA de<br><i>PAI-1</i> .....     | 82 |
| Tabla 17. Características demográficas de la población .....  | 84 |
| Tabla 18. Condiciones estandarizadas de la PCR para cada gen .....  | 85 |
| Tabla 20. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>GAPDH</i> .....                                 | 86 |
| Tabla 21. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>FT</i> .....                                    | 87 |
| Tabla 22. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>TM</i> .....                                    | 88 |
| Tabla 23. Protocolo de las condiciones de amplificación de <i>PAI-1</i> .....                                 | 89 |
| Tabla 24. Resultados de la cuantificación relativa de <i>hPL</i> , <i>FT</i> , <i>TM</i> y <i>PAI-1</i> ..... | 90 |
| Tabla 25. Estudios que han reportado medición de <i>FT</i> en placenta en PE y RCIU .....                     | 94 |

Tabla 26. Estudios que han reportado medición de TM a nivel de proteína en placenta en PE y RCIU ..... 97

Tabla 27. Estudios que han reportado medición de PAI-1 en placenta en PE y RCIU..... 100

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Blastocisto en el día 14 que muestra la estructura de la placenta .....            | 23 |
| Figura 2. Placenta humana a término. ....  | 24 |
| Figura 3. Placentación. ....   | 25 |
| Figura 4. Mecanismos hemostáticos en los vasos sanguíneos.....                               | 30 |
| Figura 5. Estructura del factor tisular y su unión al factor VII .....                       | 32 |
| Figura 6. Estructura de la trombomodulina. ....  | 33 |
| Figura 7. Estructura de la proteína PAI-1 .....  | 34 |
| Figura 8. RCIU placentaria.. ....  | 39 |
| Figura 9. Resumen de la patogénesis de la PE. ....   | 42 |
| Figura 10. Sitio de toma de la muestra de tejido placentario.....                            | 52 |
| Figura 11. Cantidad de RNA extraído de plasma.....   | 65 |
| Figura 12. Concentración de RNA extraído de placenta antes y después de DNAsa.....           | 65 |
| Figura 13. Amplificación de hPL y GAPDH por PCR en tiempo real en gel.....                   | 67 |
| Figura 14. Amplificación de hPL por PCR en tiempo real.....                                  | 68 |
| Figura 15. Amplificación de GAPDH por PCR en tiempo real.....                                | 69 |
| Figura 16. Amplificación de <i>FT</i> por PCR en tiempo real en gel. ....                    | 70 |
| Figura 17. Amplificación de factor tisular por PCR en tiempo real. ....                      | 71 |
| Figura 18. Amplificación de trombomodulina por PCR en tiempo real. ....                      | 72 |
| Figura 19. Amplificación de TM por PCR en tiempo real en gel.....                            | 73 |
| Figura 20. Amplificación de PAI-1 por PCR en tiempo real en dos muestras.....                | 74 |
| Figura 21. Amplificación de PAI-1 por PCR en tiempo real. ....                               | 74 |
| Figura 22. Cuantificación absoluta de mRNA de hPL .....                                      | 76 |
| Figura 23. Cuantificación de mRNA de GAPDH .....   | 78 |
| Figura 24. Cuantificación sin normalizar y normalizando con GAPDH de mRNA de <i>FT</i> ..... | 79 |
| Figura 25. Cuantificación sin normalizar y normalizando con GAPDH de mRNA de TM ....         | 80 |
| Figura 26. Cuantificación sin normalizar y normalizando con GAPDH de mRNA de PAI-1 ..        | 82 |
| Figura 27. Amplificación de <i>GAPDH</i> por PCR en tiempo real.....                         | 85 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 28. Amplificación de <i>FT</i> por PCR en tiempo real. ....                       | 86 |
| Figura 29. Amplificación de <i>TM</i> por PCR en tiempo real. ....                       | 87 |
| Figura 30. Amplificación de <i>PAI-1</i> por PCR en tiempo real. ....                    | 88 |
| Figura 31. Comparación de ct de GAPDH en casos y controles .....                         | 90 |
| Figura 32. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de <i>FT</i> .....             | 91 |
| Figura 33. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de <i>TM</i> .....             | 91 |
| Figura 34. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de <i>PAI-1</i> .....          | 92 |
| Figura 35. Hipótesis de del mecanismo fisiopatológico en la disfunción placentaria ..... | 97 |
| Figura 36. Hipótesis de la fisiopatología de la PE y la RCIU.....                        | 99 |

## INDICE DE ANEXOS

|   |     |
|---|-----|
| Anexo 1. Cuestionario pacientes con RCIU.....   | 120 |
| Anexo 2. Consentimiento informado para pacientes con RCIU.....                                      | 125 |
| Anexo 3. Consentimiento informado para pacientes con preeclampsia.....                              | 130 |
| Anexo 4. Artículo sometido a la revista Colombiamédica.....   | 133 |
| Anexo 5. Artículo que se someterá a la revista placenta.....  | 147 |
| Anexo 6. Artículo publicado en la revista Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia..... | 164 |

## GLOSARIO

**Aborto:** Interrupción del embarazo por debajo de la semana 22 o debajo de los 500 gramos de peso.

**Citotrofoblasto:** Capa celular interna del trofoblasto de los embriones de mamíferos a partir de la cual se origina la capa externa y las vellosidades coriónicas.

**Embrión:** Ser humano con período de desarrollo desde la implantación hasta la semana octava del desarrollo.

**Edad gestacional:** edad de un embrión o feto calcula sumando 2 semanas (14 días) para el número de semanas completas desde la fertilización.

**Implantación:** el anclaje y la posterior penetración del blastocisto (por lo general en el endometrio) que se inicia 5 a 7 días después de la fecundación.

**Recién nacido:** Es el feto expulsado o extraído completamente de la madre, independientemente de la duración del embarazo.

**Feto:** Ser humano con período de desarrollo desde la novena semana hasta el nacimiento.

**Placenta:** órgano materno-fetal de los mamíferos muy vascularizado e importante de transporte de oxígeno, nutrientes y productos fetales de desechos. Está formada por una parte fetal (vellosidades coriónicas) derivada de los trofoblastos y una parte materna (decidua) que deriva del endometrio uterino.

**Preeclampsia:** complicación del embarazo caracterizada por un complejo de síntomas que incluyen hipertensión materna y proteinuria, con o sin edema patológico. La preeclampsia generalmente se produce después de la semana 20 del embarazo.

**Restricción de Crecimiento Intrauterino (RCIU):** retraso de un feto en alcanzar el desarrollo fetal esperado en cualquier edad gestacional.

**Sincitiotrofoblasto:** capa sincitial externa del trofoblasto del embrión de los mamíferos, al principio de su desarrollo, que erosiona la pared uterina durante la implantación y da lugar a las vellosidades de la placenta. (1)



## ABREVIATURAS

BPN: bajo peso al nacer

EVT: trofoblasto extravelloso

FT: factor tisular

GAPDH: gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa

hPL: lactogeno placentario humano

IVFT: inhibidor de la vía del factor tisular

PAI-1: inhibidor del activador del plasminoeno tipo I

PE: preeclampsia

PEG: pequeño para la edad gestacional

TM: trombomodulina

RCIU: restricción de crecimiento intrauterino

REPC: Receptor endotelial de la proteína C

sFlt1: receptor soluble de VEGF

TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina

tPA: activador del plasminogeno tisular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

uPA: uroquinasa

## RESUMEN

La preeclampsia y la Restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) son dos complicaciones de embarazo con un alto componente en la morbilidad y mortalidad perinatal. Se ha propuesto que una alteración en la hemostasis placentaria podría estar involucrada con la fisiopatología de estas entidades. El objetivo de este estudio fue evaluar la alteración en la coagulación a nivel de placenta en embarazos que cursaron con preeclampsia y RCIU. Se obtuvieron placentas de embarazos con RCIU idiopático y preeclampsia y de controles. Se realizó análisis de la expresión de RNAm por PCR en tiempo real de factor tisular, trombomodulina y PAI-1 en placenta. Adicionalmente se evaluó la expresión de hPL en el plasma de gestantes. En los resultados se encontró aumento en la expresión de factor tisular ( $p=0,0105$ ), de trombomodulina ( $p=0,0140$ ) en las placentas con preeclampsia, así como aumento de la razón factor tisular/trombomodulina en preeclampsia ( $p=0,001$ ) y en RCIU ( $p=0,0411$ ). Adicionalmente fue posible extraer y amplificar RNAm de origen fetoplacentario en el plasma de gestantes, sin embargo la diferencia entre casos y controles no fue significativa. En conclusión existe una alteración de algunos mecanismos hemostáticos locales a nivel de la placenta en embarazos que cursan con preeclampsia o RCIU.

## SUMMARY

Pre-eclampsia and intrauterine growth restrictions (IUGR) are two complications of pregnancy with a high component of perinatal morbidity and mortality. It is proposed that an alteration in placental homeostasis may be involved in the pathophysiology of these entities. The aim of this study was to evaluate the alteration in placental coagulation in pregnancies with preeclampsia and IUGR. It obtained placentas of pregnancies with idiopathic IUGR or preeclampsia and controls. It carried out analysis of the mRNA expression by real-time PCR of tissue factor, thrombomodulin and PAI-1 in placenta. Additionally we evaluated the expression of hPL in plasma of pregnant women. It found increased expression of tissue factor ( $p = 0.0105$ ), thrombomodulin ( $p = 0.0140$ ) in preeclamptic placentas, as well as increased tissue factor / thrombomodulin level in preeclampsia ( $p = 0.001$ ) and in IUGR ( $p = 0.0411$ ). Additionally it was possible to extract and amplify mRNA of fetoplacental origin in plasma of pregnant women; however, the difference between cases and controls was not significant. In conclusion there is an alteration of local hemostatic mechanisms at the level of placenta in pregnancies that occur with preeclampsia or IUGR.

## 1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El embarazo normal está asociado con cambios en la hemostasia, incluyendo incremento de las concentraciones de factores de coagulación y una disminución de algunos factores anticoagulantes naturales y fibrinolíticos. Estos cambios ayudan al mantenimiento de la función placentaria durante el embarazo pero pueden predisponer a la formación de trombos y complicaciones vasculares en la placenta(2). El desarrollo de la placenta depende de la proliferación y desarrollo del citotrofoblasto y de sincitiotrofoblasto(3). El sincitiotrofoblasto cumple una función muy importante como barrera entre la circulación materna y fetal.

Dos enfermedades asociadas con el desarrollo de la placenta son la preeclampsia (PE) y la Restricción del Crecimiento Intrauterino (RCIU). La preeclampsia es la principal causa de morbimortalidad perinatal y materna a nivel mundial, por eso su investigación es un objetivo importante en obstetricia(4, 5).

La PE usualmente ocurre durante la segunda mitad del embarazo con una frecuencia del 2% al 8% (6) y en países subdesarrollados alcanza hasta un 10%(5). Cerca del 10% al 15% de las muertes maternas están asociadas con PE y eclampsia en países subdesarrollados y en vía de desarrollo(7, 8). En nuestro país estas cifras alcanzan el 42%(9), además las complicaciones de la preeclampsia en la salud de la madre y feto-recién nacido requiere cuidado especializado y costoso que aumenta los gastos en atención médica por este motivo, en preeclampsia el diagnóstico e intervención oportuna son importantes para disminuir la mortalidad materna y fetal(4).

La RCIU se define como un cuadro clínico en el cual el feto no alcanza su pleno potencial de crecimiento y como desenlace final se encuentra una disminución en el peso corporal, siendo menor al percentil 10 para la edad gestacional según las tablas de crecimiento(10). La RCIU es la causa más importante de mortalidad y morbilidad natal, afectando aproximadamente entre 7-15% de los embarazos(11). En los países en vía de desarrollo la RCIU es la forma más común de bajo peso al nacer (BPN)(12). La prevalencia de RCIU varía ampliamente entre los países en desarrollo, encontrándose desde 10-55% y según lo

reportado por el estudio colaborativo de antropometría materna y desenlace del embarazo de la OMS del 17% en Colombia(13).

Avances en la prevención y manejo de estas enfermedades requerirá progresos en la comprensión de su fisiopatología a nivel molecular(4). Se ha propuesto que una alteración en la homeostasis placentaria podría estar involucrada con la causa de la RCIU y PE ya que el embarazo representa un estado de riesgo de hipercoagulabilidad con cambios adquiridos en factores hemostáticos(14), además ya se ha reportado que placentas con PE y RCIU presentan anormalidades en la vascularización, vasculitis, trombosis de las arterias espirales e infartos en el parénquima(15). Adicionalmente, en los embarazos con PE la reducción de la presión de la perfusión uteroplacentaria y la consiguiente isquemia/hipoxia placentaria durante el embarazo tardío puede ser causado por una inadecuada invasión citotrofoblástica de las arterias espirales uterinas en el inicio del embarazo(16), esta isquemia/hipoxia puede desencadenar la liberación de factores placentarios que inician una cascada de eventos celulares y moleculares produciendo una disfunción de las células endoteliales y del músculo liso con posterior aumento de la resistencia vascular y presión sanguínea(16). En la placenta las principales moléculas que mantienen el equilibrio hemostático son el factor tisular, la trombomodulina y el PAI-1(16, 17), por este motivo, este trabajo se enfocó en evaluar la expresión de los niveles de mRNA de estos factores en placentas de embarazos que desarrollaron preeclampsia o RCIU y compararlas con placentas de gestaciones sin complicaciones.

## **2. MARCO TEÓRICO O ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### **2.1 LA PLACENTA**

La placenta es el órgano encargado de realizar el intercambio de sangre materna y fetal y gases y sustancias nutritivas y posee una función metabólica y endocrina(18). El feto depende de la placenta que funciona como sus pulmones, riñones e hígado hasta que la maduración suficiente del feto le permite sobrevivir fuera del útero(1). La formación y el establecimiento de la placenta se lleva a cabo por un proceso denominado: placentación.

La placenta madura mide entre 15 y 25 cm, espesor de 3 cm, con un peso aproximado entre 500 y 600 gramos. La relación entre peso placentario y peso fetal es de 1/5 a 1/6. La cara fetal de la placenta, es de superficie lisa, brillante, cubierta por el amnios, membrana muy fina y sedosa. Se observan arterias y venas de grueso calibre, los vasos coriónicos, que convergen hacia el cordón umbilical(18).

#### **2.1.1 DESARROLLO DE LA PLACENTA**

El primer paso de la placentación es la implantación del embrión, esto se realiza alrededor del 7º u 8º día postfecundación, en fase de blástula, este proceso se conoce como la invasión trofoblástica. El trofoblasto se diferencia en 2 capas: una capa interna de células mononucleadas, el citotrofoblasto y una zona externa multinucleada sin límites netos, el sincitiotrofoblasto. El sincitio invade poco a poco los capilares maternos, llamados sinusoides. Las lagunas sincitiales se tornan continuas con los sinusoides y la sangre materna penetra en el sistema lacunar (Figura 1). A medida que el trofoblasto erosiona más y más sinusoides, la sangre materna comienza a fluir por el sistema trofoblástico estableciéndose la circulación útero-placentaria(18).

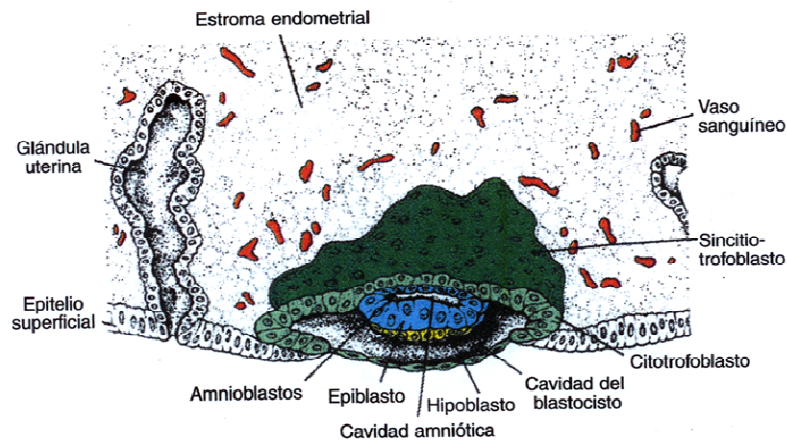


Figura 1. Blastocisto en el día 14 que muestra la estructura de la placenta (19)

El segundo paso caracteriza por la aparición de vellosidades en el trofoblasto. Las células del citotrofoblasto proliferan localmente y se introducen en el sincitiotrofoblasto formando las vellosidades primarias. Posteriormente, las células mesodérmicas penetran en el núcleo de las vellosidades primarias y crecen en dirección de la decidua. La estructura neoformada es una vellosidad secundaria. Hacia el final de la tercera semana, las células mesodérmicas de la parte central de la vellosidad comienzan a diferenciarse en células sanguíneas y en vasos sanguíneos de pequeño calibre, formando la vellosidad terciaria o vellosidad placentaria definitiva. Los capilares en la vellosidad terciaria, se ponen en contacto con los capilares de la placa coriónica y pedículo de fijación. Estos vasos, a su vez, establecen contacto con el sistema circulatorio intraembrionario conectando así la placenta y el embrión. Las vellosidades que van desde la placa coriónica a la decidua basal (lámina decidual) se denominan vellosidades troncales o vellosidades de anclaje. Las que se ramifican a partir de los costados de los troncos vellosos representan vellosidades libres (terminales) y a través de ellas se produce el intercambio de elementos nutritivos, etc(18).

En los meses siguientes, de los troncos de las vellosidades salen abundantes prolongaciones pequeñas. En estas vellosidades neoformadas, al comienzo del cuarto mes, desaparecen las células citotrofoblásticas y algunas células del tejido conectivo. Las

únicas capas que separarán la circulación materna y fetal son el sincitio y la pared endotelial de los vasos sanguíneos. Con frecuencia el sincitio se adelgaza y grandes segmentos que poseen varios núcleos pueden desprenderse y llegar a los lagos sanguíneos intervillosos. Estos segmentos, llamados nudos sincitiales, entran en la circulación materna y por lo común degeneran sin causar síntoma alguno(18).

Hacia el comienzo del cuarto mes de gestación, la placenta está constituida por la porción fetal, el corion frondoso, rodeado por la lámina coriónica, y la porción materna, la decidua basal, cuya lámina decidual es la parte más íntimamente incorporada en la placenta. En la zona de unión se mezclan células sincitiales y células deciduales, que poseen abundante material mucopolisacárido. En este momento, la mayor parte de células citotrofoblásticas se han degenerado. En el tercer paso, hacia los meses cuarto y quinto se forman los tabiques deciduales, que sobresalen en los espacios intervillosos sin llegar a la lámina coriónica. Esta formación contiene un núcleo central de tejido materno, pero su superficie está cubierta por una capa de células sincitiales. De esta forma siempre hay una capa de células fetales que separa la sangre materna que se encuentra en los lagos intervillosos. A partir de este momento la placenta crecerá paralelamente al aumento del tamaño del útero y al crecimiento del feto sin sufrir cambios importantes. El aumento del grosor de la placenta es consecuencia de la abundante arborización de las vellosidades ya existentes y no de un crecimiento en número de las mismas(18). (Figura 2)

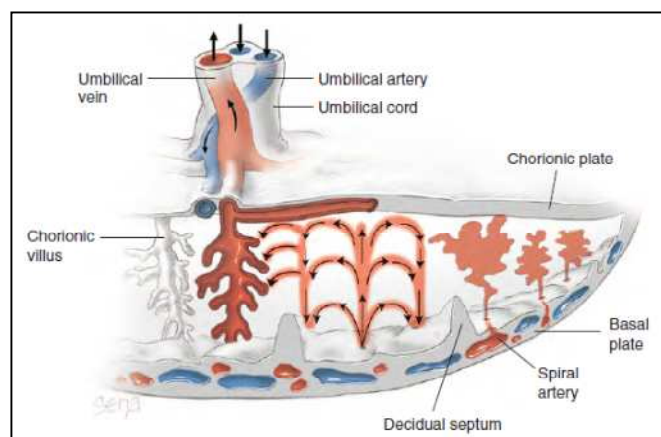


Figura 2. Placenta humana a término. (1)



Durante el embarazo normal, el remodelamiento arterial en el útero es caracterizado por cambios estructurales que incluyen la desintegración de la túnica media, de la lámina elástica interna y el remplazo de endotelio por células del trofoblasto extraveloso (EVT) que expresan un fenotipo endotelial. Estos cambios estructurales ocurren a lo largo de las arterias del endometrio y en una parte significativa del miometrio. Dichos cambios involucran la conversión de los tubos angostos de las arterias en tubos flácidos y amplios que facilitan una perfusión placentaria sin obstáculos. Los cambios tempranos en las arterias utero-placentarias, por ejemplo la activación de células endoteliales, se inician antes de la formación de las células del EVT en el sitio arterial, mientras que la finalización del proceso de remodelamiento incluyen el remplazo del endotelio por trofoblasto seguido de la migración de células del EVT y la invasión de las arterias(20). (Figura 3)

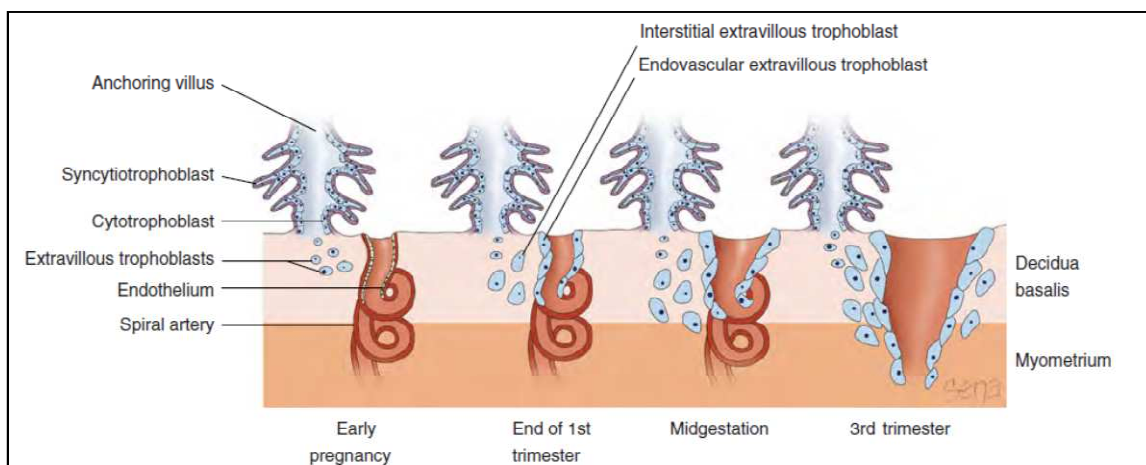


Figura 3. Placentación. En la placentación normal las células trofoblásticas invaden el endotelio de los vasos sanguíneos maternos generando un remodelamiento vascular para promover la adecuada perfusión sanguínea. (1)

Los cambios en los niveles de oxígeno son importantes en la invasión trofoblástica. Durante la implantación y en la placenta hay bajos niveles de  $pO_2$  en el primer trimestre del embarazo necesarios para una máxima invasión trofoblástica. Algunos estudios han revelado que los niveles bajos de oxígeno estimulan la invasión *in vitro* de trofoblastos del

primer trimestre(21). Este incremento en la capacidad invasiva va ligado a una expresión elevada de algunos componentes del sistema de activación del plasminógeno. El proceso de invasión trofoblástica en las células del endometrio, se facilita por la degradación de la matriz extracelular del endometrio/decidua, catalizada por: activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), receptor de activador del plasminógeno-urocinasa (uPA-R), activadores de los inhibidores del plasminógeno (PAI) y metaloproteinasas de matriz (MMPs), producidas por citotrofblastos seleccionados en diversos estadios de la implantación/placentación. A medida que el citotrofblasto se desplaza a través de la decidua, poblaciones seleccionadas de estas células se unen a diversos componentes de la matriz extracelular de las células estromales de la decidua. Esto facilita la migración y, con ello, el establecimiento de anclajes de la placenta para la decidua(18, 21). A medida que avanza el embarazo, en el tercer trimestre y el proceso de invasión trofoblástica disminuye, los niveles de oxígeno aumentan con el correspondiente incremento en el flujo sanguíneo(21). (Figura 3)

## **2.2 COMUNICACIÓN MATERNO-FETAL**

Luego de la concepción, el establecimiento y mantenimiento del embarazo humano está determinado por el blastocisto y luego por los tejidos fetales, embrionarios y extraembrionarios. Se establece un sistema de comunicación biomolecular entre el cigoto-blastocisto-embrion-feto y la madre, que funciona desde antes de la implantación y continúa durante el parto. Este sistema no es unidireccional, además del aporte de nutrientes de la madre al feto, este último envía numerosos mensajes a la madre en este sistema bidireccional de comunicación. El sistema de comunicación materno-fetal es esencial para la implantación correcta del blastocisto, el reconocimiento materno del blastocisto, el mantenimiento del embarazo, las adaptaciones maternas al embarazo, la maduración, nutrición fetal y quizás el comienzo del parto. En primera instancia estos procesos fisiológicos evolucionan a partir de modificaciones que están a cargo de los tejidos embrionarios y fetales y son inducidas por la madre(1).

Existen dos ramas fundamentales del sistema materno fetal anatómico y funcional. Uno es el brazo placentario cuyos componentes funcionales incluyen procesos nutritivos, endocrinos e inmunológicos. El otro es el brazo paracrino cuyos componentes funcionales incluyen el mantenimiento del embarazo, la tolerancia inmunológica, la homeostasis del líquido amniótico y la protección física del feto(1).

Los trofoblastos vellosos y extravelosos son los tejidos embrionarios fetales de la interface anatomica del componente placentario mientras que las membranas fetales avasculares, el amnios y el corion liso son los tejidos fetales de la interfase anatómica del miembro paracrino de este sistema. El componente placentario de este sistema vincula a la madre con el feto del siguiente modo: la sangre de la madre, baña directamente el sinciotiotrofoblasto y la superficie externa de las vellosidades trofoblasticas; la sangre fetal está contenida dentro de los capilares fetales, que recorren los espacios intravellosos de las vellosidades. Por consiguiente, en todos los sitios de contacto directo entre célula y célula, los tejidos de la madre (decidua y sangre) están yuxtapuestos a células extraembrionarias y no a células embrionarias o sangre fetal. Esta es una disposición importante para la comunicación entre el feto y la madre y para la aceptación del producto de la concepción en la madre(1).

Una de las hormonas más importantes en el embarazo es el Lactógeno Placentario Humano (hPL). Esta es una proteína de síntesis exclusiva de la placenta producida por el trofoblasto. Modifica el metabolismo de la madre durante el embarazo para facilitar el suministro de energía al feto(1). Algunas de sus funciones son:

1. Lipólisis materna con incremento de ácidos grasos circulantes. Este proceso es una fuente importante de energía para el metabolismo materno y la nutrición fetal. Estudios *in vitro* sugieren que el hPL inhibe la secreción de leptina en trofoblastos a término.

2. Tiene acción anti-insulinémica o “diabetogénica” que incrementa los niveles maternos de glucosa. Esto favorece la síntesis de proteínas y provee una fuente disponible de aminoácidos para el feto.
3. Es una potente hormona angiogénica que desempeña un papel importante en la formación de la vasculatura fetal (1)

Se ha demostrado que la medición de hPL podría ser utilizado para medir la función placentaria. La concentración de lactogeno placentario sérico aumenta con la edad gestacional y hay una correlación con el peso de la placenta. Adicionalmente se ha encontrado aumentado en mujeres con diabetes y disminuido en insuficiencia placentaria(22-25).

## **2.3 HEMOSTASIS EN EL EMBARAZO**

Durante el embarazo normal y el puerperio, se producen cambios en el sistema fibrinolítico y de la coagulación, por lo que estas condiciones proveen un ambiente adecuado para la formación de eventos tromboticos debido al desequilibrio entre el estímulo trombogénico y mecanismos protectores como son los inhibidores de los factores de la coagulación(26). Existen evidencias de un estado de hipercoagulabilidad durante la gestación, por lo que el embarazo se ha incluido en el grupo de las llamadas trombofilias adquiridas(26-28).

### **2.3.1 HEMOSTASIS EN LA PLACENTA**

Los blancos potenciales de patologías de la coagulación incluyen la circulación uteroplacentaria, el plato basal, el espacio intervelloso, la superficie vellosa del sincitiotrofoblasto y la vasculatura fetoplacentaria. Los dos componentes materno y fetal juegan un papel muy importante en la hemostasia placentaria. Mientras que la sangre materna circula en el espacio intervelloso placentario, las células trofoblásticas en contacto con la circulación provienen del feto. Los componentes de la coagulación que

proviene de la madre son los factores de coagulación, la proteína C y la proteína S. Los provenientes del feto son el factor tisular (FT), las proteínas anticoagulantes como la trombosmodulina (TM), el receptor endotelial de la proteína C (REPC) y la anexina V. Algunos componentes son derivados de origen materno y fetal como el inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT), el activador del plasminógeno tisular (tPA) y la uroquinasa (uPA).(29)

La coagulación en la superficie del trofoblasto puede iniciarse debido a varios estímulos incluyendo apoptosis y endotoxinas circulantes. El trofoblasto está en continua regeneración con fases de proliferación, fusión, diferenciación funcional y diferenciación terminal donde juega un papel muy importante la cascada apoptótica(30, 31). Los eventos hemostáticos operan en la superficie materna del trofoblasto, principalmente en la superficie trofoblástica alterada o apoptótica, la cual se encuentra en constante estado entre coagulación y fibrinólisis(31). El epitelio dañado activa la cascada extrínseca de la coagulación, este fenómeno se ha evidenciado en sincitiotrofoblastos sanos los cuales son potencialmente procoagulantes externalizando la fosfatidil serina en la superficie de la membrana materna durante la fusión del sincitiotrofoblasto(32). A pesar de estas observaciones la coagulación no ocurre a través de toda la superficie debido a que el trofoblasto produce proteínas anticoagulantes como la trombosmodulina y la anexina V(33-35). Otros factores en el trofoblasto o en su superficie que pueden influenciar a hemostasis son la sintasa del Óxido Nítrico la cual está asociada con la síntesis del óxido nítrico y la reducción de la activación plaquetaria(36, 37).

Los cambios hemostáticos que ocurren en la circulación uteroplacentaria durante el embarazo incluyen adaptación fisiológica en las arterias espirales uterinas, estos cambios son necesarios para la acomodación del incremento del flujo materno en el espacio intervilloso(31). Las arterias espirales de la decidua del revestimiento trofoblástico, tienen reducida la capacidad de lisar la fibrina al compararlas con la vasculatura endotelial; este fenómeno puede ser causado por los altos niveles de inhibidores del activador del plasminógeno (PAI)(38). El principal mediador de la hemostasis en la placenta es el factor

tisular, el cual previene la hemorragia post-implantación(34). Algunos componentes de la coagulación no solo están involucrados en la hemostasia sino también en la diferenciación de los vasos sanguíneos placentarios(39). Existe una tendencia pro coagulante que hace a la placenta más susceptible de riesgo trombótico y un exceso en la activación de la coagulación requiere mecanismos inhibitorios para evadir la oclusión vascular(31). (Figura 4).

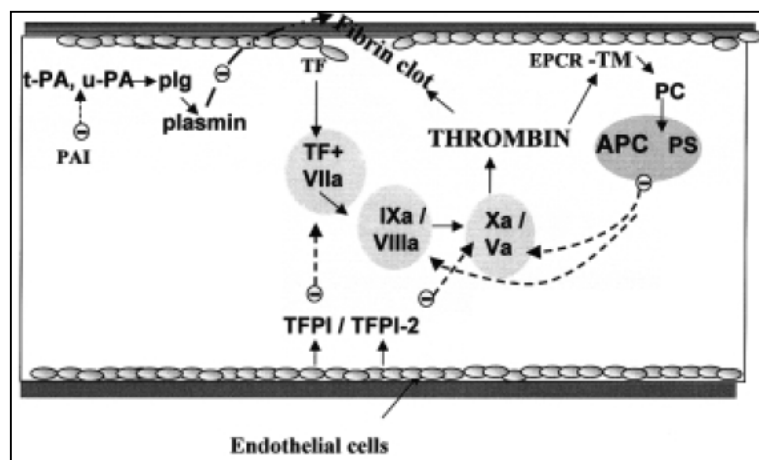


Figura 4. Mecanismos hemostáticos en los vasos sanguíneos (29)

Los principales mecanismos procoagulantes, anticoagulantes y antifibrinolíticos que juegan un papel muy importante en la hemostasis placentaria son el factor tisular, la trombomodulina y el PAI-1, respectivamente.

### 2.3.1.1 FACTOR TISULAR

El factor tisular (FT), el principal activador de la coagulación, es una glicoproteína producida e inducida en monocitos y células endoteliales. El contacto del factor VII con el factor tisular da inicio a la vía extrínseca de la coagulación(31). Tiene tres dominios: uno extracelular (residuos 1-219), uno hidrofóbico (residuos 220-242) y uno citoplasmático (243-263) (40)(Figura 5). El gen del FT se localiza en el cromosoma 1 en la región 1p21-22(40, 41). Tiene un tamaño de 12.4 kb y posee 6 exones(42).

Durante el embarazo la placenta es una fuente importante de FT(29). Las células del trofoblasto, las cuales limitan con las microvellosidades fetales, posiblemente son las candidatas para enfrentar la coagulación inmediata en la placenta(29). Por esta razón se han realizado estudios investigando la presencia del FT en el trofoblasto y se ha demostrado su presencia en las membranas microvellosas(43), adicionalmente Dalaker (1985) trabajando con células citotrofoblasticas de ratón, demostró que estas producen factor tisular *in vitro* (44), Revardieu et al. cultivó células trofoblasticas de placenta humana y logró identificar factor tisular de extractos de membranas del sicitotrofoblasto(45). Sin embargo diferentes autores han reportado que no han logrado localizar el FT en el trofoblasto (46) y en otro estudio con inmunohistoquímica se localizó en las células perivacuulares de la vasculatura vellosa(47). La discrepancia entre los estudios puede ser explicada por el uso de diferentes métodos de investigación por ejemplo diferentes anticuerpos y diferentes técnicas de inmunohistoquímica(29).

La implantación y el desprendimiento de la placenta de las paredes uterinas son dos procesos hemostáticos importantes durante el embarazo. El FT es esencial en los procesos de embriogénesis, angiogénesis, implantación y hemostasis y la placenta es la fuente transitoria durante el embarazo(48, 49). La presencia de grandes cantidades de FT parece ser esencial para el mantenimiento de la hemostasis en la placenta y en el útero(29). Posiblemente el factor tisular actúa previniendo la hemorragia post implantacional durante la invasión trofoblástica endovascular(50). Se ha demostrado evidencia de su importancia en ratones transgénicos que expresaban bajas cantidades de FT humano los cuales presentaban una incidencia del 14-18% de hemorragia fatal postparto y los que no expresaban FT ni humano ni murino presentaban una incidencia del 42% de hemorragia fatal en la mitad del embarazo, sugiriendo que el FT juega un papel importante en la hemostasis uterina(17, 51). En la placenta, el FT probablemente funciona tanto como un activador de la coagulación y como señalizador para el desarrollo de vasos sanguíneos(29).

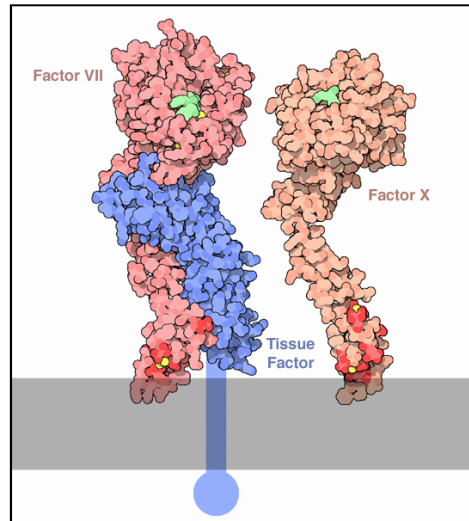


Figura 5. Estructura del factor tisular y su unión al factor VII (52)

### 2.3.1.2 TROMBOMODULINA

La Trombomodulina (TM) es una proteína de membrana endotelial la cual forma complejos no covalentes con la trombina. Tiene una función de anticoagulante natural alterando la especificidad del sustrato de la trombina. Cuando la trombina se une con la TM, la actividad procoagulante de la trombina se inhibe y la eficacia del complejo TM-trombina activa la proteína C (anticoagulante). La proteína C activa degrada a los factores de coagulación V y VIII activados, resultando en una disminución de la producción de trombina e inhibición de la coagulación(33). Esta proteína pesa 63.3 kDa y tiene 575 aminoácidos. La secuencia predictiva de la proteína incluye un péptido señal de 21 aminoácidos, un dominio de unión al ligando amino terminal de 223 aminoácidos (lecitin-like), una región de homología al factor de crecimiento epidérmico (EGF) de 236 aminoácidos, un segmento rico en serina/treonina de 34 aminoácidos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y un tallo citoplasmático de 38 aminoácidos(53). (Figura 6). Se localizó el gen de la trombomodulina en la el cromosoma 20 en la región 20p11.2(54). Jackman et al., estudiaron la estructura del gen de la trombomodulina y reportaron la ausencia de intrones(55).



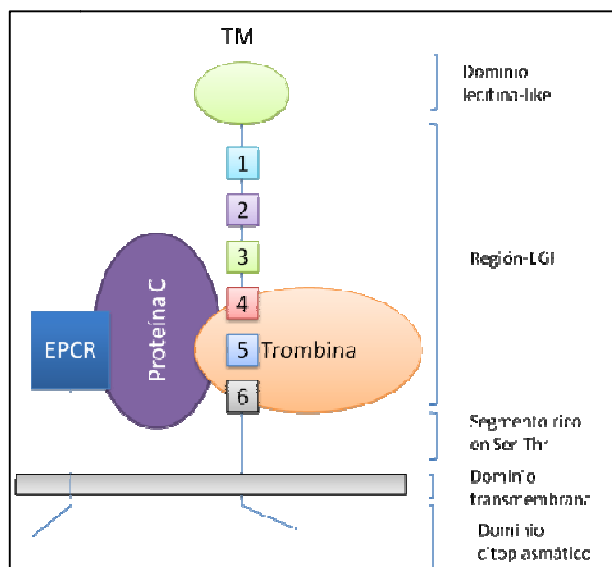


Figura 6. Estructura de la trombosmodulina. Modificado de (56)

La TM se expresa en el endotelio capilar y por lo tanto se encuentra en altas concentraciones en órganos altamente vascularizados como corazón, pulmones y placenta(57). En la placenta, la TM se expresa en el trofoblasto y en el endotelio capilar fetal(33). La vía anticoagulante principal en la placenta es mediada por la TM(16). La disminución de TM se ha asociado con la formación de depósitos de fibrina o trombos en los vasos, resultando tanto en una falla en la anticoagulación o fibrinólisis(58); estos trombos impiden la circulación sanguínea a través de la microcirculación placentaria y se asocian con cambios isquémicos(16). En modelos animales se ha encontrado que un mal funcionamiento del gen de la *TM* conlleva a la letalidad embrionaria causada por un defecto en la placenta. Estos estudios muestran que una función del sistema trombosmodulina-proteína C es controlar el crecimiento y supervivencia de las células trofoblásticas de la placenta. Esta función es esencial para el mantenimiento del embarazo(59).

### 2.3.1.3 INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1

El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) es el inhibidor fisiológico de la uroquinasa (uPA) y del activador de tejido del plasminógeno (tPA). Forma un complejo estable PAI-1-tPA con una proporción de 1:1 y es uno de los principales reguladores del sistema fibrinolítico *in vivo*(29). Está codificado por el gene *SERPINE1* y regula negativamente la fibrinólisis e inhibe la disolución de los coágulos(60). Ginsburg et al., aislaron el cDNA de PAI-1 y por análisis de secuencia nucleotídica, encontraron que este cDNA codifica para una pre-proteína de 402 aminoácidos. La molécula madura contiene 379 aminoácidos con un peso aproximado de 42.7 kDa. (Figura 7). La secuencia de aminoácidos tiene extensa homología con los miembros de la familia de inhibidores de la serina proteasa (SERPINS)(61). El gen *SERPINE1* tiene aproximadamente 12.2 kb y contiene 9 exones (62) y está ubicado en el cromosoma 7 en la región 7q22.1-q22.3(63).



Figura 7. Estructura de la proteína PAI-1 (Autoría propia)

La forma activa de PAI-1 es inestable y tiene una vida media de 30 minutos. La vitronectina ha sido identificada como una proteína que se une al PAI-1 en el plasma, estabilizando la forma activa. Cuando las plaquetas son estimuladas por trombina, PAI-1 es liberado de la superficie placentaria protegiendo al coágulo de una lisis prematura. Este mecanismo causa un incremento acelerado de PAI-1 en la circulación. La trombina también estimula la síntesis de PAI-1 en las células endoteliales(64).

En la placenta PAI-1 se ha localizado en las el sincitiotrofoblasto de las vellosidades, así como en el espacio extravelloso intersticial y en el trofoblasto vascular; también fue encontrado co-localizado con fibrina perivillosa que recubre las vellosidades

coriónicas(65). La biosíntesis de PAI-1 es inducida por citoquinas incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1)(66). La expresión anormal puede afectar el mecanismo de degradación de la fibrina promoviendo la acumulación de los depósitos(67), esta acumulación causa oclusión e infartos en los vasos placentarios, resultando en una insuficiencia placentaria y posible aborto(29). Se ha demostrado la presencia de PAI-1 en placentas de embarazo normal y una elevación en los niveles plasmáticos (68, 69) comparados con mujeres no embarazadas.

## **2.4 ENFERMEDADES EN EL EMBARAZO DE ORIGEN PLACENTARIO**

### **2.4.1 RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO (RCIU)**

#### **2.4.1.1 DEFINICIÓN**

La RCIU se define como el cuadro clínico en el cual el feto no alcanza su pleno potencial de crecimiento y como desenlace final se encuentra una disminución en el peso corporal, siendo menor al percentil 10 para la edad gestacional según las tablas de crecimiento(10). Según el consenso basado en las diferentes recomendaciones internacionales los fetos que presentan uno o varios de los siguientes parámetros son considerados como posibles casos de RCIU:

- Crecimiento fetal por debajo del percentil 10 para la edad gestacional con signos de compromiso fetal que incluyen anomalías de la circulación feto placentaria identificadas por Doppler, disminución del líquido amniótico o alteraciones en las pruebas de bienestar fetal (perfil biofísico fetal, monitoreo no estresante - NST).
- El feto con un peso inferior al percentil 3 para la edad gestacional calculado por ecografía.
- Feto con circunferencia abdominal por debajo del percentil 2,5 para la edad gestacional sin alteraciones de otros parámetros biométricos (70)

Adicionalmente, las definiciones propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyen indistintamente fetos con RCIU y fetos constitucionalmente pequeños ya que define a los recién nacidos pequeños para la edad gestacional (PEG) como todos aquellos con peso al nacer por debajo del décimo percentil para la edad gestacional según la curva de Williams(12). La RCIU está asociado con un incremento en la morbilidad perinatal y neonatal (10, 71). Además, posteriormente los niños con RCIU pueden cursar con alteraciones en el crecimiento y desarrollo neurocognitivo (13, 72). También se ha descrito asociación de bajo peso al nacer (BPN) con posterior desarrollo de patologías del adulto como resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular, este hallazgo se ha denominado “hipótesis Barker”(73).

#### **2.4.1.2 CLASIFICACION**

La RCIU puede ser clasificada dependiendo de la severidad, si se encuentra entre los percentiles 5-10 se clasifica como una RCIU leve, si se encuentra entre los percentiles 2-5 es una RCIU moderada y menor del percentil 2 se clasifica como una RCIU severa(74).

Otra forma de clasificarla, que actualmente ha entrado en desuso, depende de que tan temprano se haya generado el daño. Esta clasificación es: simétrica o asimétrica. La RCIU asimétrica ocurre debido a una autorregulación fetal del flujo sanguíneo. La respuesta inicial a la falta de suministro de oxígeno y nutrientes al feto resulta en la derivación del flujo sanguíneo a órganos importantes como el cerebro y las glándulas adrenales. En los músculos y otros órganos como el riñón baja el suministro sanguíneo resultando en un cuerpo más pequeño que la cabeza, disminución en la masa muscular y oligohidramnios. Si el compromiso en la entrega de oxígeno y nutrientes es temprano, persistente o profunda, todos los órganos y tejidos se afectarán y se presentará la RCIU simétrica(75).

### **2.4.1.3 EPIDEMIOLOGÍA**

La RCIU es la causa más importante de mortalidad y morbilidad perinatal, afectando aproximadamente entre 7-15% de los embarazos(11). En los países en vía de desarrollo la RCIU es la forma más común de BPN(12). La prevalencia de RCIU varía ampliamente entre los países en desarrollo, encontrándose desde 10-55%. Según lo reportado por el estudio colaborativo de antropometría materna y desenlace del embarazo de la OMS el RCIU se presenta en un 17% en Colombia(13). Se ha demostrado que el 52% de los mortinatos están asociados con RCIU y el 10% de la mortalidad perinatal es consecuencia de la RCIU. Hasta el 72% de muertes fetales sin explicación están asociadas a PEG por debajo del percentil(76).

### **2.4.1.4 ETIOLOGIA**

La RCIU es considerada una condición multifactorial que involucra a varios factores de diverso origen que pueden alterar el crecimiento fetal, como son: factores maternos (hipertensión, patología renal, cardiopatías, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, alcohol, cigarrillo, drogas ilícitas, desnutrición) y factores feto-placentarios (Insuficiencia placentaria asociada o no a patología materna, preeclampsia, nefropatías, trombofilias, anomalías congénitas, infecciones congénitas, gestaciones múltiples y anomalías cromosómicas)(74). El RCIU es idiopático en el 40-50% de los casos, pero se conocen factores que afectan el crecimiento fetal normal, como son: paridad, raza, sexo fetal, altitud, gestación múltiple y talla y peso maternos(77). Entre los factores de riesgo, los mecanismos trombóticos llevan a otras complicaciones en el embarazo además de RCIU, como defectos del tubo neural, abrupcio de placenta y preeclampsia (78, 79). Por otro lado se ha observado una fuerte asociación entre un cariotipo fetal anormal, defectos genéticos mendelianos, disomias uniparentales y RCIU. Por este motivo se han realizado estudios de genes candidatos implicados en esta enfermedad. Existen varios estudios en modelos murinos en los cuales mutaciones en varios genes candidatos resultan en un

compromiso de la función placentaria y RCIU. Por ejemplo mutaciones en gen *ESX* causa un falla en la vascularización del laberinto placentario(80), ratones knock-out del gen *Igf2* tienen un transporte placentario insuficiente(81) y ratones deficientes de p57/Kip2 presentan cambios en el laberinto y en el espongiotrofoblasto(82). Estos datos indican que la RCIU no debe ser considerada una enfermedad *per se*, sino un manifestación de muchos posibles defectos genéticos que afectan principalmente el desarrollo y función placentario(83).

#### **2.4.1.5 FISIOPATOLOGIA**

El crecimiento fetal es un proceso complejo regulado por factores genéticos, disponibilidad de nutrientes uteroplacentarios y hormonas. Sin embargo, independientemente de la condición de base, un feto que no alcanza su potencial de crecimiento está, por definición, sometido a procesos de reducción tisular debido a la disminución del suministro nutricional de la circulación materna(83).

El metabolismo y transporte placentario son los factores principales involucrados en la nutrición y metabolismo fetal ya que ellos determinan la disponibilidad de oxígeno y nutrientes al feto. La placenta es el órgano clave entre la madre y el feto, pero su función no puede ser simplemente descrita como conductor pasivo, sino debe considerarse como un sensor entre las condiciones maternas nutricionales, metabólicas, endocrinas y vasculares y los requerimientos fetales(84). Un fenotipo placentario asociado con defectos en el metabolismo de la placenta y el transporte se ha descrito en RCIU. Estudios han demostrado de forma consistente una reducción significativa en el suministro de aminoácidos de la placenta hacia el feto(84). La disminución del flujo materno sanguíneo puede deberse a obstrucciones en los vasos. Los depósitos de fibrina en el espacio materno intervelloso es un hallazgo común en las placentas con esta patología. Los dos hallazgos patológicos más frecuentes involucrados con acumulación de depósitos anormales de fibrina asociados con RCIU son infartos del piso materno e intervellositis crónica masiva(15). En la RCIU con flujo umbilical normal, la concentración de aminoácidos y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) están

significativamente disminuidos, mientras que los ácidos grasos no esterificados (NEFA) están significativamente aumentados. En los casos más severos, el flujo sanguíneo umbilical se ve afectado y como consecuencia hay cambios en la circulación sanguínea en el cerebro, hígado y corazón del feto. En esta situación el feto desarrolla progresivamente hipoxia y lactacemia, los niveles de gradientes de glucosa se aumentan y ocurren cambios en el transporte placentario para ácidos grasos y proteínas(84). En la Figura 8 se resumen los cambios metabólicos en relación a la severidad de la RCIU.

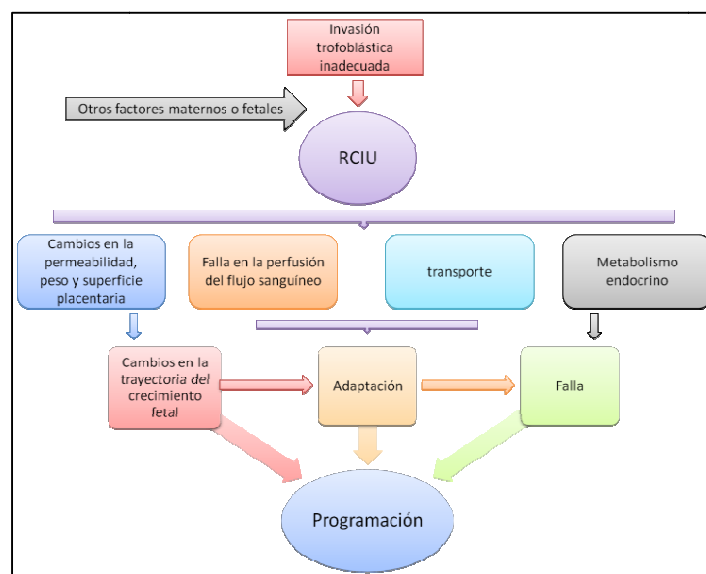


Figura 8. RCIU placentaria. Los cambios en el peso, superficie y permeabilidad de la placenta se producen junto con los cambios en el flujo de la sangre útero/umbilical que conducen a la perfusión desigual y a la reducción de la transferencia de nutrientes. Por otra parte, cambios funcionales ocurren en el transporte de nutrientes placentarios y en la función metabólica/endocrina. En conjunto, estas alteraciones placentarias llevan a cambios en la trayectoria del crecimiento fetal, con las respuestas iniciales de adaptación en la RCIU que eventualmente se dirigen a una falla final. Todos estos pasos pueden influir en la programación fetal. Modificado de Cetin(84).

#### 2.4.1.6 DIAGNOSTICO Y MANEJO

El reconocimiento de la RCIU comienza con una precisión en la edad gestacional. La mejor manera de determinarla es midiendo la longitud coronilla-nalgas (CRL) por ultrasonido en

el embarazo temprano. Las biometrías seriadas por ultrasonido son útiles para identificar fetos que no alcanzan su crecimiento potencial. Los métodos comúnmente utilizados para la estimación del tamaño fetal son la palpación clínica, medición de la altura uterina y la biometría fetal por ecografía(76).

El manejo obstétrico depende de la etiología de la RCIU. Cuando la etiología es por causas maternas, el manejo depende de la severidad de la enfermedad materna. Cuando la etiología es tiene origen fetal, el manejo se limita en evitar la prematurez y la morbilidad materna. Cuando la RCIU es consecuencia de una etiología placentaria (insuficiencia placentaria), el manejo se basa en una evaluación cuidadosa para detectar el tiempo óptimo para el parto. Los métodos de monitoreo más utilizados incluyen flujometría Doppler, cardiotocografía, evaluación del volumen de líquido amniótico, perfil biofísico fetal y monitoreo de movimientos fetales(76).

## **2.4.2 PREECLAMPSIA**

### **2.4.2.1 DEFINICION Y CLASIFICACION**

La preeclampsia (PE) hace parte de un grupo de enfermedades hipertensivas del embarazo, que se dividen en hipertensión gestacional, preeclampsia y preeclampsia asociada a hipertensión crónica(6). La PE se define como hipertensión acompañada de proteinuria (>0.3 g en 24 horas) y se caracteriza porque aparece después de la semana 20 de gestación y se resuelve después del embarazo(85). Las complicaciones de la PE son el síndrome de HELLP y la eclampsia. El síndrome de HELLP se define como hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y plaquetas disminuidas, asociado a PE y la eclampsia incluye todo el cuadro de la PE con presencia de convulsiones(4). La preeclampsia se clasifica en leve y severa: la PE leve se define como una presión arterial  $\geq 140/90$  mmHg con proteinuria de 0,3 a 3 g/día y la PE severa se define como presión arterial  $\geq 160$  a 170/100 a 110 mmHg, proteinuria de 3 a 5 g/día y/o cefalea(86).



#### **2.4.2.2 EPIDEMIOLOGIA**

La PE usualmente ocurre durante la segunda mitad del embarazo con una frecuencia del 2% al 8%(6). Cerca del 10% al 15% de las muertes maternas están asociadas con PE y eclampsia en países subdesarrollados y en vía de desarrollo(7, 8). En nuestro país estas cifras alcanzan el 42%(9).

#### **2.4.2.3 ETIOLOGIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA PREECLAMPSIA**

La etiología de la preeclampsia es aún desconocida pero se han formulado algunas teorías. Una teoría aceptada es que la PE tiene un modelo de dos estadios. En el primer estadio hay una alteración en la invasión citotrofoblástica a las arterias espirales uterinas en el inicio del embarazo debido a una reducción de la presión de la perfusión uteroplacentaria y una consiguiente isquemia/hipoxia placentaria(16), esta isquemia/hipoxia puede desencadenar la liberación de factores placentarios que inician una cascada de eventos celulares y moleculares produciendo una disfunción de las células endoteliales y del músculo liso con posterior aumento de la resistencia vascular y presión sanguínea(16). En el segundo estadio hay una respuesta inflamatoria sistémica materna excesiva mediada por citoquinas y con daño endotelial, esta respuesta juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad(87). En casos de insuficiencia placentaria se han reportado resultados histológicos concordantes con inadecuado remodelamiento vascular que no desencadenan PE, por este motivo se postula la posibilidad que debería estar presente una condición materna de base para la manifestación de este desorden. Cualquiera que sea la causa, ya es aceptado que la liberación de factores en respuesta a la insuficiente perfusión placentaria es un evento importante en la manifestación de los síntomas maternos(88). Adicionalmente se han asociado algunos factores de riesgo a esta patología como son obesidad materna, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad renal y trombofilia(89).

En mujeres con PE se ha descrito que las arterias espirales sufren un remodelamiento incompleto y el flujo de sangre fluctúa en el espacio intervilloso(87), adicionalmente el ultrasonido Doppler muestra mayores fluctuaciones del flujo sanguíneo en las arterias uterinas de pacientes con PE comparado con controles(31). De acuerdo a estos resultados Bar et al. afirmaron que la isquemia e hipoxia placentaria no se mantienen y que el daño hipoxia-reperfusión en lugar de hipoxia crónica estable, puede ser la causa principal de daño tisular(90). Esta isquemia causa efectos secundarios maternos responsables por la fase sintomática de esta enfermedad generando estrés oxidativo y disfunción inmunológica incrementando la producción de citoquinas y autoanticuerpos contra angiotensina-1, desbalance entre los factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y antiangiogénicos como el receptor soluble de VEGF (sFlt-1) y disfunción endotelial(88). (Figura 9)

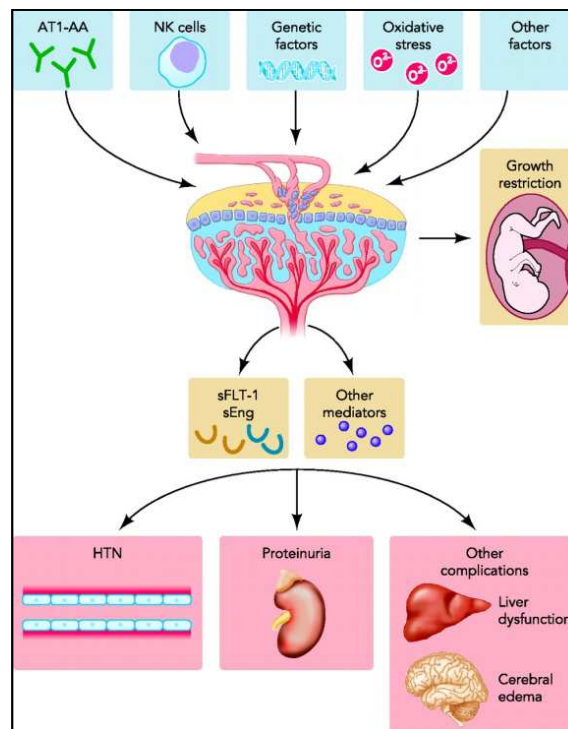


Figura 9. Resumen de la patogénesis de la PE. Factores inmunológicos, estrés oxidativo, anomalías en las células NK y otros factores pueden causar disfunción placentaria que puede conllevar a la liberación de factores angiogénicos y otros mediadores inflamatorios que inducen hipertensión, proteinuria y otras complicaciones de la PE. (91)

#### **2.4.2.4 TRATAMIENTO**

A pesar de los esfuerzos, no ha sido posible prevenir la preeclampsia. La estabilización de las condiciones de la madre y establecimiento del bienestar fetal son los primeros objetivos en el tratamiento de las embarazadas con preeclampsia severa. Después, se deben realizar esfuerzos para distinguir a las pacientes con preeclampsia de cualquier otra condición, incluyendo la hipertensión no proteinúrica, hipertensión crónica, enfermedad renal crónica y lupus eritematoso sistémico. La extracción del feto y la placenta es generalmente aceptada como el único tratamiento efectivo para la preeclampsia y en pacientes con preeclampsia leve se hace un manejo expectante para que el embarazo progrese lo mejor posible. En contraste, se recomienda el parto inmediato en todas las pacientes con preeclampsia severa, para prevenir las complicaciones maternas y fetales, sin importar la edad del embarazo, (92). Se ha descrito que la terapia con dosis bajas de aspirina reduce la incidencia de PE en mujeres con alto riesgo de desarrollarla (93) es posible que otras estrategias dirigidas a tratar el desequilibrio en la coagulación también puedan tener un impacto benéfico.

#### **2.5 PAPEL DE LA HEMOSTASIA EN PREECLAMPSIA Y RCIU**

Se ha propuesto que una alteración en la hemostasis placentaria podría estar involucrada con la causa de la PE y la RCIU ya que el embarazo representa un estado de hipercoagulabilidad con cambios adquiridos en factores hemostáticos (14) además ya se ha reportado que placentas con PE presentan anomalías en la vascularización, vasculitis, trombosis de las arterias espirales e infartos en el parénquima(15). La activación de la coagulación sanguínea en mujeres con PE ocurre en un estadio temprano de la enfermedad y muchas veces antecede a los síntomas clínicos y a los cambios anormales en los parámetros de laboratorio. Por ejemplo se ha reportado incremento de factores como el VIII, von Willebrand, complejo trombina-antitrombina fibrina soluble y niveles de

TM. Adicionalmente hay una resistencia a la propiedad anticoagulante de la proteína C activada (APC)(94). También se han reportado niveles de antitrombina reducidos; una vida media disminuida de las plaquetas y el conteo plaquetario está disminuido(95). De forma notoria, la antitrombina, trombomodulina y el conteo plaquetario se correlaciona positivamente con la severidad de la enfermedad. Los depósitos de fibrina se encuentran usualmente en segmentos de la decidua de las arterias espirales y lesiones oclusivas en la vasculatura placentaria. Las manifestaciones clínicas de la PE son consideradas secundarias a la hipoperfusión, asociado a la formación de microtrombos y exceso de depósitos de fibrina que afectan múltiples órganos además de la placenta(96, 97). Factores locales como el FT, la TM y PAI-1 trabajan juntos para asegurar que la sangre fluya a través de las arterias espirales previniendo la extravasación después de la invasión de las células del EVT(98).

Se han desarrollado estudios analizando el FT placentario en preeclampsia y complicaciones vasculares. Kanfer et. al. encontró que en placentas de mujeres con hipertensión inducida por el embarazo, algunas con PE, el FT no presentaba diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles(99). En otro estudio donde se midió el factor tisular en 6 placentas de mujeres con preeclampsia y 7 placentas controles normales, se encontró un aumento significativo de FT en placentas con preeclampsia(67). Un año más tarde Bellart et al. obtuvo resultados similares(100). Adicionalmente se demostró que la expresión del mRNA de *FT* a nivel de placenta (67) y a nivel leucocitario (101) se encontraba incrementada en mujeres con preeclampsia. En el 2010 Teng et al. reportó diferencias estadísticamente significativas en la expresión de FT en placenta y plasma de mujeres con preeclampsia y que estos valores se correlacionaban positivamente(102). Adicionalmente se ha encontrado un incremento de *FT* en placentas de gestaciones con PE que presentaron anomalías en la velocimetría en el Doppler(103). Este aumento podría contribuir a la formación de depósitos de fibrina y lesiones oclusivas, además este factor podría jugar un papel primordial en las complicaciones tromboticas asociadas a la PE(104). También se han reportado que en

gestantes con preeclampsia se presentan niveles elevados de FT plasmático(100, 102, 105).

En preeclampsia, se ha reportado que se encuentran aumentados los niveles y la actividad de la TM en plasma en comparación con embarazos normales(106). En placentas de gestantes con PE severa se ha visto aumentada la expresión de esta proteína en los fibroblastos vasculares (16) y en RCIU se encontraron diferencias estadísticamente significativas con aumento en los niveles de proteína en placenta en comparación con los controles(107). Este aumento en la expresión en las vellosidades de los miofibroblastos estromales en PE podría jugar un papel en la preservación de la función de estas células en la contractilidad vellosa y la modulación de los espacios intervelllosos podrían afectar la circulación fetal o placentaria(16).

En mujeres con preeclampsia se ha reportado una disminución de la actividad fibrinolítica con un aumento de los niveles de PAI-1 tanto en plasma como en placenta(87, 108-111), adicionalmente se ha encontrado que los niveles en plasma de PAI-1 se correlacionan con la severidad del daño placentario(108, 109). En RCIU a nivel de proteína no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en placenta(109). Purwosunu et al, reportaron que el mRNA de PAI-1 se encontraba aumentado en el plasma de mujeres con preeclampsia(112).

## **2.6 ACIDOS NUCLEICOS PLASMATICOS LIBRES CIRCULANTES**

Hoy en día el diagnóstico prenatal requiere de muestras de células fetales obtenidas por vías invasivas, como amniocentesis y toma de muestras de vellosidad coriónica. Estos procedimientos invasivos representan un riesgo para la madre y el feto(113). Para evitar este riesgo potencial, se han desarrollado métodos de genética para el diagnóstico prenatal. Estudio previos han encontrado ácidos nucleicos libres en el plasma de mujeres embarazadas(114, 115). Este último proveniente de células trofoblásticas (116) debido al

tráfico celular entre el feto y la madre(117). Estos ácidos nucleicos pueden permitir una alternativa segura y precisa de métodos de diagnóstico no invasivo. En los últimos años, se ha realizado un gran progreso en esta área. En particular, los estudios se han encaminado en detectar ADN y RNA del feto, en el plasma materno, además la utilización de la técnica de PCR en tiempo real (QRT-PCR) ha permitido detectar niveles muy bajos de estas moléculas(118). En PE se han encontrado aumentados los niveles de mRNA de *hPL*, *inhibina A*, *KISS-1*, *Proteína plasmática asociada a embarazo (PAPP-A)*, *inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1)*, *selectina-P* y *receptor del factor del crecimiento vascular endotelial (VEGFR)* en mujeres en el tercer trimestre. A raíz de estos resultados se analizó si era posible predecir la preeclampsia en mujeres asintomáticas midiendo la expresión de la proteína placentaria 13 (PP13) dando como resultado diferencias estadísticamente significativas entre mujeres asintomáticas que desarrollaron preeclampsia y controles sanos(119). Adicionalmente se han estudiado los genes involucrados en la coagulación *activador de plasminógeno tisular (tPA)* y *PAI-1*, y se encontró que su expresión esta significativamente incrementada en pacientes con preeclampsia ( $p < 0.0001$ )(112). Purwosunu et al., 2009, evaluó los niveles de mRNA de *PAI-1*, *tPA*, *factor de crecimiento endotelial vascular*, *receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular*, *endoglina*, *gen específico de placenta-1* y *selectina P* en mujeres con y sin preeclampsia. Se encontró que la expresión de todos los genes evaluados estaba aumentada en el plasma de pacientes con preeclampsia y la expresión génica de todos los genes evaluados se correlaciono positivamente con la severidad de la enfermedad(120).

Adicionalmente en RCIU se ha reportado que la concentración de mRNA de la hormona del crecimiento (GH2) se correlaciona de manera estadísticamente significativa con el peso al nacer y las medidas biométricas fetales. Además la concentración de mRNA de ADAM12 se encontró aumentado en gestantes con RCIU y preeclampsia con diferencias estadísticamente significativas comparado con las pacientes normales(121).

Debido a que complicaciones del embarazo como PE y RCIU son de origen placentario, en este estudio se propone que la medición de mRNA de *hPL* en el plasma de gestantes

podría servir como un marcador de la función placentaria y poder monitorear los cambios en el desarrollo del embarazo en gestantes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión a nivel de mRNA del Factor tisular, Trombomodulina y PAI-1 en placentas que cursan con restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) o preeclampsia (PE)

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión a nivel de mRNA de los genes *factor tisular*, *la trombomodulina* y *PAI-1* por medio de la técnica de PCR en tiempo real en placentas con diagnóstico de RCIU, PE y placentas normales.
- Evaluar la función placentaria a través de métodos no invasivos cuantificando los niveles de mRNA de lactógeno placentario humano (*hPL*) en el plasma de gestantes con diagnóstico de RCIU y pacientes sin complicaciones del embarazo
- Determinar el papel de los niveles placentarios de mRNA de Factor tisular, trombomodulina y PAI-1 en RCIU y PE.
- Establecer la relación entre los niveles de mRNA de *hPL* en plasma materno y la presencia de RCIU.

#### 3.3 HIPOTESIS

Hipótesis nula: En las placentas de embarazos complicados con RCIU o preeclampsia no hay diferencias en la expresión de mRNA de de los genes *factor tisular*, *la trombomodulina* y *PAI-1* en comparación con placentas de embarazos sin complicaciones.

Hipótesis alterna: En las placentas con diagnóstico de RCIU o preeclampsia no hay diferencias en la expresión de mRNA de de los genes *factor tisular*, *la trombomodulina* y *PAI-1* en comparación con placentas sanas.



## **4. METODOLOGÍA.**

La metodología se dividió en RCIU y PE debido a que se siguieron protocolos diferentes y se realizaron en dos países diferentes.

### **4.1 RCIU**

#### **4.1.1 TIPO DE ESTUDIO**

Se desarrolló un estudio observacional analítico de tipo casos y controles, siendo la RCIU el evento de interés.

#### **4.1.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se estudiaron 8 gestantes en la ciudad de Bogotá que cursaron con embarazo con diagnóstico de RCIU de etiología desconocida en el tercer trimestre del embarazo y 21 gestantes control con parto a término del Hospital San Ignacio. Tanto las pacientes de la muestra y los controles tuvieron parto por cesárea.

#### **4.1.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

##### **4.1.3.1 CASOS**

##### **4.1.3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Pacientes con diagnóstico ecográfico por ecografía convencional o ecografía Doppler color en ambas arterias uterinas, fetales y placentarias de RCIU (peso en percentil menor a 10

para la edad gestacional) y recién nacido pequeño para la edad gestacional sin etiología aparente.

#### **4.1.3.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Pacientes con diagnóstico ecográfico de RCIU y bajo peso al nacer con causa conocida (como preeclampsia, TORCH, desnutrición, abuso de sustancias psicoactivas, embarazo múltiple, pobre ganancia peso materno, enfermedad renal, HTA crónica, tabaquismo, ingesta de alcohol, diabetes mellitus, diabetes gestacional, cardiopatías cianóticas, neumopatías obstructivas o restrictivas, abrupcio de placenta, placenta previa), feto/neonato con malformaciones fetales mayores o impresión diagnóstica de patología genética, gestantes que manifiesten su deseo de no participar en el estudio y maternas con condiciones protrombóticas (LES, Síndrome antifosfolípido, trombofilias, cáncer) que tuvieran diagnóstico o evidencia de patología trombóticas en la evaluación histopatológica de la placenta. También se excluyeron gestantes que tuvieron mortinatos.

#### **4.1.3.2 CONTROLES**

##### **4.1.3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

Mujeres gestantes sin ningún tipo de complicación del embarazo ni enfermedad de base que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

##### **4.1.3.2.1 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

Mujeres gestantes que presentaron algún tipo de complicación del embarazo. Gestantes que presentaron otro tipo de patología que posiblemente interfiriera con el desarrollo de la investigación. Gestantes que tuvieran evidencia de patología trombóticas en la evaluación histopatológica de la placenta.

#### **4.1.4 ASPECTOS ETICOS**

Se cumplieron las disposiciones establecidas en la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, Título II de la investigación en seres humanos, Capítulo 1 de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, artículos 5-10 (b) investigación con riesgo mínimo, 12, 14, 15(122). Así mismo, el estudio se acogió a la normatividad en principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos, establecida en la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial(123).

Al ser un estudio de no-intervención, se considera este como bajo riesgo. Sin embargo, los aspectos éticos contemplados para el desarrollo de esta investigación contaron con el aval del comité de ética de la Facultad de Medicina de la pontificia Universidad Javeriana.

Antes de iniciar la recolección de la información y de las muestras de sangre y placenta, se informó a los pacientes que voluntariamente participaron en el estudio y a los individuos sanos, los objetivos, métodos y el tipo de estudio que se realizaría, su importancia, procedimientos, posibles riesgos y beneficios que acarrearía participar. Adicionalmente se le garantizó la confidencialidad de sus datos y sus resultados, los cuales solo los conocerían los investigadores del estudio. Igualmente, se les informó que eran libres de no participar en el estudio y de revocar su consentimiento de participación.

#### **4.1.5 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN**

Se realizó una entrevista a cada gestante seleccionada en los casos y a las gestantes sanas para la recolección de la información personal y antecedentes médicos de interés. Se realizó valoración física evaluando peso, talla y presión arterial. Se le preguntó acerca de la edad materna y el estrato socioeconómico. Se tuvo en cuenta los hallazgos ecográficos en los controles prenatales, edad gestacional del diagnóstico de RCIU y los antecedentes en embarazos anteriores. Los datos de la atención del parto se tomaron de la historia

clínica. Se tomaron en cuenta: edad gestacional al momento del parto, peso y sexo del recién nacido y el peso de la placenta. Se clasificó la restricción según las tablas reportadas por Montoya-Restrepo et al, para población Colombiana(124) (Anexo 1).

#### **4.1.6 TOMA DE MUESTRAS**

##### **4.1.6.1 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO DE PLACENTA**

Inmediatamente después del alumbramiento se procedió a realizar un corte de aproximadamente 2 cm con escalpelo estéril, en el tejido placentario en la cara fetal entre el cordón umbilical y el borde de la placenta como se muestra en la Figura 10. La muestra de tejido se introdujo en un tubo de 2 ml con 500 µl de RNA *latter* (Qiagen) y a -40°C hasta su procesamiento. Cada muestra fue rotulada con el mismo código del formulario de la encuesta. Las muestras se tomaron con previa firma del consentimiento informado. (Anexo 2)

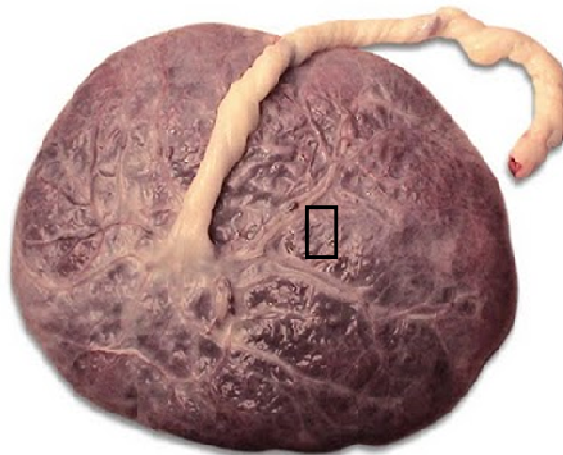


Figura 10. Sitio de toma de la muestra de tejido placentario.(125)

#### **4.1.6.2 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRA DE SANGRE**

Se tomaron 2 muestras de de sangre periférica por venopunción en tubos con EDTA (Acido Etil Diamino Tetra Acetico) (Becton Dickinson vacutainer), en cada toma se recolectaron 5 cc de sangre. La muestra fue tomada por una enfermera o una persona idónea autorizada. En un tiempo máximo de 15 minutos se separó el plasma por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos, se transfirió el plasma a otro tubo y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Luego el sobrenadante se mezcló con Trizol LS (Invitrogen) en un tubo Falcon de 15 ml (Becton Dickinson) para evitar la degradación del RNA y se almacenó a -40°C hasta su procesamiento. Cada muestra fue rotulada con el nombre y con el mismo código del formulario de la encuesta. En el laboratorio se manejaron las muestras únicamente por el código.

#### **4.1.7 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

##### **4.1.7.1 EXTRACCIÓN DE RNA DE PLACENTA**

Todos los elementos y reactivos utilizados en el procesamiento estaban previamente esterilizados. Se pesaron 75 mg de tejido. El RNA total se extrajo del tejido placentario utilizando Trizol LS (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, modificando por adición de proteinasa K para la lisis celular. Brevemente, la extracción de RNA total se realizó utilizando 1 ml de TRizol LS (Invitrogen™, Life Technologies), el cual se adicionó 500 µl de solución de lisis (EDTA 0.025M, SDS 2%) + 16 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma) y se incubó a 56°C por 24 horas. Posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo, agitando fuertemente y se dejó incubando a temperatura ambiente por 3 minutos. A continuación se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se pasó a otro tubo y se adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico y se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 75%. Se resuspendió

en 50 µl de agua DEPC, se incubó a 56°C por 10 minutos. Se cuantificó por espectrofotometría y 5 µg de RNA se incubaron con 5U de DNAsa I (Epicentre) a 37°C por 30 minutos, luego se volvió a cuantificar para asegurarse de la remoción del DNA. Finalmente se almacenó a -40°C.

#### **4.1.7.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE PLASMA:**

Todos los elementos y reactivos utilizados en el procesamiento estaban previamente esterilizados. Se realizó la extracción del RNA de plasma utilizando el protocolo recomendado por Ng et al.,(118) con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) adicionando 5U de DNAsa I (Epicentre). Brevemente, a la mezcla de plasma-Trizol LS se le adicionaron 400 µl de cloroformo, se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se adicionó el mismo volumen de etano al 70%, se mezcló y se pasó a la columna. Se centrifugó a 10000 rpm por 15 segundos, se descartó el precipitado y se realizó este procedimiento con toda la solución. Se adicionaron 700 µl de buffer RW1 y se centrifugó a 10000 rpm por 15 segundos. Se adicionó 5 U de DNAsa I (Epicentre) a la columna y se incubó a 37°C por 15 minutos. Posteriormente se adicionó 500 µl de buffer RPE y se centrifugó a 10000 por 15 segundos. Se adicionó 500 µl de buffer RPE y se centrifugó 2 minutos. Se pasó la columna a un tubo de 1.5 ml, se adicionó 30 µl de agua estéril y se centrifugó 1 minuto a 10000 rpm, se repitió este paso y se descartó la columna. El RNA total se almacenó a -40°C. La concentración del RNA total se determinó a 260 nm utilizando el equipo GeneQuant Pro (Amersham Bioscience). La lectura de absorbancia a 280 permitió determinar la pureza de la muestra calculando la relación 260/280.

#### **4.1.7.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

La transcripción reversa del RNA total a cDNA se realizó utilizando el kit SuperScriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una reacción con volumen final de 20 µl que contenía: 1 X de buffer, 0.5mM de dNTPs, 50 ng de random primer, 0.005 M de DTT, 40U de RNase OUT y 200U de SuperScript con una posterior digestión con 2U de RNAsaH siguiendo las recomendaciones del fabricante. La retrotranscripción del RNA extraído de plasma se

realizó a partir de 7  $\mu$ l de RNA y para placenta se realizó a partir de 1  $\mu$ g de RNA. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su amplificación.

#### **4.1.7.4 PCR EN TIEMPO REAL (QPCR-RT)**

La PCR tiempo real cuantitativa combina la técnica de PCR convencional amplificando una región específica de un gen blanco en una muestra, con el monitoreo del proceso de amplificación, mediante la detección de una señal fluorescente emitida por un fluorocromo. Estos fluorocromos se unen al ácido nucleico que se está amplificando correlacionándose la cantidad de señal emitida por el fluorocromo con la cantidad de moléculas amplificadas de la región específica del gen, permitiendo su cuantificación.

Los datos obtenidos por PCR tiempo real son el ciclo de amplificación C(t) (Cycle threshold) que corresponde al punto en el que el nivel de fluorescencia basal es sobrepasado por la señal de amplificación. Otro parámetro importante es la temperatura de melting (T<sub>m</sub>) o curva de disociación que es la temperatura en la que el 50% de las moléculas se encuentra en cadena sencilla y el otro 50% en cadena doble, ésta es específica del producto amplificado y determina la especificidad de los primers ya que depende de la cantidad de nucleótidos C+G de la región amplificada(126).

Se utilizó el termociclador LigthCycler (Roche) usando la química SYBR Green (LigthCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit; Roche) y el software Lightcycler 4.1 (Roche). La cuantificación de mRNA de *hPL* en plasma fue realizada por medio de la técnica de cuantificación absoluta ya que se quería establecer la concentración exacta en copias por ml de ese transcrito en el plasma. En placenta para los genes *FT*, *PAI-1* y *TM* se llevó a cabo el método de cuantificación absoluta con curva estándar sin normalizar y normalizando con el gen housekeeping *GAPDH*. La PCR para la amplificación de mRNA de *hPL* fue realizada en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l con una concentración final de 0.25  $\mu$ M de cada primer y 1X de FastStart SYBR Green Master (Roche), 7  $\mu$ l de cDNA de plasma y 2.5  $\mu$ l de cDNA de placenta, siguiendo el protocolo recomendado. Las condiciones

estandarizadas para la amplificación con cada par de primers se muestran en el capítulo de resultados. Los primers fueron tomados de la literatura y se confirmaron en el programa Primer3 (127). Las secuencias se encuentran en la tabla 1. Todas las reacciones se hicieron por duplicado y con controles de agua y DNA.

| GEN          | SECUENCIA  | TAMAÑO DEL FRAGMENTO (pb) | REFERENCIA |
|--------------|--|---------------------------|------------|
| <i>hPL</i>   | F: CATGACTCCCAGACCTCCTTC<br>R: TGCGGAGCAGCTCTAGATTG        | 97                        | (118)      |
| <i>FT</i>    | F: AATGTGGAGAGCACCGGTTTC<br>R: CGTTCATCTTCTACGGTCACATTG    | 149                       | (128)      |
| <i>PAI-1</i> | F: TGATGGCTCAGACCAACAAG<br>R: ATAAGGGGCAGCAATGAACA         | 122                       | (129)      |
| <i>TM</i>    | F: TAACGAAGACACAGACTGCGATT<br>R: CTAGCCCACGAGGTCAAGGT      | 108                       | (130)      |
| <i>GAPDH</i> | F: TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG<br>R: TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT | 240                       | (131)      |

Tabla 1. Características de los primers

#### 4.1.7.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se realizó a partir del producto de PCR purificado con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), previa confirmación del tamaño del fragmento en geles de agarosa al 1.5%. La concentración de copias se calculó con el programa Illumina DNA Copy Number calculator(132). Se realizaron 4 diluciones seriadas con un rango entre  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^1$  copias. Cada muestra fue analizada por duplicado y en cada análisis se montaron dos controles negativos en los cual en vez de cDNA se colocó agua.



## **4.2 PREECLAMPSIA**

### **4.2.1 TIPO DE ESTUDIO**

Se desarrolló un estudio observacional analítico de tipo casos y controles, siendo la preeclampsia el evento de interés.

### **4.2.2 POBLACION DE ESTUDIO**

Se estudiaron gestantes en la ciudad de Santiago de Chile (Chile) que cursaron con embarazo con diagnóstico de PE en el tercer trimestre del embarazo y gestantes control con parto a término del hospital parroquial de San Bernardo entre los años 2008 y 2009. Se realizó cuestionario y examen físico a la madre.

### **4.2.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **4.2.3.1 CASOS**

##### **4.2.3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSION**

La PE se definió como hipertensión *de novo* y proteinuria después de la semana 20 de gestación. La hipertensión se definió como presión diastólica >100 mmHg o medición dos veces seguidas con >140/90 mmHg con 6 horas de diferencia. La proteinuria se definió como proteínas en orina de 24 horas >300 mg/día(133).

##### **4.2.3.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSION**

Mujeres que dieron a luz a recién nacidos con aneuploidias o que expresaron su interés en no participar en el estudio.

#### **4.2.3.2 CONTROLES**

##### **4.2.3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSION**

Mujeres gestantes sin ningún tipo de complicación del embarazo ni enfermedad de base que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

##### **4.2.3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSION**

Mujeres gestantes que presentaron algún tipo de complicación del embarazo. Gestantes que presentaron otro tipo de patología que posiblemente interfiriera con el desarrollo de la investigación.

#### **4.2.4 ASPECTOS ETICOS**

El estudio se acogió a la normatividad en principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos, establecida en la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial(123).

Al ser un estudio de no-intervención, se considera este como bajo riesgo. Sin embargo, los aspectos éticos contemplados para el desarrollo de esta investigación contaron con el aval del comité de ética de la comisión de Bioética de la Universidad de los Andes (Chile) y de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) (Chile).

Antes de iniciar la recolección de la información y de las de placenta, se informó a los pacientes que voluntariamente participaron en el estudio y a los individuos sanos, los objetivos, métodos y el tipo de estudio que se realizaría, su importancia, procedimientos, posibles riesgos y beneficios que acarrearía participar. Adicionalmente se le garantizó la confidencialidad de sus datos y sus resultados, los cuales solo los conocerían los

investigadores del estudio. Igualmente, se les informó que eran libres de no participar en el estudio y de revocar su consentimiento de participación.

#### **4.2.5 RECOLECCION DE LA INFORMACION**

Se realizó una entrevista a cada gestante seleccionada en los casos y a las gestantes sanas para la recolección de la información personal y antecedentes médicos de interés. Se realizó valoración física evaluando peso, talla y presión arterial. Se tuvo en cuenta los hallazgos ecográficos en los controles prenatales, edad gestacional del diagnóstico de PE y los antecedentes en embarazos anteriores. Los datos de la atención del parto se tomaron de la historia clínica. Se tomaron en cuenta: edad gestacional al momento del parto y peso del recién nacido. Las muestras se tomaron previa firma del consentimiento informado (anexo 3)

#### **4.2.6 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO DE PLACENTA**

Inmediatamente después del alumbramiento se procedió a realizar un corte de aproximadamente 2 cm en el tejido placentario con escalpelo estéril en la cara fetal entre al cordón umbilical y el borde de la placenta como se muestra en la figura 10. Se almacenó en agua libre de DEPC a -80°C hasta su procesamiento. Cada muestra fue rotulada con el mismo código del formulario de la encuesta.

#### **4.2.7 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

##### **4.2.7.1 EXTRACCION DE RNA DE PLACENTA**

Todos los elementos y reactivos utilizados en el procesamiento estaban previamente esterilizados. Se pesaron 75 mg de tejido. El RNA total se extrajo del tejido placentario utilizando Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Brevemente la extracción de RNA total se realizó utilizando 1 ml de TRIzol (Invitrogen™, Life Technologies), el cual se adicionó al y se dejó a temperatura ambiente por un tiempo de 5 minutos. Posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo, agitando fuertemente y se dejó incubando a temperatura ambiente por 3 minutos. A continuación se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se pasó a otro tubo y se adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico y se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 75%. Se resuspendió en 50 µl de agua DEPC, se incubó a 56°C por 10 minutos se adicionó 1 µl de DNasa I (Promega) y 10 µl de buffer 10X se incubó a 37°C por 30 minutos, se adicionó 1 µl de solución de stop y se incubó a 65°C por 5 minutos. Finalmente se almacenó a -80°C.

#### **4.2.7.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

La transcripción reversa del RNA total a cDNA se realizó utilizando el kit SuperScriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una reacción con volumen final de 20 µl que contenía: 1 X de buffer, 0.5mM de dNTPs, 50 ng de random primer, 0.005 M de DTT, 40U de RNase OUT, 200U de SuperScript y 5 µl de RNA con una posterior digestión con 2U de RNasaH siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su amplificación.

#### **4.2.7.3 PCR EN TIEMPO REAL**

Se utilizó en termociclador CHROMO 4 (MJ Research) con el sistema SYBR Green. La PCR fue realizada en un volumen de reacción de 25 µl con 5 µl de muestra, 0.5X SYBR Green I (Lonza), 0.2 µM de cada primer, 1X de buffer 5X, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM de dNTPs y 1.5U de Taq polimerasa (GoTaq Flexi, Promega, USA). Las condiciones estandarizadas para la amplificación con cada par de primers se muestran en el capítulo de resultados. Los primers fueron tomados de la literatura y se confirmaron en el programa Primer3(127). Las secuencias se encuentran en la tabla 1. Todas las reacciones se realizaron por

duplicado. Se realizó una cuantificación relativa con respecto a Gliceraldehido-6-fosfato deshidrogenasa (GADPH) realizando la lectura a 82°C según el método de Pfaffl(134).

#### **4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se determinó la significancia de las diferencias en los niveles de expresión de mRNA y proteínas de los genes *FT*, *PAI-1* y *TM* entre el grupo de casos y el grupo control mediante la prueba estadística no paramétrica de Mann – Whitney. Se realizó coeficiente de correlación de Spearman para las variables cuantificación absoluta vs cuantificación relativa. Todas las pruebas fueron evaluadas con un nivel de confianza del 95% en el programa estadístico Stata 9.1.

## 5. RESULTADOS

Al igual que en la metodología los resultados se dividen en RCIU y preeclampsia

### 5.1 RCIU

#### 5.1.1 CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACION

En total se recolectaron los datos de 12 casos y 22 controles, pero se excluyeron 4 casos y 1 control debido a que el recién nacido presentaba algún criterio de exclusión. El grupo de casos lo conformaron 8 mujeres gestantes en el tercer trimestre del embarazo con diagnóstico de RCIU idiopático. En la tabla 2 se muestran las características demográficas de la población. Las variables edad materna, edad del recién nacido, peso de la placenta, gestaciones, estrato socioeconómico y sexo no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. Las variables peso del recién nacido e índice peso del recién nacido/placenta presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0003$  y  $p=0.002$ , respectivamente). Con respecto a la clasificación de la RCIU el 50% de los casos presentaban una RCIU asimétrica y el otro 50% presentaban RCIU simétrica. Adicionalmente 3 pacientes presentaban RCIU leve y 5 de moderado a severo y 2 pacientes presentaban anormalidades en el Doppler. La diferencia en relación peso de la placenta/peso del recién nacido entre los casos y los controles junto al hallazgo que indica que no hay diferencias en el peso de la placenta entre los grupos evaluados indica compromiso del crecimiento fetal pero no de la placenta, vale la pena resaltar que la razón encontrada en los controles es similar a la reportada en la literatura como normal (1/5 a 1/6)(18)

El grupo control lo conformaron 21 gestantes las cuales no presentaron ninguna complicación del embarazo, fue un embarazo a término, el recién nacido nació sin ninguna patología y la madre no presentó ninguna patología de base.

|   | Casos (n=8) |               | Controles (n=21) |               | p              |
|---|-------------|---------------|------------------|---------------|----------------|
|   | Mediana     | Rango min-max | Mediana          | Rango min-max |                |
| Edad materna (años)                       | 26,5        | 20-34         | 28               | 20-38         | 0,3649*        |
| Edad del Recién nacido (semanas)          | 37,5        | 31-40         | 38               | 37-42         | 0,1052*        |
| Peso del recién nacido (gramos)           | 2230        | 895-2775      | 2855             | 2470-3460     | <b>0,0003*</b> |
| Peso placenta                             | 460         | 290-475       | 470              | 390-610       | 0,3731*        |
| Índice peso RN/placenta                   | 4,65        | 3,09-5,78     | 6,12             | 5,49-8,09     | <b>0,002*</b>  |
|   | n           | %             | n                | %             |                |
| <b>Primigestante</b>                      |             |               |                  |               |                |
| Si  | 3           | 37,5          | 3                | 14,29         | 0,0934**       |
| No  | 5           | 62,5          | 18               | 85,71         |                |
| <b>Estrato socioeconómico<sup>§</sup></b> |             |               |                  |               |                |
| 1 y 2                                     | 5           | 62,5          | 11               | 52,38         | 0,253***       |
| 3 y 4                                     | 2           | 25            | 9                | 42,86         |                |
| 5 y 6                                     | 1           | 12,5          | 0                | 0,00          |                |
| 1 y 2 y 3                                 | 6           | 75            | 19               | 90,48         | 0,188***       |
| 4 y 5 y 6                                 | 2           | 25            | 1                | 4,76          |                |
| <b>Sexo</b>                               |             |               |                  |               |                |
| F   | 6           | 75            | 14               | 66,67         | 1,000**        |
| M   | 2           | 25            | 7                | 33,33         |                |

Tabla 2. Características demográficas de la población

\* Prueba de Mann-Withney.

\*\* Prueba binomial.

\*\*\* Prueba de Fisher.

<sup>§</sup> Una gestante del grupo control no tenía la información del estrato socioeconómico de su vivienda.

### 5.1.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA

Se realizó extracción de RNA de las muestras de placenta y plasma tanto de los casos como de los controles. Para la extracción de RNA de plasma se tomaron 19 controles y 8 casos. Para la extracción de RNA de placenta se tomaron 19 controles y 5 casos, debido a que no en todas las pacientes se tuvo acceso a la placenta en la sala de partos. En el proceso de estandarización la integridad del RNA de placenta fue verificada en geles de

poliacrilamida denaturantes al 12%, por medio de la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades de RNA ribosomal, 28S y 18S.

Todas las muestras de RNA fueron cuantificadas por espectrofotometría en el equipo Genequant pro (Amersham Bioscience), y se determinó la concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a partir de las absorbancias a 260nm y 280nm. Con la absorbancia a 260nm se calcula la concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del RNA, teniendo en cuenta el factor de conversión para RNA que es de 40. Con la absorbancia a 280nm se determina si la muestra de ácido nucleico se encuentra contaminada, debido a que la absorbancia de las proteínas, fenoles y otros contaminantes es de 280 nm, de forma tal que la tasa de absorbancia 260/280 con valores entre 1.8 y 2.0 indica un RNA de buena calidad y pureza. Adicionalmente se midió la concentración de RNA antes y después del tratamiento con DNAsa I (Epicentre) en las muestras de placenta para asegurarse de la eliminación de DNA como posible contaminante.

La cuantificación de las muestras de RNA de plasma se presenta en la tabla 3 y el la figura 11. Se logró extraer RNA de plasma en el 100% de los casos y de los controles. No se presentaron diferencias en las concentraciones de RNA extraído de plasma comparando los casos con los controles ( $p=0,5975$ ). Los valores de la relación 260/280 se encontraron en un rango de 0,99-1,78.

| <b>Cuantificación RNA<br/>(<math>\mu\text{g}</math>)</b> |            |
|--|------------|
| <b>Controles</b>   |            |
| Mediana  | 1,86       |
| Rango min-max  | 0,3-11,328 |
| <b>Casos</b>   |            |
| Mediana  | 1,75       |
| Rango min-max  | 0,54-9,48  |
| <b>p</b>   | $p=0,5975$ |

Tabla 3. Cuantificación de RNA de plasma



La cuantificación de las muestras de RNA de placenta antes y después del tratamiento con DNAsa se presenta en la tabla 4 y en la Figura 12. Se logró extraer RNA de plasma en el 100% de los casos y de los controles. Después del tratamiento con DNAsa la concentración de RNA en los casos disminuyó en un 95% y en los controles en un 97.8%, este análisis reafirma la importancia de someter a tratamiento con DNAsa el RNA después de la extracción. No se presentaron diferencias en las concentraciones de RNA extraído de placenta comparando los casos con los controles ni antes ni después del tratamiento con DNAsa ( $p=0,4555$  y  $p=0,6695$ , respectivamente). Los valores de la relación 260/280 se encontraron en un rango de 1.5-1.9.

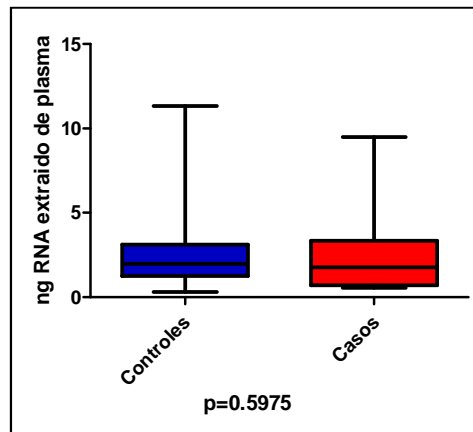


Figura 11. Cantidad de RNA extraído de plasma.

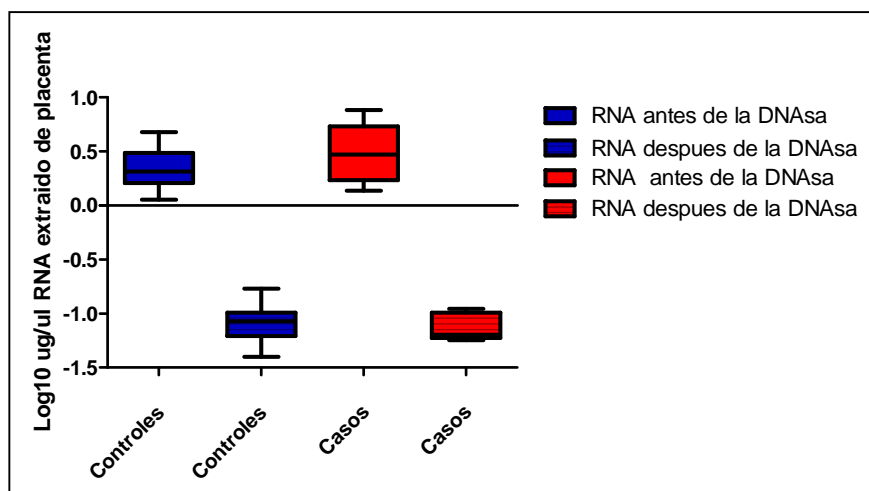


Figura 12. Concentración de RNA extraído de placenta antes y después de tratamiento con DNAsa

|                        | Cuantificación<br>antes de la DNAsa<br>(ug/ul) | Cuantificación<br>después de la<br>DNAsa (ug/ul) |
|------------------------|--|--|
| <b>Controles</b>       |  |  |
| Mediana                | 2,066  | 0,085  |
| Rango min-max          | 2,96-7,668                                     | 0,04-0,171                                       |
| <b>Casos</b>           |  |  |
| Mediana                | 2,96   | 0,064  |
| Rango min-max          | 1,37-7,66                                      | 0,057-0,111                                      |
| <i>p</i> antes DNAsa   |  | 0,4555   |
| <i>p</i> despues DNAsa |  | 0,6695   |

Tabla 4. Cuantificación de RNA de placenta

### 5.1.3 PCR EN TIEMPO REAL

#### 5.1.3.1 ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES DE TIEMPO REAL

El proceso de estandarización de las condiciones de PCR en tiempo real en el laboratorio se realizó igual para los 5 genes analizados *hPL*, *GAPDH*, *FT*, *TM* y *PAI-1*. Se realizó curva de temperatura con diferentes concentraciones de primers para evaluar cuáles eran las mejores condiciones para obtener un amplicón único y con buena señal. Se observó en la curva de melting solamente la presencia de un pico. Adicionalmente se realizó una electroforesis para asegurarse que el tamaño del amplicón coincidiera con lo analizado en el programa primer3 (127). Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 5.

| Gen          | Concentración de primers | Temperatura de anillamiento | Temperatura de disociación (Tm) |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>hPL</i>   | 0,25 µM                  | 62°C                        | 84°C                            |
| <i>FT</i>    | 0,25 µM                  | 62°C                        | 85°C                            |
| <i>TM</i>    | 0,25 µM                  | 62°C                        | 89°C                            |
| <i>PAI-1</i> | 0,25 µM                  | 58°C                        | 84°C                            |
| <i>GAPDH</i> | 0,25 µM                  | 62°C                        | 88°C                            |

Tabla 5. Condiciones estandarizadas de la PCR para cada gen

### 5.1.3.2 LACTÓGENO PLACENTARIO HUMANO (hPL)

Se realizó amplificación por tiempo real de un fragmento del gen *hPL* en el RNA extraído de plasma en los casos y los controles. Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 97 pb el cual se evidenció en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio (Figura 13) y se observó un único pico en la curva melting (Figura 14), lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *hPL* se presenta en la Tabla 6.

|                      | Temperatura        | tiempo      |
|----------------------|--------------------|-------------|
| Denaturación inicial | 95°C               | 10 minutos  |
| <b>45 Ciclos</b>     |                    |             |
| Denaturación         | 95°C               | 10 segundos |
| Anillamiento         | 62°C               | 10 segundos |
| Elongación           | 72°C               | 10 segundos |
| Lectura              | 72°C               | single      |
| Curva melting        | 95°C               | 0 segundos  |
|                      | 60°C               | 1 minuto    |
|                      | 95°C               | 0 segundos  |
|                      | Lectura cada 0,2°C | continuo    |
| Enfriamiento         | 40°C               | 30 segundos |

Tabla 6. Condiciones de amplificación de hPL

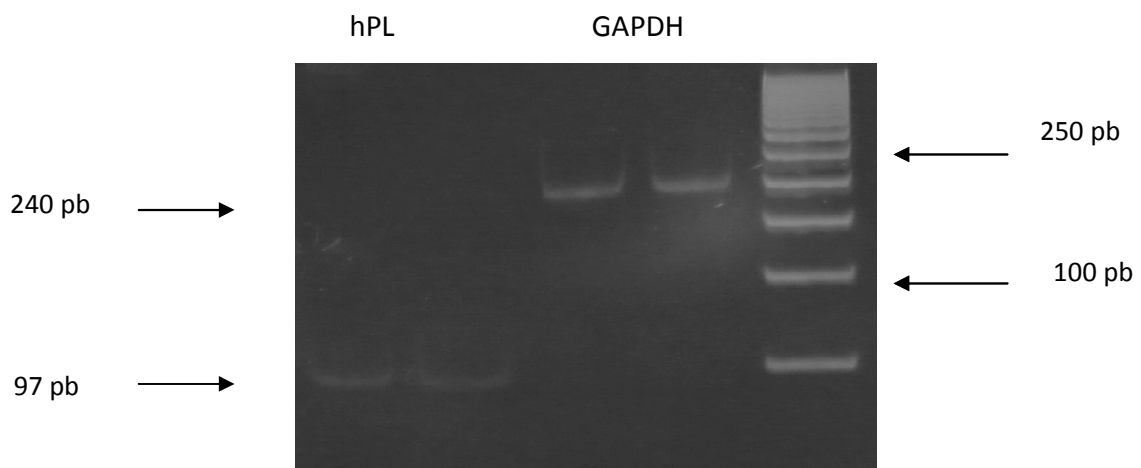


Figura 13. Amplificación de hPL y GAPDH por PCR en tiempo real en gel. Gel de poliacrilamida al 12%. Amplificación de 2 muestras.

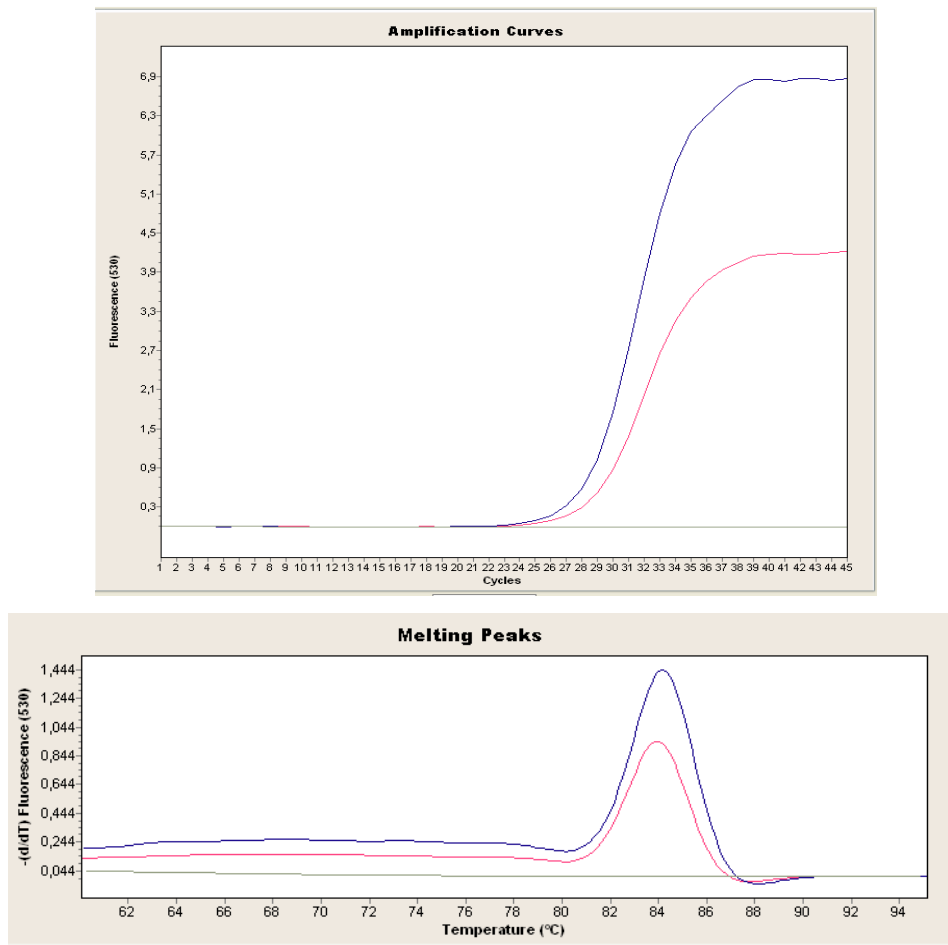


Figura 14. Amplificación de hPL por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras y un control negativo.

### 5.1.3.3 GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA (GAPDH)

Se realizó amplificación por tiempo real de un fragmento del gen GAPDH como housekeeping para normalizar los resultados de los otros genes. Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 240 pb el cual se observó un único pico en la curva melting (Figura 15) y se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio (Figura 13), lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *GAPDH* se presenta en la Tabla 7.

|                             | Temperatura        | tiempo      |
|-----------------------------|--------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C               | 10 minutos  |
| <b>45 Ciclos</b>            |                    |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C               | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C               | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C               | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 84°C               | single      |
| <b>Curva melting</b>        | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | 60°C               | 1 minuto    |
|                             | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 0,2°C | continuo    |
| <b>Enfriamiento</b>         | 40°C               | 30 segundos |

Tabla 7. Protocolo de las condiciones de amplificación de GAPDH

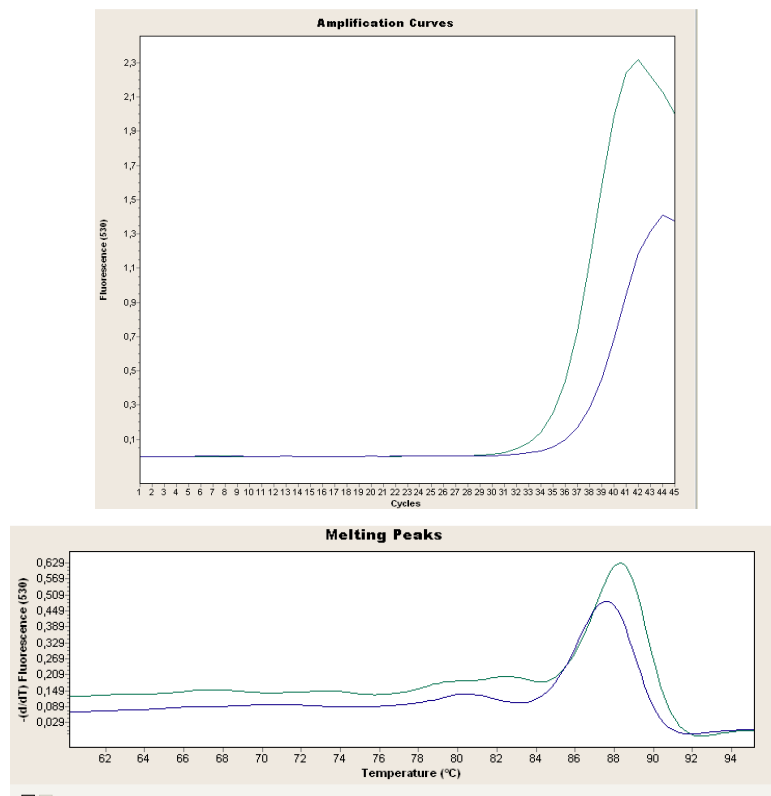


Figura 15. Amplificación de GAPDH por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras.

#### 5.1.3.4 FACTOR TISULAR

Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 149 pb el cual se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio (Figura 16) y se observó un único pico en la curva melting (Figura 17), lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *FT* se presenta en la Tabla 8.

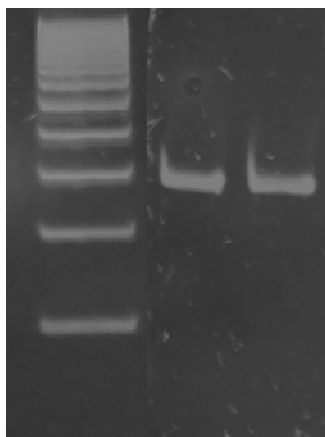


Figura 16. Amplificación de *FT* por PCR en tiempo real en gel. Gel de poliacrilamida al 12%. Amplificación de 2 muestras.

|                             | Temperatura        | tiempo      |
|-----------------------------|--------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C               | 10 minutos  |
| <b>45 Ciclos</b>            |                    |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C               | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C               | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C               | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 72°C               | single      |
| <b>Curva melting</b>        | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | 60°C               | 1 minuto    |
|                             | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 0,2°C | continuo    |
| <b>Enfriamiento</b>         | 40°C               | 30 segundos |

Tabla 8. Protocolo de las condiciones de amplificación de *FT*

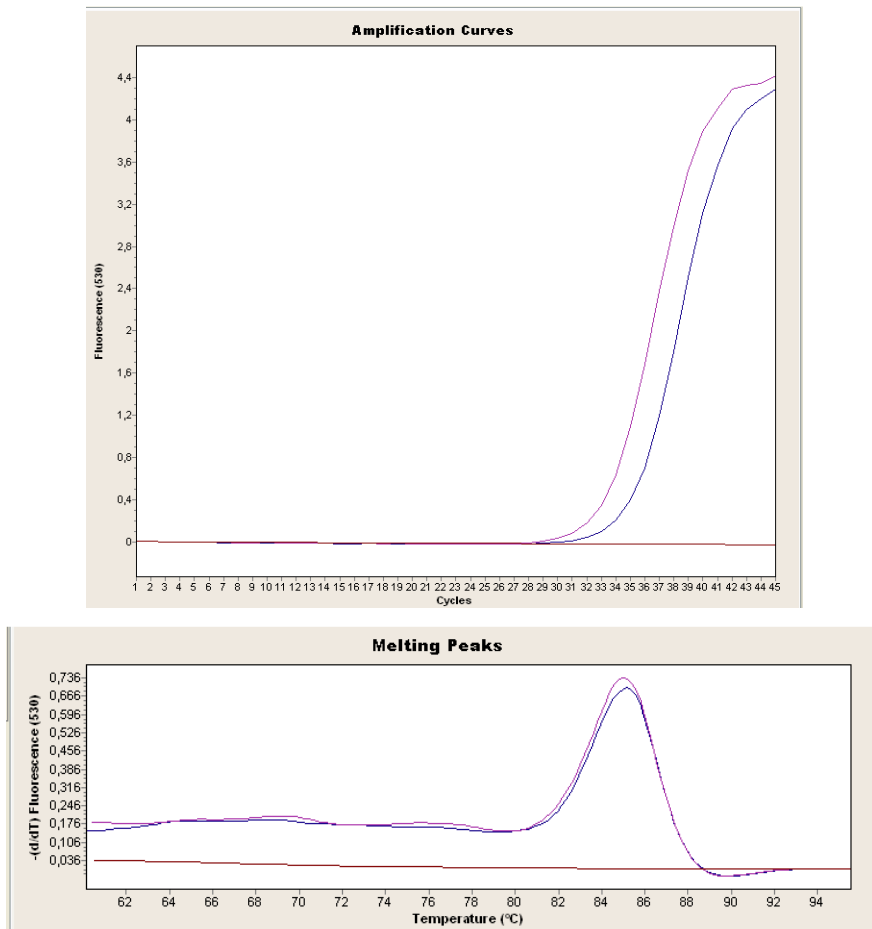


Figura 17. Amplificación de factor tisular por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras y un control negativo.

### 5.1.3.5 TROMBOMODULINA

Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 108 pb el cual se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio (Figura 18) y se observó un único pico en la curva melting (Figura 19) y, lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *TM* se presenta en la Tabla 9.

|                             | Temperatura        | tiempo      |
|-----------------------------|--------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C               | 10 minutos  |
| <b>45 Ciclos</b>            |                    |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C               | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C               | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C               | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 72°C               | single      |
| <b>Curva melting</b>        | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | 60°C               | 1 minuto    |
|                             | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 0,2°C | continuo    |
| <b>Enfriamiento</b>         | 40°C               | 30 segundos |

Tabla 9. Protocolo de las condiciones de amplificación de *TM*

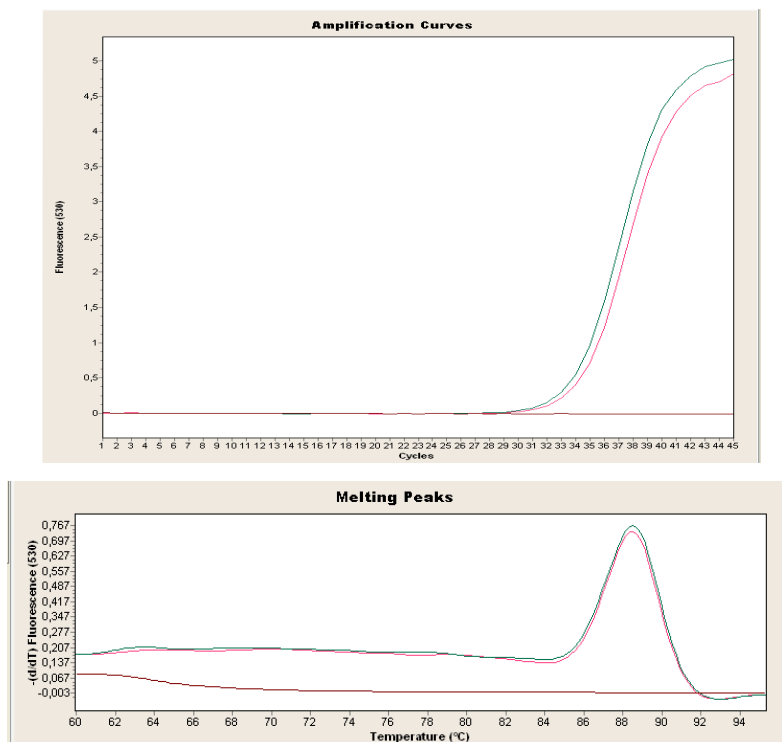


Figura 18. Amplificación de trombomodulina por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras y un control negativo.



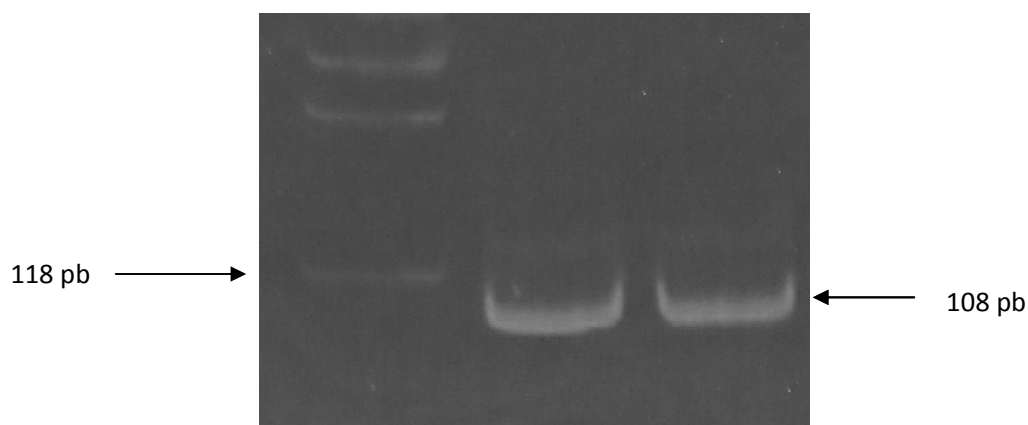


Figura 19. Amplificación de TM por PCR en tiempo real en gel. Gel de poliacrilamida al 12%. Amplificación de 2 muestras.

#### 5.1.3.6 INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO 1 (PAI-1)

Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 122 pb el cual se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio (Figura 20) y se observó un único pico en la curva melting (Figura 21) y, lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *PAI-1* se presenta en la Tabla 10.

|                             | Temperatura        | tiempo      |
|-----------------------------|--------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C               | 10 minutos  |
| <b>45 Ciclos</b>            |                    |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C               | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 58°C               | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C               | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 72°C               | single      |
| <b>Curva melting</b>        | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | 60°C               | 1 minuto    |
|                             | 95°C               | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 0,2°C | continuo    |
| <b>Enfriamiento</b>         | 40°C               | 30 segundos |

Tabla 10. Protocolo de las condiciones de amplificación de *PAI-1*

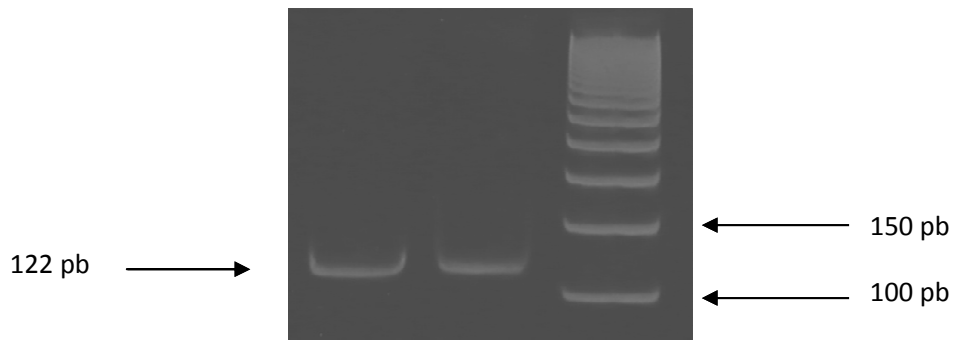


Figura 20. Amplificación de PAI-1 por PCR en tiempo real en dos muestras. Gel de poliácridamida al 12%. Amplificación de 2 muestras.

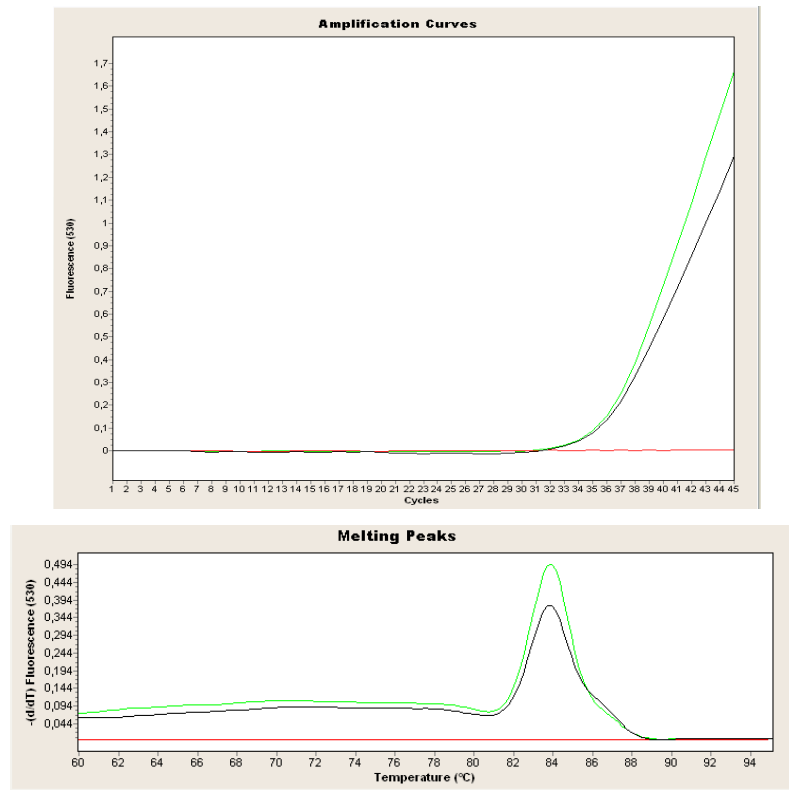


Figura 21. Amplificación de PAI-1 por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras y un control negativo.

### 5.1.3.7 CURVAS DE CALIBRACION

Las curvas de calibración elaboradas para los genes a evaluar se realizaron a partir de cDNA de placenta, el cual fue amplificado por PCR tiempo real, observado en gel de agarosa al 1.5%, purificado y cuantificado por espectrofotometría, se halló la concentración de copias/ $\mu\text{l}$  de cada transcrito de acuerdo a los cálculos de Illumina (132) los cuales se basan en lo reportado por Overbergh et al. (135) el cual propuso que con el peso molecular del fragmento de DNA es posible calcular el número de copias así:

$$\mu\text{g}/\text{pmol} = \text{Tamaño en pb del DNA ds} \times 649 \text{ g/mol} \times 10^{-12} \text{ mol}/\text{pmol} \times 10^6 \mu\text{g}/\text{g}$$

$$\text{Copias} = (\text{ng}/\mu\text{l de DNA} / \mu\text{g}/\text{pmol}) \times 10^{-12} \text{ mol}/\text{pmol} \times 10^{-3} \text{ mg}/\text{g} \times \text{número de Avogadro}$$

Donde pb= pares de bases, ds= doble cadena, nt= nucleótidos. El promedio del peso de una par de base es 649 g/mol. El número de Avogadro es  $6.022 \times 10^{23}$  copias/mol.

A continuación se presenta en la tabla 11 un resumen de los valores de eficiencia, porcentaje de la eficiencia y coeficiente de correlación de las curvas de calibración elaboradas para los genes *hPL*, *GAPDH*, *FT*, *TM* y *PAI-1*. La curva de calibración para todos los genes se realizó a partir de 5 diluciones seriadas de cDNA 1:2 que estuvieron dentro del rango de  $1 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^3$  copias/ml.

| Gen          | Eficiencia | % Eficiencia | Coficiente de correlación | <i>p</i> |
|--------------|------------|--------------|---------------------------|----------|
| <i>GAPDH</i> | 1,64       | 64%          | 1                         |          |
| <i>hPL</i>   | 2,05       | 105%         | 0,95                      | 0,0028   |
| <i>FT</i>    | 2,28       | 128%         | 0,94                      | 0.0138   |
| <i>TM</i>    | 2,1        | 110%         | 0,94                      | 0,0138   |
| <i>PAI-1</i> | 1,79       | 79%          | 1                         |          |

Tabla 11. Valores de la curva estándar

### 5.1.3.8 CUANTIFICACION ABSOLUTA DE hPL EN MUESTRAS DE PLASMA

En los ensayos de expresión del *hPL* se utilizaron como control positivo un cDNA extraído de una muestra de placenta el cual siempre amplificó y como controles negativos agua y DNA genómico extraído de sangre los cuales no amplificaron. La cuantificación absoluta se llevó a cabo en el Software LightCycler v 4.1 con respecto a la curva estándar previamente realizada. Se logró amplificar *hPL* en el 100% de los casos y de los controles. Comparando los niveles de expresión de *hPL* en casos y controles se observó que no había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,5785$ ). En la tabla 12 se muestran los resultados de la cuantificación absoluta en copias/ml de *hPL* y en la Figura 22 se muestra una gráfica de cajas y bigotes con la distribución de los valores de la concentración de *hPL*.

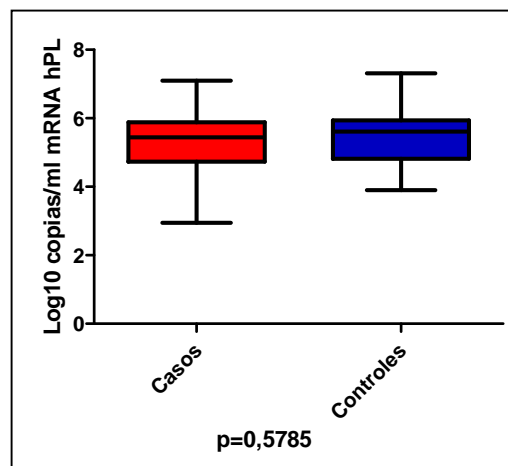


Figura 22. Cuantificación absoluta de mRNA de *hPL*

|                  | Cuantificación absoluta <i>hPL</i> (copias/ml)* |
|------------------|---|
| <b>Controles</b> |   |
| Mediana          | 41.950  |
| Rango min-max    | 797-2.060.000                                   |
| <b>Casos</b>     |   |
| Mediana          | 31.150  |
| Rango min-max    | 89-1.270.000                                    |
| <b>p</b>         | 0,5785  |

Tabla 12. Resultados de la cuantificación absoluta de *hPL* en plasma \*Los resultados se presentan en copias/ml de plasma.

### **5.1.3.9 RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE mRNA DE LAS MUESTRAS DE PLACENTA**

Se logró amplificar mRNA en 18 controles y 5 casos en muestras de placenta. Para el estudio de los genes *FT*, *TM* y *PAI-1* se realizaron análisis de expresión absoluta con respecto a la curva estándar normalizando con el gen *GAPDH*. También se realizó un análisis sin normalizar para analizar si las diferencias cambiaban o seguían igual. La cuantificación absoluta se llevó a cabo en el Software LightCycler v 4.1 con respecto a la curva estándar previamente realizada. La normalización con el *GADPH* se llevó a cabo así:

$$\text{Normalización} = \frac{\text{copias}/\mu\text{g gen Blanco}}{\text{copias}/\mu\text{g gen GAPDH}}$$

Luego se estableció cuantas veces se encontraba aumentada o disminuida la expresión en los casos con respecto a los controles así:

$$\text{Tasa de expresión} = \frac{\text{Mediana expresión en casos}}{\text{Mediana expresión en controles}}$$

En los ensayos de expresión del *GAPDH*, *FT* y *PAI-1* se utilizaron como control positivo un cDNA extraído de una muestra de placenta el cual siempre amplificó y como controles negativos agua y DNA genómico extraído de placenta los cuales no amplificaron.

#### **5.1.3.9.1 GAPDH**

Se analizó si existía diferencia entre casos y controles para corroborar su utilidad como gen housekeeping. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ( $p=0,4995$ ) y se decidió usar como gen housekeeping. En la tabla 13 se

muestra el resumen de medidas de tendencia central y en la figura 23 la representación gráfica de los datos.

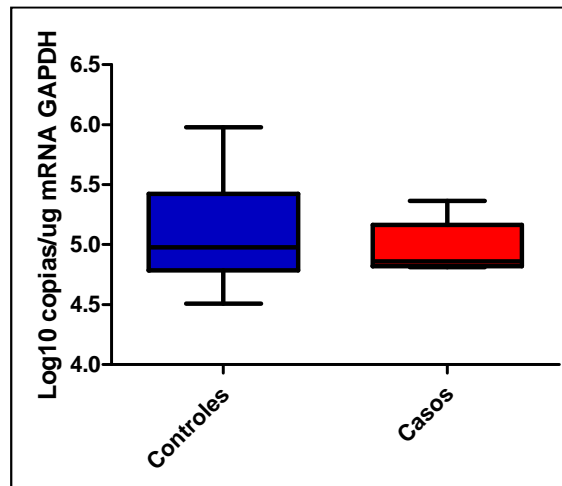


Figura 23. Cuantificación de mRNA de GAPDH

|                  | Copias/ $\mu\text{g}^*$ |
|------------------|-------------------------|
| <b>Controles</b> |                         |
| Mediana          | 95100                   |
| Rango min-max    | 32300-950000            |
| <b>Casos</b>     |                         |
| Mediana          | 72800                   |
| Rango min-max    | 64900-232000            |
| <b>p</b>         | 0,4995                  |

Tabla 13. Cuantificación absoluta de *GAPDH* \*Los resultados se muestran como copias/ $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de placenta

### 5.1.3.9.2 FACTOR TISULAR

En la tabla 14 y la figura 24 se muestran los resultados de la cuantificación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (sin normalizar  $p=0,6095$  y normalizando  $p=0,3491$ ). Adicionalmente se realizó un análisis de coeficiente de correlación entre los valores de copias/ $\mu\text{g}$  y  $\Delta FT/GAPDH$  arrojando una correlación positiva con una  $r=0,8393$  y una  $p=0,000$ ; este resultado indica que ambos ensayos se desempeñan igualmente bien en la determinación de moléculas de *FT* en placenta y que para su análisis podría o no ser normalizado con el gen housekeeping.

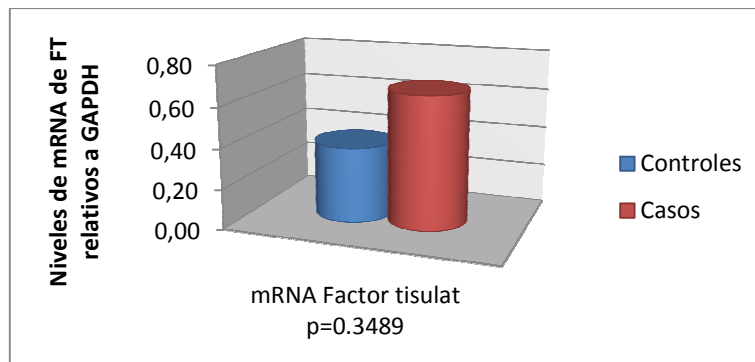
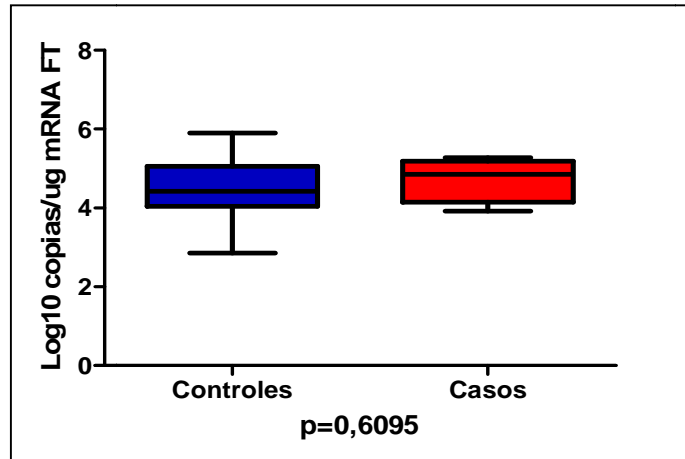


Figura 24. Cuantificación sin normalizar (arriba) y normalizando con GAPDH (abajo) de los niveles de mRNA de *FT*

|                                    | Copias/ $\mu\text{g}^*$ | $\Delta\text{FT}/\text{GAPDH}$ |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <b>Controlos</b>                   |                         |                                |
| Mediana                            | 26400                   | 0,38                           |
| Rango min-max                      | 114-801000              | 0,01-1,43                      |
| <b>Casos</b>                       |                         |                                |
| Mediana                            | 71850                   | 0,66                           |
| Rango min-max                      | 8300-190000             | 0,11-2,83                      |
| <b>Relación casos/controlos</b>    | 2,72                    | 1,76                           |
| <b><i>p</i></b>                    | 0,6095                  | 0,3491                         |
| <b>Coefficiente de correlación</b> |                         |                                |
| $R^2$                              | 0,8393                  |                                |
| <i>p</i>                           | 0,0000                  |                                |

Tabla 14. Valores sin normalizar y normalizando con GAPDH de los niveles de mRNA de *FT*

\*Los resultados se muestran como copias/ $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de placenta

### 5.1.3.9.3 TROMBOMODULINA

En la tabla 15 y la figura 25 se muestran los resultados de la cuantificación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (sin normalizar  $p=0,3946$  y normalizando  $p=0,4436$ ). Adicionalmente se realizó un análisis de coeficiente de correlación entre los valores de copias/ $\mu\text{g}$  y  $\Delta\text{TM}/\text{GAPDH}$  arrojando una correlación positiva con una  $r=0,8272$  y una  $p=0,000$ ; este resultado indica que ambos ensayos se desempeñan igualmente bien en la determinación de moléculas de TM en placenta y que podría o no ser normalizado con el gen housekeeping.

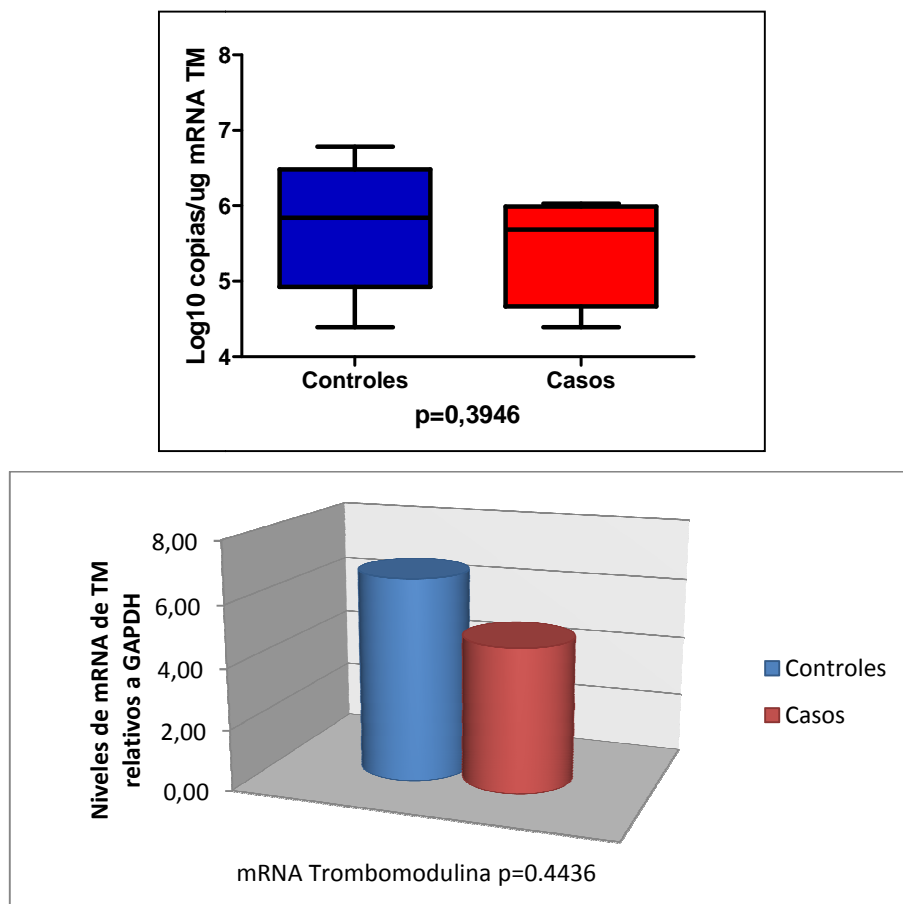


Figura 25. Cuantificación sin normalizar (arriba) y normalizando con GAPDH (abajo) de los niveles de mRNA de TM



|                                    | Copias/ $\mu\text{g}^*$ | $\Delta\text{FT}/\text{GAPDH}$ |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <b>Controles</b>                   |                         |                                |
| <b>Mediana</b>                     | 753000                  | 6,65                           |
| <b>Rango min-max</b>               | 24900-607000            | 0,03-49,56                     |
| <b>Casos</b>                       |                         |                                |
| <b>Mediana</b>                     | 533000                  | 4,73                           |
| <b>Rango min-max</b>               | 24600-107000            | 0,34-11-19                     |
| <b>Relación</b>                    |                         |                                |
| <b>controles/casos</b>             | 1,41                    | 1,41                           |
| <b><i>p</i></b>                    | 0,3946                  | 0,4436                         |
| <b>Coefficiente de correlación</b> |                         |                                |
| <b><math>R^2</math></b>            | 0,8272                  |                                |
| <b><i>p</i></b>                    | 0,0000                  |                                |

Tabla 15. Valores sin normalizar y normalizando con GAPDH de mRNA de *TM* \*Los resultados se muestran como copias/ $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de placenta

#### 5.1.3.9.4 PAI-1

En la tabla 16 y la figura 26 se muestran los resultados de la cuantificación sin normalizar y normalizando. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (sin normalizar  $p=0,5054$  y normalizando  $p=0,6106$ ). Adicionalmente se realizó un análisis de coeficiente de correlación entre los valores de copias/ $\mu\text{g}$  y  $\Delta\text{PAI-1}/\text{GAPDH}$  arrojando una correlación positiva con una  $r=0,6563$  y una  $p=0,0012$ ; este resultado indica que ambos ensayos se desempeñan igualmente bien en la determinación de moléculas de *TM* en placenta y que podría o no ser normalizado con el gen housekeeping.

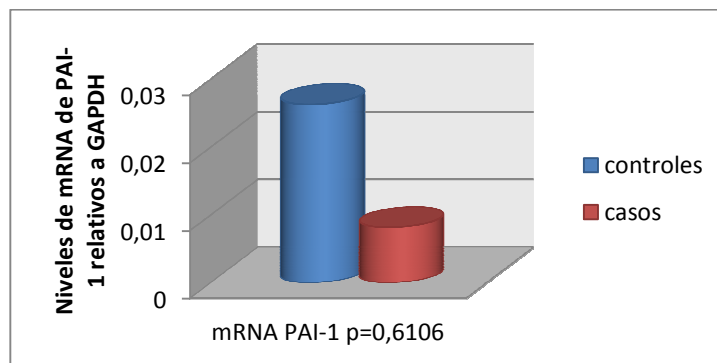
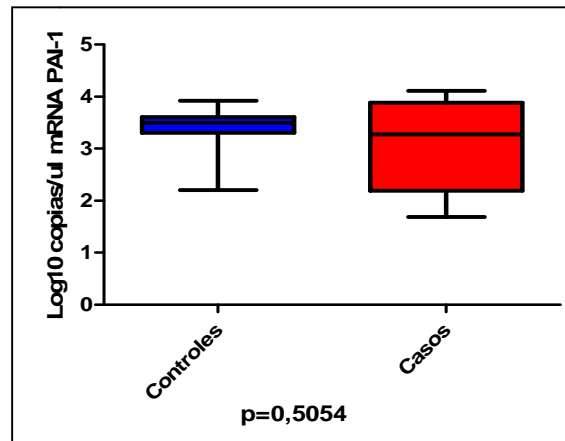


Figura 26. Cuantificación sin normalizar (arriba) y normalizando con GAPDH (abajo) de los niveles de mRNA de PAI-1

|                                    | Copias/ $\mu\text{g}^*$ | $\Delta\text{PAI-1}/\text{GAPDH}$ |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| <b>Controlles</b>                  |                         |                                   |
| Mediana                            | 3140                    | 0,03                              |
| Rango min-max                      | 160-8350                | 0,0012-0,147                      |
| <b>Casos</b>                       |                         |                                   |
| Mediana                            | 1900                    | 0,01                              |
| Rango min-max                      | 48,3-12900              | 0,0007-1,191                      |
| <b>Relación</b>                    |                         |                                   |
| controlles/casos                   | 1,65                    | 3,21                              |
| <b><i>p</i></b>                    | 0,5054                  | 0,6106                            |
| <b>Coefficiente de correlación</b> |                         |                                   |
| $R^2$                              | 0,6563                  |                                   |
| $\rho$                             | 0,0012                  |                                   |

Tabla 16. Valores sin normalizar y normalizando con GAPDH de los niveles de mRNA de PAI-1\*Los resultados se muestran como copias/ $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de placenta

### **5.1.3.9.5 RELACION FT/TM**

Es probable que el desequilibrio entre los factores procoagulantes y anticoagulantes pudiera estar implicado en el desarrollo de la RCIU, por lo cual se realizó análisis de la relación *FT/TM* y se comparó entre casos y controles. La mediana de la relación *FT/TM* en casos es de 0,23 y en los controles 0,05 con una  $p=0,0411$ , estando 4,68 veces aumentado en los casos en comparación con los controles.

## **5.2 PREECLAMPSIA**

### **5.2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACIÓN**

En total se recolectaron los datos de 4 casos y 7 controles. El grupo de casos lo conformaron 4 mujeres gestantes en el tercer trimestre del embarazo con diagnóstico de preeclampsia. En la tabla 17 se muestran las características demográficas de la población. Las variables edad materna, peso del recién nacido, peso de la placenta, índice peso del recién nacido/placenta, gestaciones y sexo no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. La variable edad del recién nacido presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0388$ ). Con respecto a la clasificación de la preeclampsia, inicialmente 1 caso presentaba PE leve y 4 casos presentaban PE severa, sin embargo posteriormente todos los casos cursaron con síndrome de HELLP.

El grupo control lo conformaron 7 gestantes las cuales no presentaron ninguna complicación del embarazo, fue un embarazo a término, el recién nacido nació sin ninguna patología y la madre no presentaba ninguna patología de base.

### **5.2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA**

Se realizó extracción de RNA de las muestras de placenta tanto de los casos como de los controles. En el proceso de estandarización la integridad del RNA de placenta fue

verificada en geles de poliacrilamida denaturantes al 12%, por medio de la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades de RNA ribosomal, 28S y 18S.

|                                  | Casos (n=4) |               | Controles (n=7) |               | p              |
|----------------------------------|-------------|---------------|-----------------|---------------|----------------|
|                                  | Mediana     | Rango min-max | Mediana         | Rango min-max |                |
| Edad materna (años)              | 30          | 20-36         | 22              | 15-35         | 0,1545*        |
| Edad del Recién nacido (semanas) | 38,5        | 28-39         | 39              | 39-41         | <b>0,0388*</b> |
| Peso del recién nacido (gramos)  | 3020        | 785-3835      | 3400            | 3205-3965     | 0,4497*        |
| Peso placenta                    | 414,5       | 198-731       | 702             | 434-758       | 0,0588*        |
| Índice peso RN/placenta          | 5,48        | 3,96-9,13     | 5,35            | 4,40-7,38     | 0,8501*        |
|                                  | <b>N</b>    | <b>%</b>      | <b>n</b>        | <b>%</b>      |                |
| <b>Primigestante</b>             |             |               |                 |               |                |
| Si                               | 0           | 0             | 1               | 14,3          | 0,4601**       |
| No                               | 4           | 100           | 6               | 85,7          |                |
| <b>Sexo</b>                      |             |               |                 |               |                |
| F                                | 2           | 50            | 4               | 57,1          | 1,000**        |
| M                                | 2           | 50            | 3               | 42,9          |                |

Tabla 17. Características demográficas de la población

\* Prueba de Mann-Withney

\*\*Prueba binomial

### 5.2.3 PCR EN TIEMPO REAL

#### 5.2.3.1 ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES DE TIEMPO REAL

El proceso de estandarización de las condiciones de PCR en tiempo real en el laboratorio se realizó igual para los 5 genes analizados *GAPDH*, *FT*, *TM* y *PAI-1*. Se realizó curva de temperatura con diferentes concentraciones de primers para evaluar cuáles eran las mejores condiciones para obtener un amplicón único y con buena señal. Se observó en la curva de melting solamente la presencia de un pico. Adicionalmente se realizó una electroforesis para asegurar que el tamaño del amplicón coincidiera con lo analizado en el programa primer3 (127). Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 18.

| Gen          | Concentración de primers | Temperatura de anillamiento | Temperatura de disociación (T <sub>m</sub> ) |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|--|
| <i>FT</i>    | 0,2 μM                   | 62°C                        | 84°C   |
| <i>TM</i>    | 0,2 μM                   | 62°C                        | 86°C   |
| <i>PAI-1</i> | 0,2 μM                   | 55°C                        | 85°C   |
| <i>GAPDH</i> | 0,2 μM                   | 60°C                        | 86°C   |

Tabla 18. Condiciones estandarizadas de la PCR para cada gen

### 5.2.3.2 GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA (*GAPDH*)

Se realizó amplificación por tiempo real de un fragmento del gen *GAPDH* como housekeeping para normalizar los resultados de los otros genes para el análisis de cuantificación relativa en muestras de placenta. Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 240 pb el cual se observó un único pico en la curva melting (Figura 28) y se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio, lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *GAPDH* se presenta en la Tabla 20.

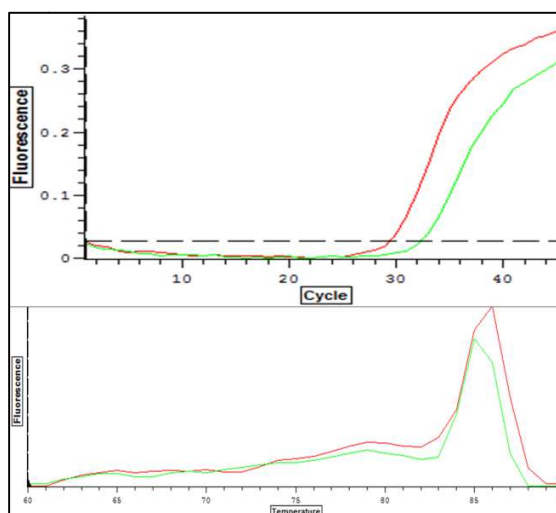


Figura 27. Amplificación de *GAPDH* por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting.

Amplificación de 2 muestras.

|                             | Temperatura      | tiempo      |
|-----------------------------|------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |
| <b>45 Ciclos</b>            |                  |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C             | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C             | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C             | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 82°C             | 5 segundos  |
| <b>Curva melting</b>        | 90°C             | 0 segundos  |
|                             | 60°C             | 1 minuto    |
|                             | 95°C             | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 1°C | 4 segundos  |
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |

Tabla 20. Protocolo de las condiciones de amplificación de *GAPDH*

### 5.2.3.3 FACTOR TISULAR

Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 149 pb el cual se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio y se observó un único pico en la curva melting (Figura 29), lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *FT* se presenta en la Tabla 21.

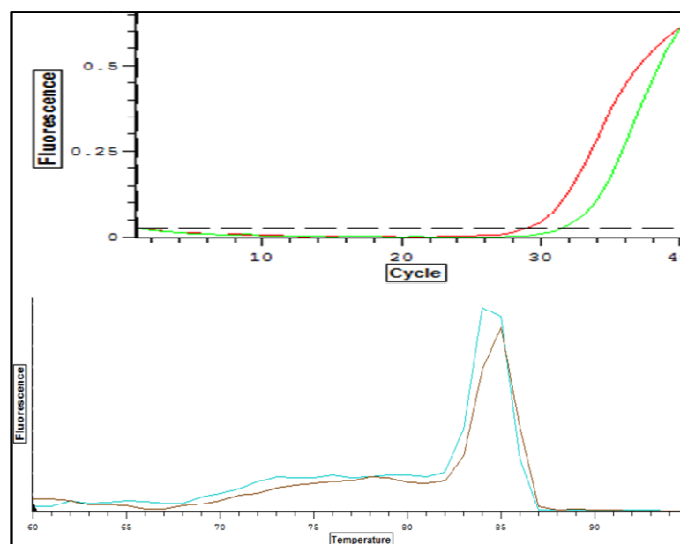


Figura 28. Amplificación de *FT* por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras.

|                             | Temperatura      | tiempo      |
|-----------------------------|------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |
| <b>45 Ciclos</b>            |                  |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C             | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C             | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C             | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 80°C             | 5 segundos  |
| <b>Curva melting</b>        | 90°C             | 0 segundos  |
|                             | 60°C             | 1 minuto    |
|                             | 95°C             | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 1°C | 4 segundos  |
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |

Tabla 21. Protocolo de las condiciones de amplificación de *FT*

#### 5.2.3.4 TROMBOMODULINA

Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 108 pb el cual se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio y se observó un único pico en la curva melting (Figura 30) y, lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *TM* se presenta en la Tabla 22.

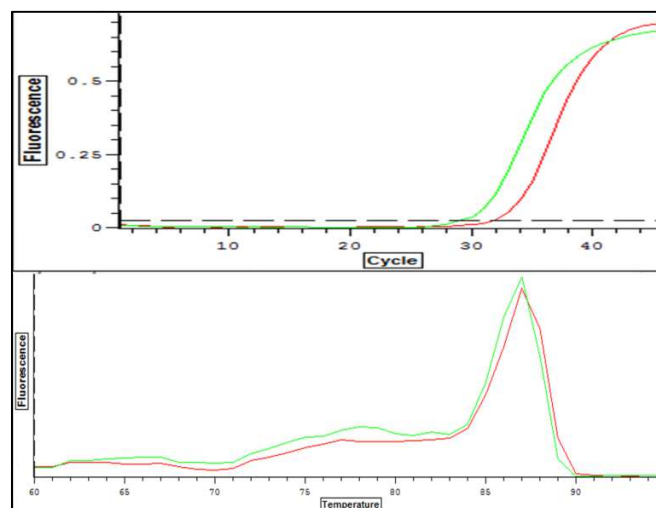


Figura 29. Amplificación de *TM* por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras.

|                             | Temperatura      | tiempo      |
|-----------------------------|------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |
| <b>45 Ciclos</b>            |                  |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C             | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C             | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C             | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 80°C             | 5 segundos  |
| <b>Curva melting</b>        | 90°C             | 0 segundos  |
|                             | 60°C             | 1 minuto    |
|                             | 95°C             | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 1°C | 4 segundos  |
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |

Tabla 22. Protocolo de las condiciones de amplificación de TM

### 5.2.3.5 INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO 1 (PAI-1)

Con las condiciones óptimas de la PCR en tiempo real se obtuvo un fragmento de 122 pb el cual se evidenció en un gel de Poliacrilamida al 12% teñido con Bromuro de etidio y se observó un único pico en la curva melting (Figura 31) y, lo cual coincide con lo esperado. El protocolo de amplificación para el gen *PAI-1* se presenta en la Tabla 23.

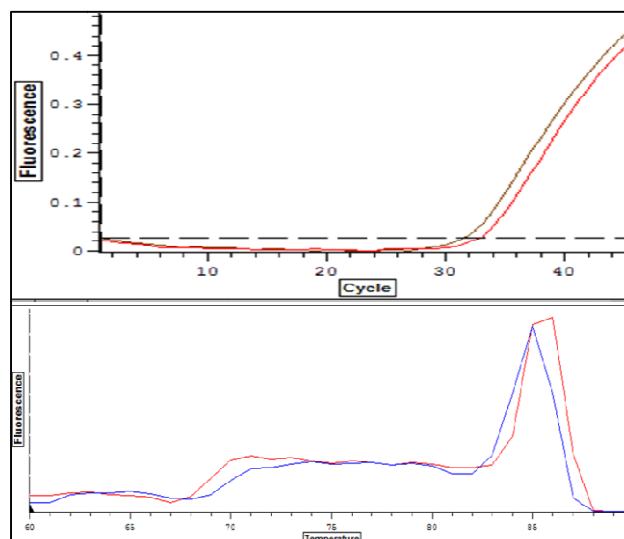


Figura 30. Amplificación de *PAI-1* por PCR en tiempo real. En la parte de arriba se encuentra la gráfica de amplificación y en la parte de abajo la gráfica de la curva melting. Amplificación de 2 muestras.



|                             | Temperatura      | tiempo      |
|-----------------------------|------------------|-------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |
| <b>45 Ciclos</b>            |                  |             |
| <b>Denaturación</b>         | 95°C             | 10 segundos |
| <b>Anillamiento</b>         | 62°C             | 10 segundos |
| <b>Elongación</b>           | 72°C             | 10 segundos |
| <b>Lectura</b>              | 80°C             | 5 segundos  |
| <b>Curva melting</b>        | 90°C             | 0 segundos  |
|                             | 60°C             | 1 minuto    |
|                             | 95°C             | 0 segundos  |
|                             | Lectura cada 1°C | 4 segundos  |
| <b>Denaturación inicial</b> | 95°C             | 2 minutos   |

Tabla 23. Protocolo de las condiciones de amplificación de *PAI-1*

### 5.2.3.6 RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE mRNA DE LAS MUESTRAS DE PLACENTA

Para el estudio de los genes *FT*, *TM* y *PAI-1* se realizaron análisis de expresión relativa con respecto al gen *GAPDH*. El análisis de cuantificación relativa se llevó a cabo según el método de Pfaffl(134), con corrección de la eficiencia para cada gen. La fórmula de Pfaffl es la siguiente:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

En los ensayos de expresión del *GAPDH*, *FT* y *PAI-1* se utilizaron como control positivo un cDNA extraído de una muestra de placenta el cual siempre amplificó y como controles negativos agua y DNA genómico extraído de placenta los cuales no amplificaron.

### 5.2.3.6.1 GAPDH

Se analizó si existía diferencia entre casos y controles para corroborar su utilidad como gen housekeeping. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles evaluando el ct ( $p=0,4649$ ) (Figura 32)

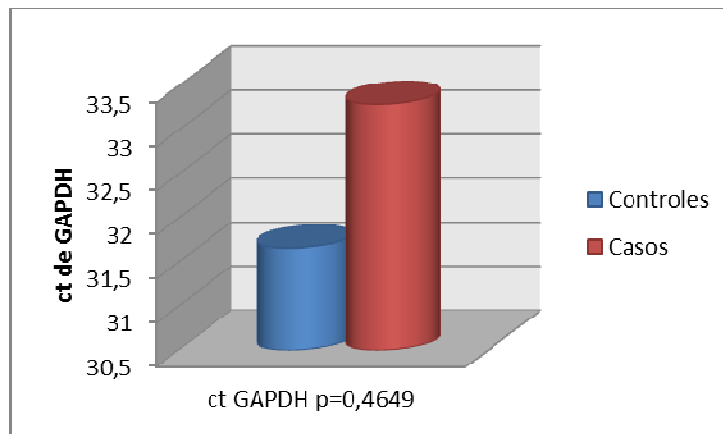


Figura 31. Comparación de ct de GAPDH en casos y controles

|                                 | $\Delta FT/GAPDH$ | $\Delta TM/GAPDH$ | $\Delta PAI-1/GAPDH$ |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| <b>Controles</b>                |                   |                   |                      |
| Mediana                         | 0,07              | 0,02              | 32,08                |
| Rango min-max                   | 0,01-0,5          | 0,01-0,23         | 5,8-244,57           |
| <b>Casos</b>                    |                   |                   |                      |
| Mediana                         | 35,10             | 0,30              | 8,44                 |
| Rango min-max                   | 12,27-106,31      | 0,13-0,52         | 3,24-3,62            |
| <b><i>p</i></b>                 | <b>0,0105</b>     | <b>0,014</b>      | 0,09                 |
| <b>Relación casos/controles</b> | 501,43            | 15,00             | 0,003*               |

Tabla 24. Resultados de la cuantificación relativa de *FT*, *TM* y *PAI-1*\*Relación controles/casos 3.8 veces

### 5.2.3.6.2 FACTOR TISULAR

En la tabla 24 y la figura 34 se muestran los resultados de la cuantificación relativa. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ( $p=0,0105$ ),

y se encontró aumentada la expresión de *FT* en los casos 501,43 con respecto a los controles.

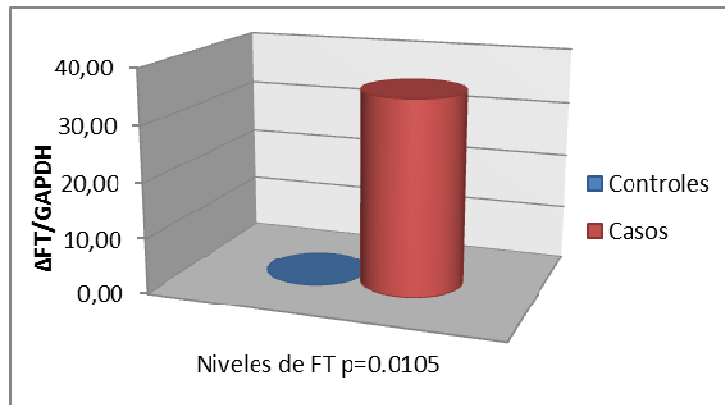


Figura 32. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de *FT*

#### 5.2.3.6.3 TROMBOMODULINA

En la tabla 24 y la figura 35 se muestran los resultados de la cuantificación relativa. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ( $p=0,014$ ), se encontró aumentada la expresión de *TM* en los casos 15 veces con respecto a los controles.

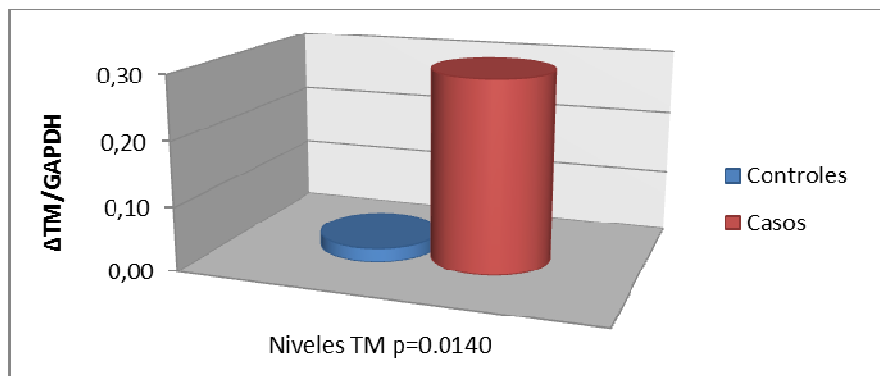


Figura 33. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de *TM*

#### 5.2.3.6.4 PAI-1

En la tabla 24 y la figura 36 se muestran los resultados de la cuantificación relativa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ( $p=0,09$ ).

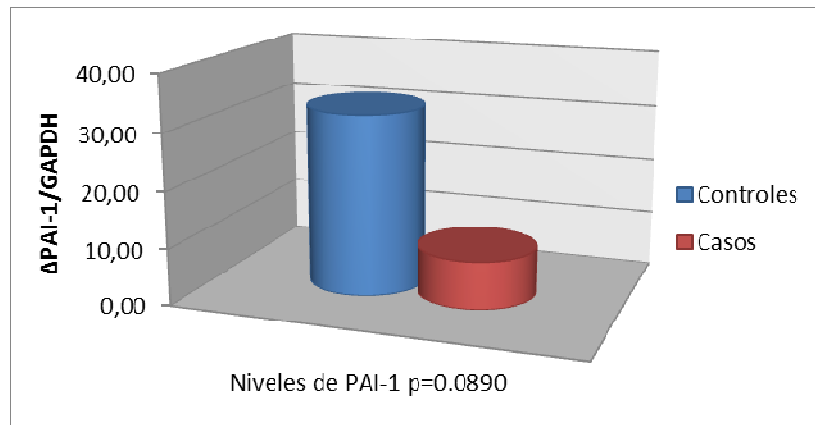


Figura 34. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de PAI-1

#### 5.2.3.6.5 RELACION *FT/TM*

Al igual que en RCIU, se evaluó el desequilibrio entre los factores procoagulantes y anticoagulantes podría estar implicado en el desarrollo de la PE, se realizó análisis de la relación *FT/TM* y se comparó entre casos y controles. La mediana de la relación *FT/TM* en casos es de 117 y en los controles 3,5 con una  $p=0,001$ , estando 33,42 veces aumentado en los casos en comparación con los controles.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se encontraron aumentados los niveles de mRNA de FT y TM en placentas de pacientes con PE, como también el aumento de la razón de mRNA de FT/TM en placentas de pacientes con PE y RCIU, con diferencias estadísticamente significativas.

El estudio de FT, TM y PAI-1 en placentas de mujeres gestantes con diagnóstico de RCIU o PE permite generar conocimiento sobre el compromiso de los mecanismos hemostáticos en la placenta en estas enfermedades. En este estudio se encontraron aumentados los niveles de FT en las placentas con PE mostrando diferencias estadísticamente significativas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en RCIU pero se observó un aumento de 2,72 y 1,71 veces en los casos con relación a los controles, sin normalizar y normalizando de FT, respectivamente. Estos últimos resultados indican que hay factores que influyen en la cuantificación. La cuantificación de los transcritos de RNAm por PCR en tiempo real se altera fácilmente con cualquier variación en la cantidad de material de partida entre las muestras, por ejemplo, la variación de muestra a muestra, la variación en la integridad del RNA, las diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción y la variación de la carga de muestras de cDNA. (136, 137). Por este motivo se recomienda normalizar con un gen housekeeping (138). Sin embargo, la correlación entre los valores sin normalizar y normalizados es positiva con un valor estadísticamente significativo.

Krikun et al., encontraron un aumento con diferencias estadísticamente significativas de FT a nivel de proteína con inmunohistoquímica en el endotelio decidual en placentas de pacientes con RCIU(139). Con respecto a PE este resultado concuerda con lo encontrado por Estelles et al. quienes midieron FT a nivel de mRNA y proteína en 6 placentas de mujeres con preeclampsia y 7 placentas controles normales y encontraron un aumento significativo de FT en placentas con preeclampsia(67). En el 2009 Teng et al. reportaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión con aumento de FT en placenta a nivel de mRNA en preeclampsia(87). Además también demostraron que los niveles de

plasma se pueden correlacionar con los encontrados en placenta en PE(102). Adicionalmente se ha encontrado un incremento de FT en placentas de gestaciones con PE y RCIU que presentaron anomalías en la velocimetría en el Doppler(103). Sin embargo, Kanfer et al. a nivel de proteína, y López-Ramírez a nivel de mRNA no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de FT en PE(99, 104). En la tabla 25 se muestran los estudios donde han realizado mediciones de FT en placenta en PE y RCIU.

| <b>PATOLOGIA</b>    | <b>CASOS</b> | <b>CONTROLES</b> | <b>p</b> | <b>MOLÉCULA ESTUDIADA</b> | <b>TECNICA</b>                    | <b>REFERENCIA</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| <b>Preeclampsia</b> | 6            | 7                | S        | mRNA                      | RT-PCR                            | (67)              |
| <b>Preeclampsia</b> | 20           | 20               | S        | mRNA                      | QRT-PCR                           | (87)              |
| <b>Preeclampsia</b> | 30           | 30               | S        | mRNA                      | QRT-PCR                           | (102)             |
| <b>Preeclampsia</b> | 14           | 14               | S        | mRNA                      | Hibridización in situ             | (103)             |
| <b>Preeclampsia</b> | 6            | 7                | S        | Proteína                  | Inmunohistoquímica                | (67)              |
| <b>Preeclampsia</b> | 17           | 17               | NS       | Proteína                  | Inmunohistoquímica                | (99)              |
| <b>Preeclampsia</b> | 12           | 26               | NS       | Proteína                  | ELISA                             | (104)             |
| <b>Preeclampsia</b> | 20           | 20               | S        | Proteína                  | ELISA                             | (87)              |
| <b>Preeclampsia</b> | 30           | 30               | S        | Proteína                  | Western blot e inmunohistoquímica | (102)             |
| <b>RCIU</b>         | 25           | 15               | S        | Proteína                  | Inmunohistoquímica                | (139)             |

Tabla 25. Estudios que han reportado medición de FT en placenta en PE y RCIU

NS: no significativo; S: significativo

Se han extraído altos niveles de esta proteína de extractos de tejido placentario y líquido amniótico, por eso se considera a la placenta como una fuente muy importante de FT(29). La hipótesis que se ha postulado acerca de las implicaciones del FT en la PE y el RCIU es que la reducción del flujo sanguíneo uteroplacentario, producido por una inadecuada proliferación e invasión trofoblástica, causa hipoxia en la decidua generando Factor de

Crecimiento Endotelial Vasal (VEGF) en la decidua perivascular(139), el exceso de VEGF induce la expresión de mRNA y proteína del FT (140) este aumento estimula la generación de trombina. La trombina agrava este proceso mediante una mayor expresión de FT y VEGF endotelial promoviendo trombosis uteroplacentaria e induciendo citoquinas inflamatorias, lo que finalmente llevaría a pérdida fetal, PE, RCIU y abrupcio de placenta(141). Se ha encontrado evidencia a favor de esta hipótesis. Chinni et al., encontraron una asociación entre los niveles de FT y VEGF en placentas de embarazos con PE(142). Adicionalmente, en los segmentos de los vasos sanguíneos uteroplacentarios de placentas de casos con bajo peso al nacer con evidencia de malperfusión uteroplacentaria materna hay un incremento de FT comparado con placentas de casos con bajo peso al nacer asociado con villitis crónica o controles normales(139). Adicionalmente, Krikun et al., demostraron que células endoteliales endometriales suplementadas con trombina mostraron un incremento de agregados endoteliales y cambios morfológicos en ensayos de evaluación de la angiogénesis; esto sugiere que la hipoxia, el VEGF y la trombina podrían actuar conjuntamente para inducir y mantener una angiogénesis aberrante causando daño endotelial, aumentando la expresión de proteasas e incrementando la permeabilidad vasal causando hemorragia y desenlace adverso del embarazo(139). Por otro lado, se ha demostrado que tanto el FT como la trombina regulan la expresión de sFlt1 en células trofoblásticas, el sFlt1 inhibe la angiogénesis local y la implantación trofoblástica, induciendo anomalías placentarias y complicaciones del embarazo (143, 144). Adicionalmente, se ha demostrado que en pacientes con PE hay un remodelamiento incompleto de las arterias espirales y se han encontrado anomalías en el Doppler(29). Basado en estos hallazgos, Burton et al., postuló que la isquemia y la hipoxia placentaria no eran constantes en la PE y que la lesión hipoxia-reperfusión en vez de la hipoxia estable crónica podría ser la primera causa del daño tisular(90). Bajo condiciones de hipoxia e hipoxia-reperfusión se incrementa la síntesis y liberación de Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en tejido placentario. Ya se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  aumenta la expresión de FT en células trofoblásticas y que se aumenta aún más en condiciones de hipoxia(87) (Ver figura 37). A pesar de los avances en la comprensión del papel del FT en el embarazo, se

ha logrado poco estudiando su importancia en las complicaciones vasculares gestacionales como preeclampsia, eclampsia, síndrome de HELLP, RCIU, abrutio de placenta y muerte fetal intrauterina. Considerando el papel del FT en el proceso hemostático, es muy importante investigar su implicación en el desarrollo de las complicaciones vasculares gestacionales que son frecuentemente asociadas con la formación de micro trombos en la circulación placentaria que pueda arrojar resultados clínicos relevantes(96). Como resultados paralelos a este trabajo, nuestro grupo logró encontrar diferencias estadísticamente significativas a nivel de proteína de FT en placentas con RCIU por técnica de ELISA. Los resultados discordantes entre mRNA y proteína se pueden deber a dos causas. Una es que ya se ha reportado anteriormente que el mRNA de FT se degrada rápidamente debido a que posee regiones ricas de AU en el extremo 3' las cuales se han demostrado que median la degradación rápida del RNA(145). La otra causa es que sufra modificaciones postranscripcionales que regulen la síntesis de la proteína.

En cuanto a la TM, se encontraron aumentados los niveles de mRNA 15 veces con diferencias estadísticamente significativas en las placentas de pacientes con PE comparándolos con los controles sanos; por el contrario en RCIU no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo los niveles aumentan 1,41 veces en los controles con relación a los casos. Cabe resaltar que este es el primer estudio a nivel mundial que mide la expresión a nivel de mRNA de TM en placenta en estas dos patologías y es el primer estudio que muestra un aumento estadísticamente significativo de TM en placentas con PE. En RCIU se han encontrado diferencias estadísticamente significativas con aumento de los niveles de TM en placenta por inmunohistoquímica (107) y estudios en PE no encontraron diferencias estadísticamente significativas en placentas con PE por técnicas de inmunohistoquímicas, ELISA y actividad enzimática (16, 99, 104) sin embargo Bosco et al., reportaron un aumento de TM en los miofibroblastos vasculares y estromales en comparación con el endotelio en placentas provenientes de individuos con PE(16). En la tabla 26 se muestran los estudios que se han publicado sobre los niveles de proteína de TM en placenta en PE y RCIU.



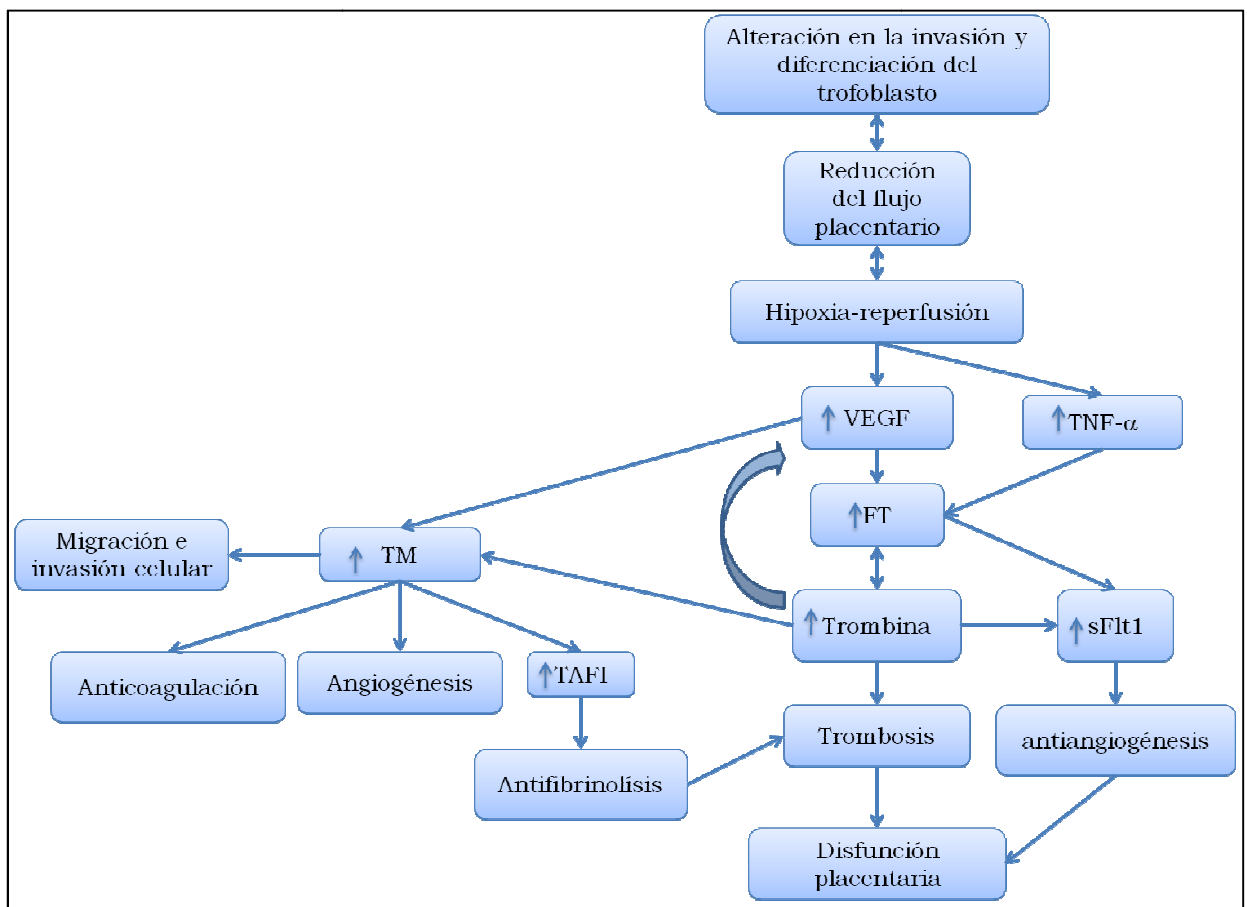


Figura 35. Hipótesis de del mecanismo fisiopatológico en la disfunción placentaria (Autoría propia)

| PATOLOGIA    | CASOS | CONTROLES | <i>p</i> | TECNICA              | REFERENCIA |
|--------------|-------|-----------|----------|----------------------|------------|
| Preeclampsia | 17    | 17        | NS       | Actividad enzimática | (99)       |
| Preeclampsia | 12    | 26        | NS       | ELISA                | (104)      |
| Preeclampsia | 12    | 11        | NS       | Inmunohistoquímica   | (16)       |
| <b>RCIU</b>  | 12    | 12        | S        | Inmunohistoquímica   | (107)      |

Tabla 26. Estudios que han reportado medición de TM a nivel de proteína en placenta en PE y RCIU

NS: no significativo; S: significativo

La vía anticoagulante más importante en la placenta es mediada por la TM(16). Los resultados publicados por Bosco et al., sugieren que la TM en PE juega un papel importante en la preservación de la función de los miofibroblastos estromales en la contractilidad vellosa y la modulación de los espacios intervillosos afectando tanto la circulación fetal como la materna(146, 147). Estos resultados plantean que en PE, la disminución del flujo sanguíneo puede ser debido al deterioro funcional y estructural del endotelio de los vasos vellosos, mientras que el aumento en la expresión de TM de los miofibroblastos estromales y perivascuales rodeando la vellosidad podría tener un efecto compensatorio de los cambios protrombóticos y modular el flujo sanguíneo fetal en el árbol veloso(16). Cabe resaltar la actividad antifibrinolítica que tiene la TM. El complejo TM-trombina también activa el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), la cual es una carboxipeptidasa que al activarse remueve residuos del extremos carboxiterminal de la fibrina; estos residuos son importantes para el secuestro de enzimas fibrinolíticas en la malla de fibrina y su eliminación hace el coagulo más resistente a la lisis(148). Adicionalmente se ha demostrado que la trombomodulina tiene una función angiogénica estimulando la síntesis de DNA y estimula la motilidad quimotáctica y la formación del tubo capilar, en cultivos de células endoteliales de venas umbilicales, también aumenta la expresión de metaloproteinasas de matriz y activadores del plasminógeno, los cuales median el proceso de proteólisis extracelular dirigiendo a la invasión y migración de las células endoteliales durante la angiogénesis(149). Adicionalmente se ha descrito que la trombina aumenta los niveles de TM favoreciendo la actividad anticoagulante(145), pero se debe tener en cuenta que la TM tiene adicionalmente funciones antifibrinolíticas. La hipótesis que se plantea entonces, es que la TM se aumenta por un efecto compensatorio tratando de balancear el proceso hemostático y favoreciendo la angiogénesis y la invasión celular; pero este aumento, por otro lado disminuye la fibrinólisis activando TAFI y conlleva a una acumulación de trombos de fibrina y por consiguiente a una isquemia generando daños en la función placentaria. Lo que se plantea con los resultados de este estudio es que en PE, la TM aumenta por un efecto compensatorio para corregir el desequilibrio hemostático, sin embargo el daño

placentario genera una respuesta sistémica; por el contrario, en RCIU, la TM no se alcanza a aumentar significativamente y el daño placentario se localiza únicamente en la placenta y no genera una respuesta inflamatoria sistémica. Sin embargo cuando ocurre daño sistémico y local se presenta PE con RCIU (Figura 38).

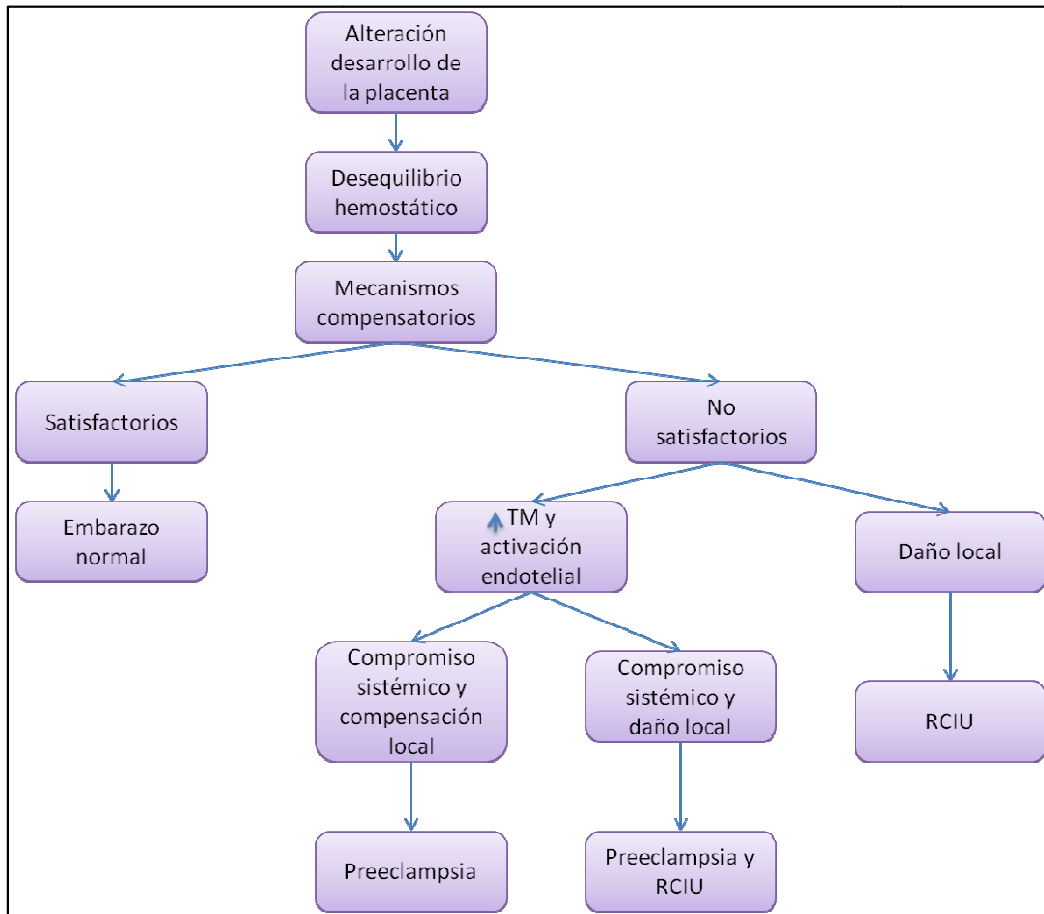


Figura 36. Hipótesis de la fisiopatología de la PE y la RCIU (Autoría propia).

Con respecto a PAI-1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en PE ni en RCIU. Es el primer estudio a nivel mundial donde se estudia la expresión de mRNA de PAI-1 en RCIU, sin embargo a nivel de proteína no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas(109). En PE, a nivel de mRNA, hay dos estudios que reportan un aumento de PAI-1 con deferencias estadísticamente significativas (67, 87) y a nivel de proteína los resultados son contradictorios(67, 87, 99, 104, 109, 150). Cabe

considerar que el resultado encontrado para esta variable podría deberse al tamaño de la muestra. En la tabla 27 se muestran los estudios realizados de PAI-1 en placenta en PE y RCIU.

| PATOLOGÍA         | CASOS | CONTROLES | $p$                | MOLECULA | TECNICA            | REFERENCIA |
|-------------------|-------|-----------|--------------------|----------|--------------------|------------|
| Preeclampsia      | 6     | 7         | S                  | mRNA     | QRT-PCR            | (67)       |
| Preeclampsia      | 20    | 20        | S                  | mRNA     | QRT-PCR            | (87)       |
| Preeclampsia      | 17    | 17        | NS                 | Proteína | Inmunohistoquímica | (99)       |
| Preeclampsia      | 12    | 26        | S                  | Proteína | ELISA              | (104)      |
| Preeclampsia      | 20    | 20        | S                  | Proteína | ELISA              | (87)       |
| Preeclampsia      |       |           | S                  | Proteína | ELISA              | (150)      |
| Preeclampsia      | 6     | 7         | S                  | Proteína | Inmunohistoquímica | (67)       |
| Preeclampsia/RCIU | 8     | 10        | S                  | Proteína | ELISA              | (109)      |
| Preeclampsia/RCIU | 8     | 10        | S                  | Proteína | Inmunohistoquímica | (109)      |
| Preeclampsia/RCIU | 8     | 10        | Aumentado<br>en PE | Proteína | Western            | (109)      |
| RCIU              | 8     | 10        | NS                 | Proteína | ELISA              | (109)      |
| RCIU              | 8     | 10        | NS                 | Proteína | Inmunohistoquímica | (109)      |

Tabla 27. Estudios que han reportado medición de PAI-1 en placenta en PE y RCIU

NS: no significativo; S: significativo

Por las funciones que se le atribuyen al PAI-1, se piensa que podría estar involucrado en la fisiopatología de complicaciones del embarazo que se originan en la placenta como la PE y el RCIU. El significado biológico de las proteasa y sus inhibidores en la adhesión e invasión trofoblástica *in vivo* no ha sido del todo elucidada. Las proteínas proteolíticas, al parecer, se requieren para la implantación satisfactoria del embrión y el desarrollo placentario (65). Se ha demostrado que las células endometriales de la decidua producen altos niveles de PAI-1(151). Adicionalmente, la síntesis de PAI-1 se aumenta cuando se promueve la diferenciación en la decidua. Shatz et al., postularon que el PAI-1 derivado de las células de la decidua podría actuar como una barrera a la invasión trofoblástica, previniendo la hemorragia durante la invasión vascular(151). En embarazos molares se ha observado una invasión trofoblástica incontrolada y PAI-1 esta disminuido, lo que sugiere que una disminución de PAI-1 podría estar asociado con una invasión placentaria exacerbada(65).

Algunos autores han postulado que es importante analizar la relación entre factores procoagulantes y anticoagulantes(152). A partir de 1993, se encuentran publicaciones que evidencian relación entre los mecanismos regulatorios de la expresión de FT y TM en diferentes modelos *in vitro*. En 1993, Bartha et al, evidenció que la trombina regula la expresión de FT y TM, así como su actividad en células endoteliales de vena safena humana. Adicionalmente, indican que al parecer los mecanismos involucrados son distintos. En el caso de la TM, la trombina aumenta la expresión de mRNA pero no cambia la expresión en la superficie celular, sin embargo se encontró aumento de la TM secretada al medio así como de las vesículas con TM en la superficie luminal de la célula; mientras que para FT, la trombina aumentó su expresión a nivel de mRNA así como la expresión de la proteína en la superficie de la membrana celular(145). En 1999, Zhu et al, reportaron que la actividad procoagulante de células de leucemia humana dependía de la cantidad de proteína de FT, pero principalmente de la razón de la cantidad de antígenos de FT y TM en la membrana celular (FT/TM)(153). Estos hallazgos, los cuales indican la relación entre la expresión de FT y TM así como su papel en la actividad procoagulante celular, nos incentivaron a analizar la razón FT/TM a nivel de mRNA y de proteína. La evidencia anotada más los resultados encontrados en nuestro estudio, sugieren que la razón FT/TM podrían servir como marcador, posiblemente mejor que los resultados individuales, de compromiso de los principales mecanismos procoagulantes y anticoagulantes a nivel local en la placenta de gestaciones que cursaron con RCIU idiopático

En este estudio se midieron los niveles de mRNA de *hPL* en plasma de embarazos con RCIU no se encontraron diferencias significativas. Esto se realizó porque debido a que complicaciones del embarazo como PE y RCIU son de origen placentario, la medición de mRNA de *hPL* en el plasma de gestantes podría servir como un marcador de la función placentaria y poder monitorear los cambios en el desarrollo del embarazo en gestantes. Una de las hormonas más importantes en el embarazo es el hPL. Esta es una proteína de síntesis exclusiva de la placenta producida por el trofoblasto. Modifica el metabolismo de la madre durante el embarazo para facilitar el suministro de energía al feto (1); por este

motivo ha sido candidata para monitorear el estado placentario. Varios estudios se han llevado a cabo para observar el papel del hPL en PE y RCIU. Se ha demostrado que en RCIU hay baja producción placentaria de esta proteína (154, 155) pero en PE los resultados son contradictorios (154, 156) y en plasma se ha encontrado un aumento en el segundo y tercer trimestre de embarazos que desarrollan PE (157) y se ha demostrado una correlación entre los niveles de hPL y el crecimiento fetal(158). Lo et al (1997), lograron aislar DNA libre circulante en el plasma de mujeres embarazadas(114). Estos estudios abrieron una nueva posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal no invasivo donde ni el feto ni la madre corren peligro alguno(159). Debido a que muchas veces no es posible determinar el origen del DNA encontrado en el plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con el DNA materno, se planteó el interrogante sobre si se podría aislar RNA de origen feto-placentario en el plasma materno y así determinar la expresión de genes específicos de la placenta. Poon *et al.*, fueron los primeros en publicar la presencia de RNA fetal en el plasma de gestantes(160). En pacientes con preeclampsia se han encontrado que los niveles de mRNA del gen *hPL* son significativamente menores en gestantes tanto en el primer trimestre (161) como en el segundo y tercer trimestre (162) y en placenta previa percreta también se reportaron niveles bajos en comparación con los controles(22), estos estudios demuestran que es posible monitorear el estado placentario en el plasma materno. Nuestro estudio es el primero en evaluar los niveles de mRNA de hPL en plasma de gestantes con RCIU; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas posiblemente debido a que no encontramos diferencias en el peso de la placenta y ya se ha reportado que los niveles de hPL en suero se correlacionan con el tamaño de la placenta(163).

El desarrollo de marcadores de mRNA placentarios que pueden ser detectados en plasma representa un avance en la utilización de moléculas que podrían utilizarse en todas las mujeres embarazadas sin tener en cuenta el sexo fetal, factor limitante al utilizar DNA. Se ha demostrado que es posible detectar mRNA en plasma de origen fetoplacentario en gestantes con 4 semanas de gestación y que desaparece después del parto(164). Por otro lado Zong et. al., postula que la evaluación cuantitativa de DNA fetal en plasma materno

junto con la medición de mRNA de diferentes transcritos podría contribuir a mejorar la identificación de las mujeres en riesgo de desarrollar preeclampsia(165), lo que se podría proponer también para RCIU.

## 7. CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de mRNA de *FT* y *TM* en placentas con PE, pero no en placentas con RCIU. Con respecto a los niveles de mRNA de PAI-1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en placentas con PE ni RCIU. Cabe resaltar que este es el primer estudio a nivel mundial que mide los niveles de mRNA de *FT* en placentas con RCIU y de *TM* en PE y RCIU y adicionalmente es el primer estudio que encontró diferencias de la expresión de *TM* en PE. Se confirmó la hipótesis planteada con respecto a la expresión de *FT* y *TM* en PE pero no en RCIU; del mismo modo no se comprobó la hipótesis de los niveles de PAI-1 en RCIU y PE. Adicionalmente, se extrajo mRNA libre de origen fetoplacentario en plasma materno de gestantes que cursaron con RCIU y gestantes normales, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de este trabajo están de acuerdo con la teoría que la fisiopatología de estas dos complicaciones del embarazo, PE y RCIU, tiene un componente hemostático importante, pero que en PE, de algún modo, la respuesta por tratar de compensar los daños en la placenta, es mucho más severa y se convierte en sistémica. Sin embargo al observar la relación *FT/TM* entre casos y controles sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en RCIU, lo que sugiere que en estas patologías se pierde el equilibrio entre el componente procoagulante y el anticoagulante y que este desbalance es lo que principalmente podría producir el daño en la placenta.

Por otro lado, a pesar que no se encontraron diferencias en la expresión de *hPL* en plasma materno entre casos con RCIU y controles, la identificación de ácidos nucleicos libres circulantes en plasma materno provenientes de la unidad fetoplacentaria es un hallazgo importante que abre las puertas para seguir estudiando el origen y la utilidad de estas moléculas en las complicaciones del embarazo.



## 8. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Los resultados de este trabajo genera entre otros un cuestionamiento importante: que tan temprano en el embarazo ocurre el desequilibrio de los procesos hemostáticos?. Para resolver esta pregunta, debido a que se logró extraer ácidos nucleicos en plasma de origen fetoplacentario, se podría plantear un estudio midiendo los niveles de mRNA de *FT* y *TM* en plasma de una cohorte de mujeres gestantes en varias edades del embarazo y comparar los niveles de estas moléculas entre las pacientes que desarrollaron PE o RCIU con gestantes normales, y observar que tan temprano ocurren estos cambios

Este trabajo hace parte del proyecto de la tesis doctoral de Reggie García Robles el cual se titula “Mecanismos fisiopatológicos en Restricción de Crecimiento Intrauterino”. El desarrollo de este proyecto abrió las puertas para crear alianzas para realizar proyectos colaborativos entre los departamentos de Patología, Ginecoobstetricia e Instituto de Genética Humana (IGH) de la Pontificia Universidad Javeriana. Por otro lado se establecieron convenios para desarrollar proyectos colaborativos con la Universidad de Los Andes (Santiago de Chile, Chile). Adicionalmente, se establecerá una nueva línea de investigación dentro del grupo del IGH que se denomina “Salud materno-fetal”. El objetivo de esta nueva línea de investigación es estudiar los mecanismos fisiopatológicos de las complicaciones del embarazo para poder generar nuevo conocimiento acerca de su etiología y crear nuevas herramientas para la predicción, pronóstico y tratamiento de estas patologías.

La debilidad que tiene este proyecto es principalmente el tamaño de la muestra. A pesar de los múltiples esfuerzos que se realizaron para la consecución de las pacientes, desafortunadamente se logró recolectar un tamaño de muestra menor a lo esperado. Por ese motivo se sugiere confirmar los resultados obtenidos en este trabajo, con un tamaño de muestra mayor, sin embargo cabe resaltar las diferencias estadísticamente que encontramos con este tamaño de muestra.

La fortaleza que tiene este trabajo, es que es el primero en estudiar los niveles de mRNA de *FT* en RCIU y el primero en medir mRNA de *TM* en PE y RCIU en placentas y adicionalmente es el primero en describir diferencias en la expresión de *TM* en PE. Por otro lado, en Colombia es el primer grupo que ha logrado aislar mRNA libre de origen fetoplacentario en plasma materno.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap III LC, Wenstrom KD. *Obstetricia de Williams*. México, DF; McGraw-Hill Interamericana, 2006, 1439 p ilus, tab, graf Translated from the twenty-second english edition of Williams obstetrics. 2006.
2. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):409-14.
3. Aharon A, Brenner B, Katz T, Miyagi Y, Lanir N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in trophoblast cells: implications for placental hemostasis. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-*. 2004;92:776-86.
4. Chappell S, Morgan L. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clinical Science*. 2006;110:443-58.
5. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, et al. Potential markers of preeclampsia—a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009;7(1):70.
6. Cnossen J, Van Der Post J, Mol B, Khan K, Meads C, Ter Riet G. Prediction of pre-eclampsia: a protocol for systematic reviews of test accuracy. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2006;6(1):29.
7. Duley L. Maternal mortality associated with hypertensive disorders of pregnancy in Africa, Asia, Latin America and the Caribbean. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2005;99(7):547-53.
8. Khan K, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu A, Van Look P. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *The Lancet*. 2006;367(9516):1066-74.
9. Lopez-Jaramillo P. *Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas*. - 4ed. 5<sup>th</sup> ed. Bogotá: Horizonte editores; 2001.
10. Muñoz Molina L, Hernández Barbosa R. Retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) y sus alteraciones bioquímicas. *NOVA*. 2005;3(3):88-94.
11. Alexander GR, Kogan M, Bader D, Carlo W, Allen M, Mor J. US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995–1997 rates for whites, Hispanics, and blacks. *Pediatrics*. 2003;111(1):e61.

12. Pilar VGMD, C BF, Guillermo ERL, Patricia. HAM. Prevalencia de bajo peso al nacer y factores maternos asociados: Unidad de Atención y Protección Materno Infantil de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín, Colombia. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2006;57(4):264-70.
13. Kramer MS. The Epidemiology of Adverse Pregnancy Outcomes: An Overview. *J Nutr.* 2003;133(5, Suppl 2):1592S-6s.
14. Kupfermanc M. Thrombophilia and preeclampsia: the evidence so far. *Clinical obstetrics and gynecology.* 2005;48(2):406.
15. Roberts D, Post M. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Journal of clinical pathology.* 2008;61(12):1254.
16. Bosco C, Parra M, Barja P, Rodrigo R, Fernández V, Suarez M, et al. Increased immunohistochemical expression of thrombomodulin at placental perivascular myofibroblast in severe preeclampsia (PE). *Histology and histopathology.* 2005;20(4):1045-56.
17. Erlich J, Parry GCN, Fearn C, Muller M, Carmeliet P, Luther T, et al. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(14):8138.
18. Bajo Arenas J, Melchor M. *Fundamentos de Obstetricia (SEGO)*. Madrid: Gráficas Marte SL; 2007.
19. Langman J. *Embriología médica: Editorial Médica Panamericana; 1981.*
20. Lala P, Chakraborty C. Factors Regulating Trophoblast Migration and Invasiveness: Possible Derangements Contributing to Pre-eclampsia and Fetal Injury<sup>1</sup>. *Placenta.* 2003;24(6):575-87.
21. Graham C, Postovit L, Park H, Canning M, Fitzpatrick T. Adriana and Luisa Castellucci award lecture 1999: role of oxygen in the regulation of trophoblast gene expression and invasion. *Placenta.* 2000;21(5-6):443-50.

22. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshimura S, et al. Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem*. 2005;51(5):923-5.
23. Saxena BN, Emerson Jr K, Selenkow HA. Serum placental lactogen (HPL) levels as an index of placental function. *New England Journal of Medicine*. 1969;281(5):225-31.
24. SINGER W, DESJARDINS P, FRIESEN HG. Human placental lactogen: An index of placental function. *Obstetrics & Gynecology*. 1970;36(2):222.
25. Spona J, Janisch H. Serum placental lactogen (HPL) as index of placental function. *Acta endocrinologica*. 1971;68(2):401.
26. Almagro Vázquez D. La hemostasia en el embarazo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2000;16(2):90-8.
27. Raziel A, Friedler S, Schachter M, RON-EL R, KORNBERG Y, SELA B. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2001;45(2):65-71.
28. James AH. Venous thromboembolism in pregnancy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(3):326-31.
29. Lanir N, Aharon A, Brenner B, editors. *Procoagulant and anticoagulant mechanisms in human placenta*. 2003: New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, c1974-.
30. Crocker I, Barratt S, Kaur M, Baker P. The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta*. 2001;22(10):822-30.
31. Lanir N, Aharon A, Brenner B. Haemostatic mechanisms in human placenta. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2003;16(2):183-95.
32. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JCP, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochemistry and cell biology*. 1998;110(5):495-508.

33. Fazel A, Vincenot A, Malassine A, Soncin F, Gaussem P, Alsat E, et al. Increase in expression and activity of thrombomodulin in term human syncytiotrophoblast microvilli. *Placenta*. 1998;19(4):261-8.
34. Krikun G, Lockwood C, Wu XX, Zhou XD, Guller S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta*. 1994;15(6):601-12.
35. Rand JH, Wu XX, Guller S, Scher J, Andree HAM, Lockwood CJ. Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1997;177(4):918-23.
36. Ramsay B, Sooranna SR, Johnson MR. Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast throughout pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 1996;87(2):249.
37. Lyall F, Jablonka-Shariff A, Johnson R, Olson L, Nelson DM. Gene expression of nitric oxide synthase in cultured human term placental trophoblast during in vitro differentiation. *Placenta*. 1998;19(4):253-60.
38. Sheppard BL, Bonnar J, editors. *Uteroplacental hemostasis in intrauterine fetal growth retardation*. 1999: GEORG THIEME VERLAG.
39. Weiler H IB. *Gene targeting of coagulation factors and embryogenesis*. *Women Issues in Thrombosis and Haemostasis*: Martin Dunitz; 2002.
40. Scarpati EM, Wen D, Broze Jr GJ, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, et al. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*. 1987;26(17):5234-8.
41. Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y, Carson SD. Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somatic cell and molecular genetics*. 1988;14(4):407-10.
42. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry*. 1989;28(4):1755-62.

43. Carson SD, Ramsey CA. Tissue factor (coagulation factor III) is present in placental microvilli and cofractionates with microvilli membrane proteins. *Placenta*. 1985;6(1):5-12.
44. Dalaker K, Haug E, Prydz H. Mouse trophoblast cells are constitutive producers of thromboplastin (factor III) in vitro. *Thrombosis and haemostasis*. 1985;54(2):438.
45. Reverdiau P, Jarousseau A, Thibault G, Khalfoun B, Watier H, Lebranchu Y, et al. Tissue factor activity of syncytiotrophoblast plasma membranes and tumoral trophoblast cells in culture. *Thrombosis and haemostasis*. 1995;73(1):49-54.
46. Faulk W, Labarrere C, Carson S. Tissue factor: identification and characterization of cell types in human placentae. *Blood*. 1990;76(1):86.
47. Lakasing L, Campa JS, Poston R, Khamashta MA, Poston L. Normal expression of tissue factor, thrombomodulin, and annexin V in placentas from women with antiphospholipid syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;181(1):180-9.
48. Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S, Andrassy M, Chen B, Stern DM, et al. Tissue factor-a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*. 2001;86(1):334-45.
49. Parry GCN, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(11):1547-54.
50. Beller FK, Ebert C. The coagulation and fibrinolytic enzyme system in pregnancy and in the puerperium. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 1982;13(3):177-97.
51. Girardi G. Role of tissue factor in feto-maternal development: a xiphos. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(2):250-6.
52. Goodsell D. Tissue Factor. PDB Protein Data Base2006 [cited 2011 August 8th]; Available from: <http://www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=75>.
53. Wen D, Dittman WA, Ye RD, Deaven LL, Majerus PW, Sadler JE. Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*. 1987;26(14):4350-7.

54. Maglott D, Feldblyum T, Durkin A, Nierman W. Radiation hybrid mapping of SNAP, PCSK2, and THBD (human Chromosome 20p). *Mammalian Genome*. 1996;7(5):400-1.
55. Jackman RW, Beeler DL, Fritze L, Soff G, Rosenberg RD. Human thrombomodulin gene is intron depleted: nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(18):6425-9.
56. **Wu H-I. Technical transfer of National Cheng Kung University biotechnology R&D result - Research and development of angiogenic proteins.** National Cheng Kung University 2007 [cited 2011 August 8<sup>th</sup>]; Available from: <http://conf.ncku.edu.tw/research/articles/e/20070921/4.html>.
57. Bajaj M, Kuppuswamy M. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thrombosis and haemostasis*. 1999;82(3):1047-52.
58. Fernández GC, Te Loo MWM, Velden TJA, Heuvel LPW, Palermo MS, Monnens LLA. Decrease of thrombomodulin contributes to the procoagulant state of endothelium in hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2003;18(10):1066-8.
59. Isermann B, Sood R, Pawlinski R, Zogg M, Kalloway S, Degen JL, et al. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med*. 2003;9(3):331-7.
60. Mehta R, Shapiro AD. Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. *Haemophilia*. 2008;14(6):1255-60.
61. Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, et al. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 1986;78(6):1673-80.
62. Loskutoff DJ, Linders M, Keijer J, Veerman H, van Heerikhuizen H, Pannekoek H. Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemist*. 1987;26(13):3763-8.



63. Schwartz C, Stanislovitis P, Phelan M, Klinger K, Taylor H, Stevenson R. Deletion mapping of plasminogen activator inhibitor, type I (PLANH1) and beta-glucuronidase (GUSB) in 7q21----q22. *Cytogenetics and cell genetics*. 1991;56(3-4):152.
64. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-Activator Inhibitor Type 1 and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(24):1792-801.
65. Floridon C, Nielsen O, Hølund B, Sweep F, Sunde L, Thomsen SG, et al. Does Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Control Trophoblast Invasion? A Study of Fetal and Maternal Tissue in Intrauterine, Tubal and Molar Pregnancies. *Placenta*. 2000;21(8):754-62.
66. Macfelda K, Weiss TW, Kaun C, Breuss JM, Zorn G, Oberndorfer U, et al. Plasminogen Activator Inhibitor 1 Expression is Regulated by the Inflammatory Mediators Interleukin-1 [alpha], Tumor Necrosis Factor-[alpha], Transforming Growth Factor-[beta] and Oncostatin M in Human Cardiac Myocytes\* 1. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(12):1681-91.
67. Estelles A, Gilabert J, Grancha S, Yamamoto K, Thinnest T, Espana F, et al. Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thrombosis and haemostasis*. 1998;79(3):500-8.
68. Astedt B, Hägerstrand I, Lecander I. Cellular localisation in placenta of placental type plasminogen activator inhibitor. *Thrombosis and haemostasis*. 1986;56(1):63.
69. Kruithof E, Tran-Thang C, Gudinchet A, Hauert J, Nicoloso G, Genton C, et al. Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 1987;69(2):460.
70. Sanín-Blair JE, Gómez-Díaz J, Ramírez J, Mejía CA, Medina Ó, Vélez J. DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DEL FETO CON RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO (RCIU) Y DEL FETO PEQUEÑO PARA LA EDAD GESTACIONAL (PEG). CONSENSO COLOMBIANO. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2009;60(3):247-61.
71. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol*. 2005;185(2):253-63.

72. PHILIP A. The evolution of neonatology. *Pediatric research*. 2005;58(4):799.
73. RJ C, RP S-T, CM T, TM dB, HM M, EA. S. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr*. 2001;85(1):49-58.
74. Nien JK, González R, Viviani P, Gómez R. Restricción del Crecimiento Intrauterino. *Boletín Perinatal*. 2002;2:23-38.
75. McWhinney IR. *A textbook of family medicine: Oxford University Press, USA; 1997.*
76. Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, et al. Intrauterine restriction (IUGR). *Journal Of Perinatal Medicine*. 2008;36(4):277-81.
77. Cuartas Calle A. Retardo del crecimiento intrauterino. *Iatreia*. 1995;8(1):pág. 18-25.
78. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(3):614-9.
79. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(4):962-8.
80. Li Y, Behringer RR. Esx1 is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat Genet*. 1998;20(3):309-11.
81. Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 2002;417(6892):945-8.
82. Takahashi K, Kobayashi T, Kanayama N. p57Kip2 regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Molecular human reproduction*. 2000;6(11):1019.
83. Cetin I, Foidart JM, Miozzo M, Raun T, Jansson T, Tsatsaris V, et al. Fetal growth restriction: a workshop report\* 1. *Placenta*. 2004;25(8-9):753-7.
84. Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta*. 2009;30:77-82.

85. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in P. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000;183(1):S1-S22.
86. Von Dadelszen P, Magee L, Roberts J. Subclassification of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2003;22(2):143-8.
87. Teng YC, Lin QD, Lin JH, Ding CW, Zuo Y. Coagulation and fibrinolysis related cytokine imbalance in preeclampsia: the role of placental trophoblasts. *Journal of perinatal medicine*. 2009;37(4):343-8.
88. George EM, Granger JP. Recent insights into the pathophysiology of preeclampsia. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*. 2010;5(5):557--66.
89. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvascular research*. 2008;75(1):1-8.
90. Bar J, Mashiah R, Cohen-Sacher B, Hod M, Orvieto R, Ben-Rafael Z, et al. Effect of thrombophilia on uterine and fetal circulation in pregnant women with a history of pregnancy complications. *Thrombosis research*. 2001;101(4):235-41.
91. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. *Physiology*. 2009;24(3):147-58.
92. SEVERA CEENLAP. Conducta expectante en la preeclampsia severa. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2009;69(1).
93. Ruano R, Fontes RS, Zugaib M. Prevention of preeclampsia with low-dose aspirin: a systematic review and meta-analysis of the main randomized controlled trials. *Clinics*. 2005;60(5):407-14.
94. VANWIJK MJ, BOER K, BERCKMANS RJ, MEIJERS J, VAN DER POST JAM, STURK A, et al. Enhanced coagulation activation in preeclampsia: the role of APC resistance, microparticles and other plasma constituents. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;88(3):415-20.
95. Weiner C, Brandt J. Plasma antithrombin III activity: an aid in the diagnosis of preeclampsia-eclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1982;142(3):275.

96. Dusse LMSA, das Gracas Carvalho M, Cooper AJ, Lwaleed BA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor: A potential role in pregnancy and obstetric vascular complications? *Clinica chimica acta*. 2006;372(1-2):43-6.
97. Dusse LM, Rios DRA, Pinheiro MB, Cooper AJ, Lwaleed BA. Pre-eclampsia: Relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(1-2):17-21.
98. Merviel P, Carbillon L, Challier JC, Rabreau M, Beaufile M, Uzan S. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004;115(2):134-47.
99. Kanfer A, Bruch JF, Nguyen G, Cl JHE, Delarue F, Flahault A, et al. Increased placental antifibrinolytic potential and fibrin deposits in pregnancy-induced hypertension and preeclampsia. *Laboratory investigation*. 1996;74(1):253-8.
100. Bellart J, Gilabert R, Anglès A, Piera V, Miralles RM, Monasterio J, et al. Tissue factor levels and high ratio of fibrinopeptide A: D dimer as a measure of endothelial procoagulant disorder in pre eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1999;106(6):594-7.
101. Chen G, Wilson R, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH. Tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clinical & Experimental Immunology*. 1996;104(1):154-9.
102. Teng Y, Jiang R, Lin Q, Ding C, Ye Z. The relationship between plasma and placental tissue factor, and tissue factor pathway inhibitors in severe pre-eclampsia patients. *Thrombosis Research*. 2010;126(1):e41-e5.
103. Di Paolo S, Volpe P, Grandaliano G, Stallone G, Schena A, Greco P, et al. Increased placental expression of tissue factor is associated with abnormal uterine and umbilical Doppler waveforms in severe preeclampsia with fetal growth restriction. *Journal of nephrology*. 2003;16(5):650.
104. López-Ramírez Y, Carvajal Z, Arocha-Piñango C. Parámetros hemostáticos en placenta de pacientes con embarazo normal y con preeclampsia severa. *Invest Clín*. 2006;47(3).

105. Erez O, Romero R, Hoppensteadt D, Than N, Fareed J, Mazaki-Tovi S, et al. Tissue factor and its natural inhibitor in pre-eclampsia and SGA. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2008;21(12):855-69.
106. Hsu C, riye B, Johnson T, Witter F, HONG S, Chan D. Elevated circulating thrombomodulin in severe preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993;169(1):148-9.
107. Wienhard J, Bielska B, Münstedt K, Lang U, Zygmunt M. Increased endothelial thrombomodulin (TM) expression in pregnancies complicated by IUGR. *Journal of perinatal medicine*. 2002;30(4):322-8.
108. Estelles A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff D, Schleef R. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood*. 1989;74(4):1332.
109. Estelles A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, Grancha S, et al. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood*. 1994;84(1):143.
110. Reith A, Booth N, Moore N, Cruickshank D, Bennett B. Plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in normal pregnancies, pre-eclampsia and hydatidiform mole. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1993;100(4):370-4.
111. Halligan A, Bonnar J, Sheppard B, Darling M, Walshe J. Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1994;101(6):488-92.
112. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjastro G, et al. Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clin Chem*. 2007;53(3):399-404.
113. Brandenburg H, Jahoda MGJ, Pijpers L, Reuss A, Kleyer WJ, Wladimiroff JW. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and subsequent amniocentesis. *American Journal of Medical Genetics*. 1990;35(2):178-80.

114. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*. 1997;350(9076):485-7.
115. Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EMC, Lo YMD. Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total DNA Quantification in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*. 2001;47(9):1607-13.
116. Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai C, Ramoni M, Alterovitz G, et al. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(10):3007.
117. Bianchi DW. Fetomaternal cell trafficking: A new cause of disease? *American Journal of Medical Genetics*. 2000;91(1):22-8.
118. Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4748-53.
119. Hanako S, Akihiko S, Yuditiya P, Masamitsu N, Antonio F, Nicola R, et al. PP13 mRNA expression in the cellular component of maternal blood as a marker for preeclampsia. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(13):1231-6.
120. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okazaki S, Farina A, Wibowo N, Nakamura M, et al. Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2009;200(4):386.e1-.e7.
121. Winnie WIP, Michelle HYT, Daljit S, Tak YL, Tze KL, Lo YMD, et al. A strategy for identifying circulating placental RNA markers for fetal growth assessment. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(5):495-504.
122. Colombia MdSd. Resolución 008430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Ministerio de Salud de Colombia Bogotá; 1993.
123. Mundial AM. Declaración de Helsinki: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Disponible en: <http://www.wma.net/s/policy/b3.htm>[Consulta: 16 de enero de 2008].

124. Montoya-Restrepo NE, Correa-Morales JC. Curvas de peso al nacer. Revista de Salud Pública. 2007;9(1):1-10.
125. Monrroy A. Medicina y Altitud: Consejos y Experiencias Médicas: LA PLACENTA EN LA GRAN ALTURA. Available from: <http://altitudchulec.blogspot.com/2010/05/la-placenta-en-la-gran-altura.html>.
126. Acosta N. **EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADO A MICROFTALMIA (MITF) EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO**: Universidad del Rosario; 2010.
127. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol. 2000;132(3):365-86.
128. Mueller J, Rox JM, Madlener K, Poetzsch B. Quantitative tissue factor gene expression analysis in whole blood: development and evaluation of a real-time PCR platform. Clinical chemistry. 2004;50(1):245.
129. Smith R, Xue AQ, Gill A, Scarlett C, Saxby A, Clarkson A, et al. High expression of plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) is a predictor of improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. World journal of surgery. 2007;31(3):493-502.
130. Nan B, Yang H, Yan S, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, et al. C-reactive protein decreases expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. Surgery. 2005;138(2):212-22.
131. Goldman S, Shalev E. Difference in Progesterone-Receptor Isoforms Ratio Between Early and Late First-Trimester Human Trophoblast Is Associated with Differential Cell Invasion and Matrix Metalloproteinase 2 Expression. Biology of Reproduction. 2006;74(1):13-22.
132. Illumina I. Eco Real-Time PCR System, Useful Tools - Illumina, Inc. Available from: [http://www.ecoqpcr.com/support/useful\\_tools.ilmn?modal=/support/useful\\_tools/dna\\_copy\\_number\\_calculator.ilmn?modalsize=650x600](http://www.ecoqpcr.com/support/useful_tools.ilmn?modal=/support/useful_tools/dna_copy_number_calculator.ilmn?modalsize=650x600).
133. Brown M, Lindheimer M, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin J. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the

International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). Hypertension in pregnancy. 2001;20(1):9-14.

134. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.

135. Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*. 1999;11(4):305.

136. Stahlberg A, Aman P, Ridell B, Mostad P, Kubista M. Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of  $\kappa$  and  $\lambda$  immunoglobulin light chain expression. *Clinical chemistry*. 2003;49(1):51.

137. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical chemistry*. 2004;50(3):509.

138. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75.

139. Krikun G, Huang S, Schatz F, Salafia C, Stocco C, Lockwood CJ. Thrombin activation of endometrial endothelial cells: a possible role in intrauterine growth restriction. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*. 2007;97(2):245.

140. Mechtcheriakova D, Wlachos A, Holzmüller H, Binder BR, Hofer E. Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood*. 1999;93(11):3811.

141. Krikun G, Lockwood CJ, Paidas MJ. Tissue factor and the endometrium: from physiology to pathology. *Thrombosis research*. 2009;124(4):393-6.

142. Chinni E, Colaizzo D, Margaglione M, Rubini C, D'Ambrosio RL, Giuliani F, et al. Correlation between factors involved in the local haemostasis and angiogenesis in full term human placenta. *Thrombosis research*. 2008;122(3):376-82.

143. Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, Norwitz E, Funai EF, Huang STJ, et al. Thrombin regulates soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) expression in first trimester decidua: implications for preeclampsia. *American Journal of Pathology*. 2007;170(4):1398.

144. Redecha P, van Rooijen N, Torry D, Girardi G. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood*. 2009;113(17):4101.



145. Bartha K, Brisson C, Archipoff G, de la Salle C, Lanza F, Cazenave JP, et al. Thrombin regulates tissue factor and thrombomodulin mRNA levels and activities in human saphenous vein endothelial cells by distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(1):421.
146. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microscopy research and technique*. 1997;38(1 2):29-41.
147. Kacemi A, Vervelle C, Uzan S, Challier J. Immunostaining of vascular, perivascular cells and stromal components in human placental villi. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 1999;45(1):101.
148. Weiler H, Isermann B. Thrombomodulin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1(7):1515-24.
149. Shi C-S, Shi G-Y, Chang Y-S, Han H-S, Kuo C-H, Liu C, et al. Evidence of Human Thrombomodulin Domain as a Novel Angiogenic Factor. *Circulation*. 2005;111(13):1627-36.
150. Gao M, Nakabayashi M, Sakura M, Takeda Y. The imbalance of plasminogen activators and inhibitor in preeclampsia. *Asia Oceania Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1996;22(1):9-16.
151. Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E, Hausknecht V, Lockwood CJ. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1995;80(8):2504.
152. Saito T, Koyama T, Nagata K, Kamiyama R, Hirosawa S. Anticoagulant effects of retinoic acids on leukemia cells. *Blood*. 1996;87(2):657.
153. Zhu J, Guo W, Yao Y, Zhao W, Pan L, Cai X, et al. Tissue factors on acute promyelocytic leukemia and endothelial cells are differently regulated by retinoic acid, arsenic trioxide and chemotherapeutic agents. *Leukemia*. 1999;13:1062-70.

154. Vaiman D, Mondon F, Garcès-Duran A, Mignot TM, Robert B, Rebourcet R, et al. Hypoxia-activated genes from early placenta are elevated in preeclampsia, but not in Intra-Uterine Growth Retardation. *BMC genomics*. 2005;6(1):111.
155. Günyeli I, ZergeroGlu S, Danisman N, MollamahmutoGlu L. The diagnostic significance of hCG and hPL via immunohistochemistry of placental tissues in pregnancies diagnosed with IUGR and IUD. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2009;29(6):521-5.
156. Bersinger NA, Groome N, Muttukrishna S. Pregnancy-associated and placental proteins in the placental tissue of normal pregnant women and patients with pre-eclampsia at term. *European journal of endocrinology*. 2002;147(6):785.
157. Bersinger NA, Ødegård RA. Second and third trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small for gestational age pregnancies. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2004;83(1):37-45.
158. Sørensen S, von Tabouillot D, Schiøler V, Greisen G, Petersen S, Larsen T. Serial measurements of serum human placental lactogen (hPL) and serial ultrasound examinations in the evaluation of fetal growth. *Early human development*. 2000;60(1):25-34.
159. Bianchi D. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999;105(3):574-83.
160. Poon L, Leung T, Lau T, Lo Y. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46(11):1832-4.
161. Antonio F, Sekizawa A, Purwosunu Y, Rizzo N, Banzola I, Concu M, et al. Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia &lt;&gt;versus&lt;/&gt; controls. *Prenatal Diagnosis*. 2006;26(12):1115-20.
162. Kimmig MSBHR, Kasimir-Bauer S. mRNA of placental origin in maternal serum of women with normal and preeclamptic pregnancies. *Fetal Diagn Ther*. 2009;25:269-76.
163. El-Tagy A, Raouf A, El Tabbakh MNH, Abdel Aziz SF. Monitoring High Risk Pregnancy and Its Outcome.

164. Chiu RWK, Lui W-b, Cheung M-c, Kumta N, Farina A, Banzola I, et al. Time Profile of Appearance and Disappearance of Circulating Placenta-Derived mRNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*. 2006;52(2):313-6.
165. Zhong XY, Gebhardt S, Hillermann R, Tofa KC, Holzgreve W, Hahn S. Parallel assessment of circulatory fetal DNA and corticotropin-releasing hormone mRNA in early- and late-onset preeclampsia. *Clinical chemistry*. 2005;51(9):1730.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. CUESTIONARIO PACIENTES CON RCIU

**METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA, SU RELACIÓN CON POLIMORFISMOS DE LA MTHFR, MTRR, CBS Y EXPRESIÓN DE GENES PARA FACTORES PROCOAGULANTES, ANTICOAGULANTES Y FIBRINOLITICOS EN EL TERCER TRIMESTRE DE GESTACIONES NORMALES.**

**INSTITUTO DE GENETICA HUMANA – PUJ**

#### IDENTIFICACION DE LA MADRE:

Nombre:

Fecha de Nac:

Natural:

Procedente:

Dirección:

Tels:

Cel:

La información solicitada en este formato tiene un carácter estrictamente confidencial y solo será usada con fines académicos. Por favor, lea cuidadosamente cada pregunta e indique la respuesta que corresponda. Le agradecemos la participación y la sinceridad prestada al realizar la encuesta.

#### ANTECEDENTES MATERNOS Y DATOS DE EXAMEN FISICO MATERNO

Edad materna (años cumplidos): \_\_\_\_\_

Estado civil: Casada  Unión libre  Soltera  Viuda  Separada

Escolaridad:

Prim. Incomp  Prim. Comp  Secund. Incomp  Secund. Comp

Univ. Incomp  Univ. Comp  Postgrado

Ocupación: \_\_\_\_\_

Estrato socioeconómico: \_\_\_\_\_

Evaluación de hábitos nutricionales y estilo de vida:

¿Ha seguido alguna dieta alimenticia en el último año?

SI  NO

En esta dieta se evita el consumo de (marque con una X todas las casillas necesarias)

Frutas  Vegetales  Carnes   
Todos los anteriores  Otro

¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Con qué frecuencia consume frutas y verduras?

Siempre  Casi siempre  Casi nunca  Nunca

Ejercicio preconcepcional (periodo de 1 año a concepción): ¿Con qué regularidad usted hace ejercicio?

Diariamente  Una vez por semana  2 o 3 veces por semana   
Más de 3 veces por semana  Nunca

Talla (cms): \_\_\_\_\_ Peso pregestacional (kg): \_\_\_\_\_ IMC pregestacional: \_\_\_\_\_

Tensión arterial:

Sistólica \_\_\_\_\_ Diastólica \_\_\_\_\_

Etnia/antepasados:

Europeos latinos  Europ. No latinos  Judíos  Árabes   
Negros  Orientales  Nativos  Otros

Antecedente personal de eventos trombóticos (TEP, tromboflebitis, TVP)

Cual \_\_\_\_\_ Año \_\_\_\_\_

Antecedente familiar de enfermedad cardiovascular y eventos trombóticos (TEP, tromboflebitis, TVP, EAC, ACV). Hasta segundo grado de parentesco.

Quien? \_\_\_\_\_ Cual? \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Antecedente exámenes paraclínicos metabólicos alterados en periodo de 1 año preconcepcional.

¿Tiene el colesterol LDL aumentado? SI  NO  NO SABE

¿Tiene el colesterol HDL bajo? SI  NO  NO SABE

¿Tiene los triglicéridos aumentados? SI  NO  NO SABE

¿Tiene glucosa aumentada? SI  NO  NO SABE

Usted sufre de alguna enfermedad?

---

### **ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRICOS**

Incremento porcentual del peso materno respecto al peso pregestacional: \_\_\_\_\_

Paridad: G\_\_P\_\_V\_\_ Periodo entre los últimos 2 embarazos (meses): \_\_\_\_\_

Antecedente de complicaciones obstétricas:

RCIU: SI  NO  N°\_\_ Preeclampsia: SI  NO  N°\_\_

Obito fetal: SI  NO  N°\_\_ Abruption de placenta: SI  NO  N°\_\_

Hijos del mismo padre (especificación):

---

Antecedente de malformaciones fetales:

Caso: 1. \_\_ ¿Cuál (es)? \_\_\_\_\_

2. \_\_ ¿Cuál (es)? \_\_\_\_\_

3. \_\_ ¿Cuál (es)? \_\_\_\_\_

Habito de fumar

SI  NO  Cigarrillos/día promedio \_\_\_\_ Pregestacional  Trimestre \_\_\_\_\_

Ingesta de alcohol

SI  NO  Cigarrillos/día promedio \_\_\_\_ Pregestacional  Trimestre \_\_\_\_

Consumo de sustancias psicoactivas

SI  NO  ¿Cuál? \_\_\_\_\_ Pregestacional  Trimestre \_\_\_\_

Medicamentos (Nombre, vía, dosis, duración):

1. \_\_\_\_\_

Pregestacional  Trimestre en el embarazo: \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

Pregestacional  Trimestre en el embarazo: \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Pregestacional  Trimestre en el embarazo: \_\_\_\_\_

Suplementos vitamínicos (Nombre, vía, dosis, duración):

1. \_\_\_\_\_

Pregestacional  Trimestre en el embarazo: \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

Pregestacional  Trimestre en el embarazo: \_\_\_\_\_

Uso de anticonceptivos hormonales preconcepcionales (periodo de 1 año a concepción)

¿De que clase?

Orales  Inyectables

¿Por cuánto tiempo? MESES \_\_\_\_\_ AÑOS \_\_\_\_\_

¿Los uso en el periodo periconcepcional? SI  NO

Concibe fácil: Si  No

Hizo estudios  Hizo tratamientos

Nota: \_\_\_\_\_

Consanguinidad parental: Si  No

Nota: \_\_\_\_\_

Descripción de RCIU:

Tipo: Simétrico  Asimétrico  No clasificado

Severidad de acuerdo a percentil peso para edad gestacional:

Leve (percentil 5-10)  Moderado (2-5)  Severo (<2)  No clasificado

Edad gestacional al diagnóstico de RCIU (en semanas): \_\_\_\_\_

**DATOS DEL RN**

Sexo RN: M  F  Edad gestacional (semanas por Ballard): \_\_\_\_\_

Vivo  Muerto  Peso neonatal (gr): \_\_\_\_\_ Talla neonatal (cm): \_\_\_\_\_

PEG  AEG  GEG



## **ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES CON RCIU**

### **Estudio: APROXIMACION A LOS MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS Y MOLECULARES INVOLUCRADOS EN RESTRICCION DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO IDIOPATICO.**

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad. Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. (b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre la enfermedad y su mecanismo de herencia, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico - paciente. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. (f) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. (h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

**Jaime Bernal**

**Martha Bermúdez**

**Instituto de Genética Humana**

**Tel: (91)3208320 (Ext. 2791, 2794, 2828)**

**EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

**OBJETIVO:** Determinar las alteraciones en procesos metabólicos maternos, en la homeostasis de la coagulación en la unidad materno-fetal y mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología de la Restricción de Crecimiento Intrauterino.

**PROCEDIMIENTO:** Se trata de un estudio observacional analítico de tipo casos y controles. Se estudiarán 20 gestantes con diagnóstico ecográfico de RCIU de etiología desconocida del Hospital Universitario San Ignacio, con previo informe de consentimiento. Se hará examen físico y nutricional, se aplicará cuestionario sobre edad gestacional, peso fetal, edad materna, gestaciones, sexo fetal, suplencia vitamina B12 y folato, RCIU sin causa conocida y consumo de fármacos. El grupo control corresponde a gestantes con ecografía normal e historia de partos sanos, del mismo grupo étnico, edad y procedentes de la misma institución. Se realizará: Cuantificación de homocisteína, vitamina B12 y ácido fólico durante el embarazo y 3 meses postparto; estudio anatomopatológico de placenta y determinación, por PCR tiempo real, de la expresión de algunos genes de las vías de coagulación sanguínea y por ELISA para cuantificación de dichas proteínas. Se realizará estadística descriptiva para las variables ya enunciadas, así como descripción del perfil de genes pro y anticoagulantes expresados en placenta y en el suero materno e interpretación estadística de la relación entre estos. Si fuera necesario repetir los exámenes, usted sería notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por las personas involucradas directamente en este proyecto, además serán almacenadas y procesadas en el Instituto de Genética Humana. Si usted decide retirarse del estudio, sus muestras dejarán de ser utilizadas de inmediato y serán devueltas si así lo desean.

**RIESGOS E INCOMODIDADES:** La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento.

**BENEFICIOS ADICIONALES:** Este estudio nos ayudará a entender las causas de las enfermedades genéticas. Se puede dar el caso donde usted y su familia no se beneficien directamente, pero otros individuos afectados y su familia como si pueden beneficiarse. En el caso donde se logre conocer la alteración genética, se le informará inmediatamente. Es importante aclarar que este estudio no tiene ningún interés económico por parte de nuestra o de las instituciones colaboradoras.

**RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES:** Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

**MANEJO DE RESULTADOS:** Los resultados de los estudios genéticos solo le serán revelados cuando representen una ayuda diagnóstica para la entidad objeto de este estudio, estos resultados le serán entregados durante consulta clínica en presencia de un MEDICO GENETISTA. Los resultados de pruebas diagnósticas no genéticas empleadas en el estudio serán remitidos en sobre cerrado directamente al médico tratante que lo remitió.

**OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:** Confidencialidad: cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son absolutamente confidenciales, de manera que solamente usted y el investigador tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

**AUTORIZACION:**

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

**Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**

**Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**

- En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia:  
Si No
- En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación  
\_ Si \_ No
- En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No
- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No

**AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSIÓN VOLUNTARIA**

**EN EL ESTUDIO:**

Yo \_\_\_\_\_ identificado con documento de  
identificación No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ acepto  
voluntariamente que se me tome una muestra de \_\_\_\_\_, con el  
fin de realizar análisis de \_\_\_\_\_.

Así mismo, declaró que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se  
le dará al material de muestra.

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Paciente, Acudiente, Representante legal

Testigo

\_\_\_\_\_  
Investigador

## **ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES CON PREECLAMPSIA**

### **Información para la paciente**

#### **DETECCIÓN PRECOZ DE PREECLAMPSIA Y RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO FETAL MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE MUERTE Y APOPTOSIS DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS EN PLASMA MATERNO**

Usted esta siendo invitada a ser parte de un estudio científico. Antes de decidir participar en este estudio es importante que entienda por que se esta haciendo este estudio y que implicaría si decide participar en el. Por favor tómese su tiempo para leer cuidadosamente la siguiente información y pregúntenos si algo no le queda claro o desea mayor información.

#### **¿Cuál es el propósito de este estudio?**

Desde hace un tiempo se sabe que la mujer embarazada presenta en su sangre pequeñas moléculas de ADN (material genético) que corresponden a su hijo. Este material genético ha sido utilizado para el diagnóstico del sexo fetal y del tipo de grupo sanguíneo. El propósito de este estudio es verificar si esta molécula está aumentada en el embarazo de mujeres que desarrollaran unas patologías propias del embarazo llamadas preeclampsia (presión alta en el embarazo) y retardo de crecimiento fetal (feto pequeño por insuficiencia placentaria). Este aumento sería antes de que se iniciaran los síntomas de la enfermedad, lo que es de suma importancia ya que nos permitiría predecirlas.

#### **¿Porqué he sido elegida?**

Usted esta siendo invitada a participar de este estudio ya que se encuentra cursando un embarazo de primer trimestre. Estamos invitando a todas las mujeres que se controlan en nuestra unidad y que tengan un embarazo entre las 11 y 14 semanas.

#### **¿Estoy obligada a tomar parte en este estudio?**

No. Participar en el estudio es absolutamente voluntario. Si decide tomar parte en el estudio, se le pedirá que firme un consentimiento informado y se le entregará una copia de esta hoja informativa. Si acepta participar, usted es libre de retirarse en cualquier momento. Si decide no participar, usted no tiene que entregar ninguna razón, nadie se va a molestar, y la calidad de atención que usted recibirá no se verá afectada en lo más mínimo.

#### **¿Qué se pedirá que haga si decido tomar parte?**

Se le pedirá que nos permita tomar tres muestras de sangre suya de 20 cc cada una, de la misma manera en que se le ha realizado tomas de sangre para los exámenes en el embarazo, alrededor de las 12 semanas, 23 semanas y al momento del parto. Además se le realizara una ecografía entre las 11-14 semanas, entre las 22-24 semanas, y a las 28 y 32 semanas. Además se tomará una muestra de placenta al momento del parto.

#### **¿Cuáles son los posibles efectos secundarios de aceptar ser parte del estudio?**

Existe una posibilidad muy pequeña de que produzca un moretón o herida en la zona en que se realizará la punción venosa, sin embargo estas lesiones son de fácil manejo y sin ninguna repercusión posterior. No se conocen otros riesgos potenciales para este procedimiento. Si esto se llegara a producir, el equipo médico que tomara la muestra, la manejará sin implicar ningún costo extra para usted.

**¿Cuáles son los posibles efectos beneficiosos si decido aceptar participar en el estudio?**

No esperamos ningún beneficio directo para usted, salvo el hecho de que al participar de este estudio se le realizará un control ecográfico seriado en el segundo y tercer trimestre del embarazo, con personal y equipos ultrasonográficos de alta calidad. Sin embargo, la información que obtengamos nos puede ayudar en el futuro a ofrecer un mejor manejo a mujeres embarazadas que tenggan riesgo de estas patologías.

**¿Será mi participación en este estudio mantenida en forma confidencial?**

El investigador puede que tenga necesidad de examinar su ficha clínica. Sin embargo sus datos no serán conocidos por nadie, excepto el equipo de investigación, y ninguna de las muestras que se tome llevará su nombre.

**¿Qué pasará con los resultados del estudio?**

Los resultados de estudio serán publicados en medios científicos, pero su nombre no será identificado.

**¿Quién está financiando esta investigación?**

El fondo nacional de desarrollo científico y tecnológico.

**¿Quién ha revisado y autorizado este estudio?**

El comité ético de la Universidad de los Andes y de la Universidad de Chile ha revisado y aprobado este estudio.

**¿Qué es lo que hago ahora?**

Muchas gracias por considerar tomar parte en el estudio. Uno de los investigadores se le acercará y le podrá preguntar cualquier duda que aún tenga. Hágale saber si desea tomar parte en el estudio.

Dr. Sebastián Illanes López  
Teléfono 4129334

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título:**

DETECCIÓN PRECOZ DE PREECLAMPSIA Y RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO FETAL MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE MUERTE Y APOPTOSIS DE CÉLULAS TROFBLÁSTICAS EN PLASMA MATERNO

**Nombre investigador: Dr. Sebastián Illanes L.**

1. Confirmando que he leído la hoja informativa y que he tenido la oportunidad de resolver todas las dudas correspondientes a mi participación en este estudio.
2. Entiendo que mi participación es absolutamente voluntaria, y que soy libre de retirarme en el momento que lo desee, sin que mi atención médica se vea afectada.
3. Entiendo además, que parte de mi ficha clínica puede ser analizada como parte de mi participación en el estudio
4. Acepto participar en el estudio.

\_\_\_\_\_  
Nombre de la paciente

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

**ANEXO 4. ARTICULO SOMETIDO A LA REVISTA COLOMBIAMÉDICA**

**IDENTIFICACION DE RNA MENSAJERO DE ORIGEN FETOPLACENTARIO  
EN PLASMA MATERNO DE MUJERES CON EMBARAZOS NORMALES Y  
GESTANTES CON RESTRICCION DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO**

**IDENTIFICATION OF MESSENGER RNA OF FETOPLACENTAL ORIGIN IN  
MATERNAL PLASMA OF WOMEN WITH NORMAL PREGNANCIES AND  
PREGNANCIES WITH INTRAUTERINE GROWTH RESTRCITION**

Paola Ayala Bac<sup>1</sup>, Reggie García MD, PhD<sup>1</sup>, Juan Diego Rojas, MD, GO<sup>2</sup>, Martha Bermúdez PhD<sup>1</sup>, Jaime Bernal MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Unidad de Medicina Materno Fetal. Departamento de Ginecobstetricia, Hospital San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia

**Realizado en:** Instituto de Genética Humana- Pontificia Universidad Javeriana y Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá (Colombia)

**Correspondencia:** Cra 7 No. 40-62 Edificio 32 Instituto de Genética Humana- Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá (Colombia). Correo electrónico: payala@javeriana.edu.co.

Proyecto financiado por la Vicerrectoría académica de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá (Colombia).



## RESUMEN

**Objetivo:** cuantificar RNA específico de placenta en el plasma de mujeres con embarazos con fetos con Restricción de Crecimiento Intrauterino y gestantes con embarazos normales.

**Materiales y métodos:** se estudiaron 8 mujeres con embarazos con fetos con Restricción de Crecimiento Intrauterino y 18 mujeres con embarazos sin complicaciones, en el tercer trimestre de embarazo. Se cuantificó el RNA total libre en plasma materno por espectrofotometría y la expresión del gen *Lactógeno Placentario Humano* a nivel de RNA mensajero por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

**Resultados:** se logró detectar RNA en plasma de origen fetoplacentario en el 100% de las gestantes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de RNA total extraído de plasma ( $p=0,5975$ ) ni en la expresión del RNA mensajero del gen *Lactógeno placentario humano* ( $p=0,5785$ ) entre casos y controles.

**Conclusión:** es posible detectar RNA mensajero de origen fetoplacentario en plasma materno durante el embarazo.

**Palabras claves:** RCIU, RNA mensajero, plasma, complicaciones del embarazo, lactógeno placentario humano, Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Inversa.

## SUMMARY

**Objective:** To quantify placental specific RNA in plasma of women with pregnancies with Intrauterine Growth Restriction fetuses and pregnant women with normal pregnancies.

**Materials and methods:** We studied 8 women with fetuses with Intrauterine Growth Restriction and 18 women with uncomplicated pregnancies in third trimester of pregnancy. RNA total free was quantified in maternal plasma by spectrophotometry and gene expression of *Human Placental Lactogen* mRNA by Real-Time Polymerase Chain Reaction.

**Results:** We detected RNA of fetoplacental origin in maternal plasma in 100% of pregnant women. No statistically significant differences were found between the values of total RNA extracted from plasma ( $p=0,5975$ ) o *Human Placental Lactogen* gene expression ( $p=0,5785$ ) between cases and controls.

**Conclusion:** It is possible to detect messenger RNA of fetoplacental origin in maternal plasma during pregnancy.

**Keywords:** IUGR, messenger RNA, plasma, complications of pregnancy, human placental lactogen, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.

## INTRODUCCIÓN

La Restricción del Crecimiento Intrauterino (RCIU) se define como aquel cuadro clínico en el cual el feto no alcanza su pleno potencial de crecimiento y como desenlace final se encuentra una disminución en el peso corporal, siendo menor al percentil 10 para la edad gestacional según tablas de crecimiento<sup>1</sup>. El neonato puede ser pequeño constitucionalmente o debido a factores en la madre, en la placenta o en el feto<sup>2</sup>. La RCIU tiene una carga importante en la morbimortalidad perinatal y neonatal<sup>1</sup>. Además, posteriormente los niños con RCIU pueden cursar con alteraciones en el crecimiento y desarrollo neurocognitivo<sup>3</sup>. También se ha descrito asociación de bajo peso al nacer (BPN) con posterior desarrollo de patologías del adulto como resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular, este hallazgo se ha denominado “programación fetal”<sup>4</sup>. Los biomarcadores en suero materno han mostrado tener un poder predictivo y una sensibilidad sub-óptimas para la evaluación del crecimiento fetal<sup>5</sup>. Debido a las limitaciones de las técnicas actuales, es necesario el desarrollo de métodos más acertados para el monitoreo del crecimiento fetal<sup>6</sup>. En 1997 Lo et al., lograron aislar DNA (ácido desoxirribonucleico) libre circulante en el plasma de mujeres embarazadas<sup>7</sup>. Estos estudios abrieron una nueva posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal no invasivo donde ni el feto ni la madre corren peligro alguno<sup>8</sup>. Debido a que muchas veces no es posible determinar el origen del DNA encontrado en el plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con el DNA materno, se planteó el interrogante sobre si se podría aislar RNA de origen feto-placentario en el plasma materno y así determinar la expresión de genes específicos de la placenta. Poon et al., fueron los primeros en publicar la presencia de RNA fetal en el plasma de gestantes<sup>9</sup>. Numeroso estudios han analizado la expresión génica a nivel de RNA mensajero (RNAm) extraído de plasma materno en patologías fetales tales como: trisomías<sup>10,11</sup>, cardiopatías congénitas<sup>12</sup> y complicaciones maternas como: preeclampsia<sup>13,14</sup>, RCIU<sup>6</sup> y placenta previa percreta<sup>15</sup>, estableciendo que la utilización de marcadores genéticos a nivel de RNAm de origen feto-placentario circulante en plasma materno abre nuevas posibilidades para estrategias en la detección temprana de condiciones patológicas fetales, diagnóstico prenatal no invasivo, determinación de riesgo para sufrir complicaciones del

embarazo y severidad de la patología. El lactógeno placentario humano (hPL) es producido en la placenta y actúa como inmunosupresor induciendo tolerancia gestacional y como factor de crecimiento fetal<sup>2</sup>. Estudios previos han asociado niveles bajos de RNAm del gen hPL en plasma materno en embarazos complicados con placenta previa<sup>16</sup> y preeclampsia<sup>14,17</sup>. Estos estudios concluyen que la PCR en tiempo real es un método sensible para monitorear cambios en las concentraciones de RNAm que resultan de efectos apoptóticos en la placenta y para evaluar las condiciones de invasión del trofoblasto veloso<sup>15</sup>. El objetivo de este estudio fue cuantificar RNA total por espectrofotometría y la expresión del gen hPL a nivel de RNAm libres en plasma materno por medio de la técnica qPCR-RT en embarazos que cursaron con RCIU y gestantes con fetos normales y embarazos sin complicaciones.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó estudio observacional descriptivo, en mujeres gestantes en tercer trimestre del embarazo cuyos embarazos cursaron con RCIU y mujeres gestantes con fetos sanos sin complicaciones del embarazo, atendidas por el Departamento de Ginecoobstetricia del Hospital Universitario San Ignacio en la ciudad de Bogotá entre noviembre de 2009 y diciembre de 2010. Los criterios de inclusión fueron pacientes con diagnóstico ecográfico por ecografía convencional o ecografía Doppler color en ambas arterias uterinas, fetales y placentarias de RCIU (peso en percentil menor a 10 para la edad gestacional) y recién nacido pequeño para la edad gestacional sin etiología aparente, se excluyeron pacientes con diagnóstico ecográfico de RCIU y bajo peso al nacer con causa conocida, feto/neonato con malformaciones fetales mayores o impresión diagnóstica de patología genética, gestantes que manifiesten su deseo de no participar en el estudio y maternas con condiciones protrombóticas. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigaciones y Bioética de la Facultad Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana y cumple con los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki de 1975 modificada en el 2004. Todas las participantes diligenciaron de manera voluntaria un consentimiento informado.

**Toma y procesamiento de muestras:** Se tomaron dos muestras de sangre periférica por veno-punción (5 cc) en tubo con anticoagulante con EDTA. Se centrifugó inmediatamente a 3000 rpm por 15 minutos y el plasma (sobrenadante) se pasó a un tubo Falcon de 15 ml. 1.6 ml de plasma fue mezclado con 2 ml de Trizol LS (Invitrogen) y se almacenó a -40°C hasta su procesamiento.

Extracción de RNA: Se realizó la extracción del RNA de plasma utilizando el protocolo recomendado por Ng et al.,<sup>18</sup> adicionando 5U de DNAsa (Epicentre). El RNA total se almacenó a -40°C. La concentración del RNA total se determinó a 260nm utilizando el equipo GeneQuant Pro (Amersham Bioscience).

**Transcripción reversa y PCR en tiempo Real (qPCR-RT):** la transcripción reversa del RNA total a cDNA se realizó utilizando el kit SuperScriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una reacción con volumen final de 20 µl que contenía: 1X de buffer, 0.5mM de dNTPs, 50ng de random primer, 0.005M de DTT, 40U de RNase OUT, 200U de SuperScript y 7 µl de RNA, con una posterior digestión con 2U de RNasa H, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su amplificación. Se utilizó el termociclador LigthCycler (Roche) usando la química SYBR Green (LigthCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit; Roche) y el software Lightcycler para cuantificación absoluta 4.1 (Roche Diagnostics). La PCR fue realizada en un volumen de reacción de 20 µl con 7 µl de muestra y 0.25 µM de primers, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones del programa de la PCR se muestran en la cuadro 1. Las secuencias de los primers fueron: 5´ CATGACTCCCAGACCTCCTTC3´ (sentido) y 5´ TGCGGAGCAGCTCTAGATTG3´ (antisentido), se confirmó que con estos primers no se lograba amplificar DNA con el software Primer3<sup>19</sup> y realizando amplificación de DNA el cual no mostraba ningún fragmento. La curva de calibración se realizó a partir del producto de PCR de hPL purificado con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), la concentración de copias se calculó según Overbergh et al.<sup>20</sup>. Se realizaron diluciones seriadas con un rango entre 1X10<sup>7</sup> a 1X10<sup>1</sup> copias. Cada muestra fue analizada por duplicado y en cada análisis se montó un control negativo en el cual en vez de cDNA se colocó agua.

**Análisis estadístico:** se realizó análisis descriptivo calculando mediana y rangos. Se realizó el planteamiento de pruebas de hipótesis con el fin de determinar si existe o no asociación entre los niveles de RNA total y RNAm de hPL en plasma de controles normales y pacientes con RCIU utilizando la prueba de Mann-Whitney con el programa Stata 9.1.

## **RESULTADOS**

En total se recolectaron los datos de 12 casos y 22 controles, pero se excluyeron 4 casos y 1 control debido a que el recién nacido presentaba algún criterio de exclusión. El grupo de casos lo conformaron 8 mujeres gestantes en el tercer trimestre del embarazo con diagnóstico de RCIU idiopático. En la cuadro 2 se muestran las características demográficas de la población. Las variables peso del recién nacido e índice peso del recién nacido/placenta presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0003$  y  $p=0.002$ , respectivamente). Con respecto a la clasificación de la RCIU, el 50% de los casos presentaban una RCIU asimétrica y el otro 50% presentaban RCIU simétrica. Adicionalmente 3 pacientes presentaban RCIU leve, 5 de moderado a severo y 2 pacientes presentaban anomalías en el Doppler.

Se logró extraer RNA de plasma del 100% de las muestras. Los resultados de la cuantificación de RNA total de plasma y la expresión de RNAm de hPL se describen en la cuadro 3. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de RNA total ni en la expresión de RNAm de hPL ( $p=0,5975$  y  $0,5785$ , respectivamente).

## **DISCUSIÓN**

En este estudio se extrajo RNA de plasma del 100% de las muestras de plasma y se cuantificó la expresión de RNAm del gen hPL por la técnica de PCR en tiempo real. Estos hallazgos reproducen los resultados previamente reportados en la literatura donde se

demuestra que la placenta es un órgano importante que libera RNA fetal al plasma materno<sup>18,21,22</sup>. La cantidad de RNA total obtenido de plasma en los controles es menor a lo reportado por Maron et al., quienes obtuvieron niveles de RNA de plasma del tercer trimestre de 3 individuos entre 3 y 780  $\mu\text{g}$ <sup>23</sup>, sin embargo se debe tener en cuenta que en el estudio de Maron et al se tomaron 10 cc de sangre total y en este estudio se trabajó con 5 cc. La mediana de los niveles de RNAm del gen hPL en los controles son mayores a lo reportado por Tsui et al.<sup>24</sup> (n=5), Chiu et al.<sup>21</sup> (n=6), Okazaki et al.<sup>22</sup> (n=75) y Ng et al.<sup>18</sup> (n=10), quienes reportaron niveles en copias/ml de 14.707, 9.900, 3.698 y 122.225 (dato inferido del artículo) respectivamente y menores a lo reportado por Farina et al.<sup>14</sup> (n=30) quienes reportaron una mediana de 2.754.862. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de RNA total y de RNAm del gen hPL entre casos y controles. Este es el primer estudio donde se evalúan los niveles de RNAm del gen hPL en pacientes con diagnóstico de RCIU. En pacientes con preeclampsia se han encontrado que los niveles de RNAm del gen hPL son significativamente menores en gestantes tanto en el primer trimestre<sup>14</sup> como en el segundo y tercer trimestre<sup>17</sup>, estos estudios demuestran que es posible monitorear el estado placentario en el plasma materno. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en nuestro estudio podría deberse al tamaño de la muestra, por eso se recomienda ampliarlo. Los resultados de la expresión de proteína hPL en placentas con RCIU no muestran diferencias estadísticamente significativas con placentas sanas. A pesar de que se ha reportado una disminución de los niveles de proteína hPL en el plasma de mujeres con RCIU con diferencias estadísticamente significativas<sup>5</sup> nosotros no logramos encontrar estas diferencias a nivel de RNAm, lo cual podría deberse a la baja liberación de RNAm en comparación con proteína de origen feto-placentario. Adicionalmente el desarrollo de marcadores de RNAm placentarios que pueden ser detectados en plasma representa un avance en la utilización de moléculas que podrían utilizarse en todas las mujeres embarazadas sin tener en cuenta el sexo fetal, factor limitante al utilizar DNA. Por otro lado Zong et. al., postula que la evaluación cuantitativa de DNA fetal en plasma materno junto con la medición de RNAm de diferentes transcritos podría contribuir a mejorar la identificación de las mujeres en riesgo de desarrollar preeclampsia<sup>25</sup>, lo que se podría proponer también para RCIU.

## CONCLUSIONES

Se detectó RNAm en plasma de gestantes colombianas de origen fetoplacentario en tercer trimestre de embarazo. Los datos presentados demuestran que es factible realizar un perfil de expresión génica de la placenta analizando el plasma materno. El origen y los mecanismos de liberación de estas moléculas no han sido completamente elucidados y su comprensión posiblemente genere conocimiento sobre la fisiopatología de enfermedades como preeclampsia y RCIU. Es necesario realizar estudios adicionales midiendo los niveles de RNAm en plasma de genes implicados en la fisiopatología de las enfermedades evaluadas en embarazos normales y anormales para establecer la factibilidad de esta propuesta para el tamizaje y el diagnóstico de complicaciones del embarazo en la rutina clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz Molina L, Hernández Barbosa R. Retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) y sus alteraciones bioquímicas. *NOVA* 2005;3(3):88-94.
2. Haram K, Svendsen E, Myking O. Growth Restriction: Etiology, Maternal and Neonatal Outcome. A Review. *Curr Wom Health Rev* 2007;3(3):145-160.
3. Kramer MS. The Epidemiology of Adverse Pregnancy Outcomes: An Overview. *J. Nutr.* 2003;133(5, Suppl 2):1592S-1596s.
4. Cikota RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, et al. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr* 2001;85(1):49-58.
5. Markestad T, Bergsjø P, Aakvaag A, Lie RT, Jacobsen G, Hoffman HJ et al. Prediction of fetal growth based on maternal serum concentrations of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen and estriol. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*. Supplement 1997;165:50-5.



6. Winnie WIP, Michelle HYT, Daljit S, Tak YL, Tze KL, Lo YMD, et al. A strategy for identifying circulating placental RNA markers for fetal growth assessment. *Prenat Diagn* 2009;29(5):495-504.
7. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 1997;350(9076):485-487.
8. Bianchi D. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999;105(3):574-83.
9. Poon L, Leung T, Lau T, Lo Y. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46(11):1832-4.
10. Tsui NBY, Akolekar R, Chiu RWK, Chow KCK, Leung TY, Lau TK, et al. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Clin Chem* 2010;56(1):73.
11. Tsui NBY, Wong BCK, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn* 2009;29(11):1031-1037.
12. Arcelli D, Farina A, Cappuzzello C, Bresin A, De Sanctis P, Perolo A, et al. Identification of circulating placental mRNA in maternal blood of pregnancies affected with fetal congenital heart diseases at the second trimester of pregnancy: implications for early molecular screening. *Prenat Diagn* 2010;30(3):229-234.
13. Hanako S, Akihiko S, Yuditiya P, Masamitsu N, Antonio F, Nicola R, et al. PP13 mRNA expression in the cellular component of maternal blood as a marker for preeclampsia. *Prenat Diagn* 2009;29(13):1231-1236.

14. Antonio F, Sekizawa A, Purwosunu Y, Rizzo N, Banzola I, Concu M, et al. Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls. *Prenat Diagn* 2006;26(12):1115-1120.
15. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshimura S, et al. Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem* 2005;51(5):923-5.
16. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshimura S, et al. Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem* 2005;51(5):923-5.
17. Kimmig MSBHR, Kasimir-Bauer S. mRNA of placental origin in maternal serum of women with normal and preeclamptic pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2009;25:269-276.
18. Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *PNAS* 2003;100(8):4748-4753.
19. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132(3):365-386.
20. Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999;11(4):305.
21. Chiu RWK, Lui W, Cheung M, Kumta N, Farina A, Banzola I et al. Time Profile of Appearance and Disappearance of Circulating Placenta-Derived mRNA in Maternal Plasma. *Clin Chem* 2006;52(2):313-316.

22. Okazaki S, Sekizawa A, Purwosunu Y, Iwasaki M, Farina A, Okai T. Measurement of mRNA of trophoblast-specific genes in cellular and plasma components of maternal blood. *J. Med. Genet* 2006;43(9):e47.
23. Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai C, Ramoni M, Alterovitz G, et al. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *J Clin Invest* 2007;117(10):3007.
24. Tsui NBY, Chim SSC, Chiu RWK, Lau TK, Ng EKO, Leung TN, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet* 2004;41(6):461-467.
25. Zhong XY, Gebhardt S, Hillermann R, Tofa KC, Holzgreve W, Hahn S. Parallel assessment of circulatory fetal DNA and corticotropin-releasing hormone mRNA in early-and late-onset preeclampsia. *Clin Chem* 2005;51(9):1730.

Cuadro 1. Protocolo de las condiciones de amplificación del gen *hPL*

|                      | Temperatura        | tiempo      |
|----------------------|--------------------|-------------|
| Denaturación inicial | 95°C               | 10 minutos  |
| <b>45 Ciclos</b>     |                    |             |
| Denaturación         | 95°C               | 10 segundos |
| Anillamiento         | 62°C               | 10 segundos |
| Elongación           | 72°C               | 10 segundos |
| Lectura              | 72°C               | single      |
| Curva melting        | 95°C               | 0 segundos  |
|                      | 60°C               | 1 minuto    |
|                      | 95°C               | 0 segundos  |
|                      | Lectura cada 0,2°C | continuo    |
| Enfriamiento         | 40°C               | 30 segundos |

Cuadro 2. Descripción demográfica de la muestra.

|                                  | Casos (n=8) |               | Controles (n=21) |               | <i>p</i>       |
|----------------------------------|-------------|---------------|------------------|---------------|----------------|
|                                  | Mediana     | Rango min-max | Mediana          | Rango min-max |                |
| Edad materna (años)              | 26,5        | 20-34         | 28               | 20-38         | 0,3649*        |
| Edad del Recién nacido (semanas) | 37,5        | 31-40         | 38               | 37-42         | 0,1052*        |
| Peso del recién nacido (gramos)  | 2230        | 895-2775      | 2855             | 2470-3460     | <b>0,0003*</b> |
| Peso placenta                    | 460         | 290-475       | 470              | 390-610       | 0,3731*        |
| Índice peso RN/placenta          | 4,65        | 3,09-5,78     | 6,12             | 5,49-8,09     | <b>0,002*</b>  |
|                                  |             |               |                  |               |                |
|                                  | <b>n</b>    | <b>%</b>      | <b>n</b>         | <b>%</b>      |                |
| Primigestante                    |             |               |                  |               |                |

|   |   |      |    |       |          |
|---|---|------|----|-------|----------|
| <b>Si</b>                                 | 3 | 37,5 | 3  | 14,29 | 0,0934** |
| <b>No</b>                                 | 5 | 62,5 | 18 | 85,71 |          |
| <b>Estrato socioeconómico<sup>§</sup></b> |   |      |    |       |          |
| <b>1 y 2</b>                              | 5 | 62,5 | 11 | 52,38 | 0,253*** |
| <b>3 y 4</b>                              | 2 | 25   | 9  | 42,86 |          |
| <b>5 y 6</b>                              | 1 | 12,5 | 0  | 0,00  |          |
| <b>1 y 2 y 3</b>                          | 6 | 75   | 19 | 90,48 | 0,188*** |
| <b>4 y 5 y 6</b>                          | 2 | 25   | 1  | 4,76  |          |
| <b>Sexo</b>                               |   |      |    |       |          |
| <b>F</b>                                  | 6 | 75   | 14 | 66,67 | 1,000**  |
| <b>M</b>                                  | 2 | 25   | 7  | 33,33 |          |

\* Prueba de Mann-Withney. \*\* Prueba binomial. \*\*\* Prueba de Fisher.

<sup>§</sup> Una gestante del grupo control no tenía la información del estrato socioeconómico de su vivienda.

Cuadro 3. Cuantificación de RNA total y cuantificación absoluta del gen *hPL* en gestantes con fetos con RCIU y gestantes con embarazo normal

|  | <b>Casos<br/>(n=8)</b> |                | <b>Controles<br/>(n=21)</b> |                  | <i>p</i> |
|--|------------------------|----------------|-----------------------------|------------------|----------|
|  | <b>Mediana</b>         | <b>Rango</b>   | <b>Mediana</b>              | <b>Rango</b>     |          |
| <b>Cuantificación RNA plasma total (µg)</b>                                      | 1.75                   | 0,54-9,48      | 1.86                        | 0,3-11,22        | 0,5975   |
| <b>Cuantificación de RNAm del gen <i>hPL</i> en plasma (copias/ml de plasma)</b> | 311.500                | 890-12.700.000 | 419.500                     | 7.970-20.600.000 | 0,5785   |

## ANEXO 5. ARTICULO QUE SE SOMETERÁ A LA REVISTA PLACENTA

## ANEXO 6. ARTICULO PUBLICADO EN LA REVISTA CLINICA E INVESTIGACION EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA



### REVISIÓN DE CONJUNTO

## 1 Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia 2 un diagnóstico prenatal no invasivo

3 P. Ayala-Ramírez\*, R. García-Robles, J. Bernal y M. Bermúdez

4 Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina Pontificia, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

5 Recibido el 25 de febrero de 2010; aceptado el 2 de mayo de 2011

#### 6 PALABRAS CLAVE

7 ADN fetal libre;  
8 ARN fetal libre;  
9 Embarazo;  
10 Diagnóstico prenatal

#### 11 KEYWORDS

12 Free fetal DNA;  
13 Free fetal RNA;  
14 Pregnancy;  
15 Prenatal diagnosis

16 **Resumen** A partir del descubrimiento de la presencia de ácidos nucleicos fetales libres circulan-  
17 tes en el plasma materno se ha generado un gran interés sobre su origen, naturaleza y  
18 posibles usos médicos. En este artículo de revisión realizamos un amplio y conciso resumen  
19 sobre los resultados de los estudios de ADN y ARN fetal libre en plasma materno, sus perspecti-  
20 vas futuras, principalmente orientadas hacia el diagnóstico prenatal no invasivo, área donde se  
espera un impacto importante en el futuro inmediato. También se reportan resultados promete-  
dores en la evaluación de la función placentaria y como marcadores predictores y de severidad  
en complicaciones del embarazo.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### 21 **Detection of fetal nucleic acids in maternal plasma: toward a non-invasive prenatal 22 diagnosis**

23 **Abstract** The discovery of circulating free fetal nucleic acids in maternal plasma has sparked  
24 wide interest in their origin, characteristics and possible medical uses. This review provides  
25 a comprehensive and concise summary of the results of studies of free fetal DNA and RNA in  
26 maternal plasma and discusses future possibilities for their use, mainly aimed at non-invasive  
27 prenatal diagnosis, an area where this discovery is expected to have a major impact in the very  
28 near future. Promising results have been reported in the assessment of placental function and in  
29 the use of these nucleic acids as predictive markers of the severity of pregnancy complications.  
30 © 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### 31 Introducción

32 Hoy en día el diagnóstico prenatal requiere de muestras de  
33 células fetales obtenidas por vías invasivas, como amnio-  
34 centesis y toma de muestras de vellosidad coriónica. Estos  
35 procedimientos invasivos representan un riesgo para la  
36 madre y el feto<sup>1</sup>. Para evitar este riesgo potencial, se han

\* Autor para correspondencia.  
Correo electrónico: payala@javeriana.edu.co  
(P. Ayala-Ramírez).

7 desarrollados métodos de genética para el diagnóstico pre-  
8 natal. Estudios previos han encontrado ácidos nucleicos libres  
9 en el plasma de sujetos normales<sup>2</sup>, en pacientes con cáncer<sup>3</sup>  
10 y mujeres embarazadas<sup>4,5</sup>. Este último proveniente de células  
11 trofoblásticas<sup>6</sup> debido al tráfico celular entre el feto y la  
12 madre<sup>7</sup>. Estos ácidos nucleicos pueden permitir una alterna-  
13 tiva segura y precisa de métodos de diagnóstico no invasivo.  
14 En los últimos años, se ha realizado un gran progreso en esta  
15 área. En particular, los estudios se han encaminado en detec-  
16 tar ADN y ARN del feto, en el plasma materno, además la  
17 utilización de la técnica de PCR en tiempo real (QRT-PCR) ha  
18 permitido detectar niveles muy bajos de estas moléculas<sup>8</sup>.  
19 En este artículo de revisión, hacemos un breve resumen de  
20 los estudios que se han llevado a cabo en esta área y las  
21 ventajas que representa.

## 22 ADN fetal libre en plasma materno

23 A raíz del descubrimiento del paso de células fetales a la  
24 sangre materna<sup>9</sup>, se comenzó a estudiar si además de células  
25 también se podía aislar material genético libre en plasma  
26 materno. En 1948 se publicó la primera evidencia de ácidos  
27 nucleicos en plasma y orina<sup>10</sup>. Este trabajo no fue valorado  
28 por muchos años hasta que otros investigadores encontra-  
29 ron estas moléculas plasmáticas en pacientes con lupus  
30 eritematoso sistémico (LES)<sup>11,12</sup>, artritis reumatoidea<sup>13</sup> y  
31 cáncer<sup>1,14-18</sup>. Todavía se desconoce el mecanismo por el  
32 cual el ADN es liberado al suero y plasma. Ha sido postu-  
33 lado que en LES, las células multinucleadas sensibilizadas  
34 liberan su ADN endógeno aumentando el ADN circulante en  
35 plasma. Adicionalmente, los neutrófilos apoptóticos circulan-  
36 tes podrían contribuir al aumento en los niveles de ADN  
37 de doble cadena libre<sup>19</sup>. Similarmente en malignidad, el ADN  
38 libre en plasma probablemente proviene de la apoptosis de  
39 células cancerígenas y normales. Otra teoría postula que  
40 la destrucción celular debido a la radioterapia podría liberar  
41 el ADN al plasma<sup>20</sup>.

42 En 1997, Lo et al lograron aislar ADN libre circulante en  
43 el plasma de mujeres embarazadas<sup>4</sup>. Estos estudios abrieron  
44 una nueva posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal no  
45 invasivo donde ni el feto ni la madre puedan correr ningún  
46 peligro<sup>21</sup>. El mecanismo por el cual el ADN de origen feto-  
47 placentario es liberado al plasma es desconocido, aunque se  
48 piensa que la muerte celular programada (apoptosis) puede  
49 estar involucrada<sup>22,23</sup>.

50 En los últimos años, se han desarrollado nuevos ensa-  
51 yos para aislar y analizar ADN fetal en plasma materno  
52 obteniéndose un avance rápido en estas áreas<sup>1,24-26</sup>. Exis-  
53 ten varias ventajas al utilizar ADN fetal libre en plasma. La  
54 primera ventaja es que sorprendentemente este se encuen-  
55 tra en muy altas concentraciones durante el embarazo<sup>4,24</sup>.  
56 La alta concentración de ADN fetal en plasma materno  
57 hace del plasma materno una fuente de fácil acceso para  
58 el diagnóstico prenatal no invasivo. En segundo lugar, la  
59 desaparición del ADN fetal libre en circulación materna es  
60 extremadamente rápida. La vida media del ADN fetal libre  
61 se ha determinado en 16,3 min (4-30 min)<sup>27</sup>. Por lo tanto, el  
62 ADN fetal en plasma materno podría ser utilizado como un  
63 marcador en tiempo real para monitorización fisiológica y  
64 patológica tanto del feto como de la madre. Tercero, méto-  
65 dos como la PCR y sus derivados son altamente sensibles

66 para la detección de ADN plasmático libre<sup>4,28</sup>. Cuarto, se  
67 ha demostrado que este ADN puede ser detectado desde  
68 la 5.ª semana de embarazo, lo que lo haría útil en diag-  
69 nóstico de patologías fetales mucho antes de que puedan  
70 ser detectadas por ultrasonido o posterior al nacimiento<sup>24</sup>.  
71 Recientemente se ha utilizado la técnica de reacción en  
72 cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-  
73 PCR) para medir la cantidad de ADN fetal libre en plasma. Es  
74 así como con esta técnica se ha podido determinar el sexo  
75 fetal en mujeres con fetos masculinos, evaluando el gen  
76 *SRY*<sup>1,24,29</sup>, hallazgo de mucha utilidad en el diagnóstico de  
77 las enfermedades ligadas al sexo. Una de las utilidades más  
78 importantes es en la determinación del genotipo Rh D fetal  
79 en mujeres Rh D negativas<sup>30</sup>, esta prueba ya ha sido introdu-  
80 cida como un servicio de rutina por el Servicio Nacional de  
81 Sangre Británico desde 2001<sup>31</sup>. También se ha utilizado en la  
82 detección de polimorfismos en los cromosomas 13, 18 y 21  
83 para el diagnóstico de trisomías<sup>32</sup>, diagnóstico prenatal de  
84 enfermedades autosómicas recesivas (fibrosis quística<sup>33</sup> e  
85 hiperplasia adrenal congénita<sup>34</sup>) y de autosómicas domi-  
86 nantes (distrofia miotónica, acondroplasia y enfermedad de  
87 Huntington)<sup>35-37</sup>. Cabe resaltar que se ha logrado detectar  
88 ADN fetal en el plasma de mujeres que han tenido hijos  
89 varones muchos años después inclusive décadas después del  
90 parto<sup>38</sup>.

91 En los últimos años se han desarrollado varias estrategias  
92 para aislar el ADN fetal en plasma materno para ser utili-  
93 zado como marcador en diagnóstico prenatal no invasivo. Se  
94 ha descubierto que el tamaño del ADN fetal es menor que  
95 el materno<sup>39</sup>. Este descubrimiento ha permitido un mejor  
96 aislamiento del ADN a partir del plasma materno. Por otro  
97 lado, también se ha establecido que existen diferencias en  
98 la metilación del ADN fetal con respecto al ADN de ori-  
99 gen materno. Como es el caso del gen *SERPINB5*, el cual  
100 está hipometilado en la placenta e hipermetilado en células  
101 de sangre materna<sup>40</sup>. Por lo tanto, el *SERPINB5* hipometi-  
102 lado puede utilizarse como un marcador fetal específico en  
103 plasma materno. Debido a que el gen se encuentra en el  
104 cromosoma 18, se ha demostrado que el análisis de la razón  
105 alélica de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en  
106 la forma hipometilada del *SERPINB5* puede ser utilizada como  
107 un marcador en el plasma materno para el diagnóstico de  
108 trisomía 18<sup>41</sup>. También se ha demostrado que diferencias  
109 en los patrones de metilación pueden ser utilizadas para  
110 diagnóstico prenatal no invasivo de trisomía 21 utilizando  
111 plasma materno<sup>42</sup>. Otra aproximación hacia la detección de  
112 aneuploidías es el desarrollo de métodos cuantitativos alta-  
113 mente discriminatorios, los cuales permiten la detección de  
114 secuencias de ADN específicas, incluso si el ADN fetal repre-  
115 senta una proporción baja del ADN total libre circulante.  
116 Lo et al demostraron que la PCR digital es una muy buena  
117 herramienta para este fin<sup>43</sup>. Es importante destacar que el  
118 ADN fetal ha podido ser amplificado y secuenciado con muy  
119 buenos resultados<sup>44-46</sup>.

120 Adicionalmente, se ha observado que en algunas patolo-  
121 gias del embarazo existen anomalías en la concentración de  
122 ADN fetal circulante en plasma. La primera enfermedad que  
123 fue asociada con estas anomalías fue la preeclampsia, donde  
124 se encontró que la concentración de ADN en las gestantes  
125 con preeclampsia estaba incrementada cinco veces en com-  
126 paración con los controles<sup>47</sup>, al parecer por diferencias en  
127 el aclaramiento del ADN fetal circulante plasmático<sup>48</sup>. Otras

Cómo citar este artículo: Ayala-Ramírez F, et al. Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo. *Clin Invest Gin Obst*. 2011. doi:10.1016/j.gine.2011.09.006

128 enfermedades donde se ha visto involucrada la variación  
129 en concentración de ADN son: algunas aneuploidías<sup>19</sup>, parto  
130 pretérmino<sup>20</sup>, hiperémesis gravídica<sup>21</sup> y placenta invasiva<sup>22</sup>.

### 131 ARN fetal libre en plasma materno

132 A partir de la detección de ADN derivado de tumores en  
133 plasma se inició la búsqueda de ARN en el plasma y suero  
134 de pacientes con cáncer<sup>23,24</sup>. Debido a que muchas veces no  
135 es posible determinar el origen del ADN encontrado en el  
136 plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con  
137 el ADN materno, se planteó el interrogante si se podría aislar  
138 ARN de origen feto-placentario en el plasma materno y así  
139 determinar la expresión de genes específicos de la placenta.  
140 Poon et al fueron los primeros en publicar la presencia de  
141 ARN fetal en el plasma de mujeres embarazadas, mediante  
142 la detección de ARNm del gen ZFY que se encuentra en el  
143 cromosoma Y. Las tasas de detección de ARN fetal en plasma  
144 materno al inicio y final de los embarazos fueron 22 y 63%,  
145 respectivamente. La menor tasa de detección de ARN al inicio  
146 del embarazo con respecto a etapas finales sugiere que  
147 la concentración de ARN plasmático fetal es menor en etapas  
148 tempranas del embarazo. Esta observación es similar a  
149 los resultados que indican que la concentración de ADN  
150 fetal en plasma materno se incrementa con el progreso del  
151 embarazo<sup>25</sup>. Al estudiar este ARN se encontró que era mucho  
152 más estable de lo que se pensaba. Tsui et al investigaron esta  
153 aparente paradoja en detalle y reportaron que las moléculas  
154 de ARN de plasma endógeno eran altamente estables a  
155 4°C por 24 horas en comparación con ARN tisular extraído y  
156 purificado<sup>2</sup>. Además al pasar el plasma por filtros de 0,45 µm  
157 se encontraban diferencias estadísticamente significativas  
158 al medir la expresión del ARNm de la subunidad beta de  
159 la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno  
160 placentario humano (hPL) y gliceraldehído-6-fosfato  
161 deshidrogenasa (GAPDH), en comparación con plasma no fil-  
162 trado. Esto sugiere que las moléculas de ARN podrían estar  
163 asociadas a algún tipo de estructura celular o membranal  
164 que lo protege de su degradación<sup>2</sup>. Adicionalmente, demostró  
165 Q3 que los transcritos de ARNm derivados de placenta son  
166 detectables en plasma materno durante el embarazo y des-  
167 aparecen rápidamente después del parto. Estos resultados  
168 demuestran que la placenta es un órgano importante para  
169 liberar ARN fetal en plasma materno. Luego Ng et al demon-  
170 straron que esas moléculas de ARN de plasma de pacientes  
171 con cáncer estaban asociadas con cuerpos apoptóticos que  
172 podrían protegerlo de la degradación de las RNAsas<sup>26,27</sup>, esto  
173 podría dar una explicación a la estabilidad de este ARN. A  
174 pesar de esta aparente estabilidad, estudios demostraron  
175 que la molécula no es un transcrito intacto la cual mostró  
176 una mayor degradación en el extremo 3' comparado con el  
177 extremo 5'<sup>28</sup>.

178 A raíz de estos descubrimientos se empezaron a desarro-  
179 llar diferentes estrategias metodológicas para la evaluación  
180 y la medición de transcritos derivados de placenta. Con el  
181 fin de buscar un marcador de ARN fetal independiente del  
182 género, Ng et al recientemente demostraron que el ARNm  
183 expresado en placenta es fácilmente detectable en plasma  
184 materno, utilizando ARNm codificante para hPL y hCG por  
185 la técnica de QRT-PCR<sup>2</sup>. En 1999, Vogelstein y Kinzler propu-  
186 sieron una técnica innovadora llamada «PCR digital» para

187 cuantificar con una alta precisión una sola molécula de  
188 ARN<sup>29</sup>. Esta nueva técnica se ha utilizado para estudios en  
189 pacientes con cáncer de ovario<sup>30</sup> y trisomía 21 fetal<sup>31</sup>.

190 En el 2004 Tsui et al compararon los perfiles de expresión  
191 génica entre los tejidos de la placenta y de sangre periférica  
192 correspondiente de las mujeres embarazadas en su primer  
193 y tercer trimestre, por análisis de microarray<sup>31</sup>. Esta es una  
194 técnica de análisis de ARN plasmático que puede represen-  
195 tar una nueva herramienta para el análisis no invasivo de  
196 perfiles fetales de expresión génica. Los resultados obteni-  
197 dos de los estudios de ARN fetal en plasma materno a  
198 través de la técnica de microarrays son claves para esco-  
199 ger los transcritos a ser estudiados en diversas patologías  
200 del embarazo.

201 El estudio del ARN fetal circulante en plasma materno  
202 se ha encaminado al desarrollo de estrategias para el diag-  
203 nóstico prenatal de patologías como preeclampsia y algunas  
204 aneuploidías<sup>32</sup>. Se espera que se desarrollen nuevos marca-  
205 dores que permitan acercarnos cada vez más a establecer  
206 un diagnóstico prenatal no invasivo utilizando marcadores  
207 de ARNm.

### 208 ARN de origen feto-placentario en plasma 209 materno en el diagnóstico prenatal de 210 patologías fetales

211 Para desarrollar marcadores para diagnóstico prenatal de  
212 trisomía 21 se estudió el gen LOC90625 el cual se encuen-  
213 tra en el cromosoma 21 y se detecta en un 100% cuando  
214 se trabaja con 1600 µl de plasma en el primer trimestre,  
215 por lo tanto puede ser utilizado como marcador para diag-  
216 nóstico prenatal de síndrome de Down<sup>33</sup>. Adicionalmente,  
217 se ha estudiado si las concentraciones de ARNm en plasma  
218 podrían ser un marcador para trisomías. Por este motivo  
219 Ng et al realizaron un estudio en donde se evaluaron los  
220 niveles de ARNm de la hCG en mujeres con fetos con tri-  
221 somía 18 y 21 durante el primer trimestre del embarazo.  
222 Los resultados mostraron que había diferencias estadística-  
223 mente significativas entre las concentraciones de ARNm  
224 en plasma de mujeres con trisomía 18 y controles ( $p < 0,05$ ),  
225 con concentraciones 9,4 veces menores en mujeres con fetos  
226 con trisomía 18<sup>34</sup>. Por lo tanto, las concentraciones de ARNm  
227 varían en algunas patologías y podrían servir como marca-  
228 dores para un diagnóstico prenatal no invasivo o inclusive  
229 como factores predictores de la ocurrencia y severidad de  
230 enfermedades del embarazo (tabla 1).

231 Una estrategia que se desarrolló recientemente es la  
232 determinación de la razón alélica para diagnóstico de algu-  
233 nas aneuploidías. Esta estrategia es llamada aproximación  
234 de la «razón alélica de un SNP de ARN» y se realiza con  
235 espectrometría de masas; los resultados han mostrado una  
236 alta sensibilidad y especificidad estudiando el gen *PLAC4* en  
237 pacientes con fetos con trisomía 21<sup>34,35</sup> y el gen *SERPINB2*  
238 en trisomía 18<sup>36</sup>. La limitación que tiene esta técnica es  
239 que únicamente se pueden analizar fetos heterocigotos para  
240 el SNP analizado. Para eliminar esta limitación se deberían  
241 analizar múltiples SNP.

242 Adicionalmente, Alcelli et al estudiaron la expresión  
243 de genes involucrados en el desarrollo anormal del cora-  
244 zón encontrando diferencias estadísticamente significativas  
245 entre los niveles encontrados en plasma de mujeres con

Cómo citar este artículo: Ayala-Ramírez F, et al. Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo. *Clin Invest Gin Obst*. 2011. doi:10.1016/j.gine.2011.09.006



Tabla 1 Estudios que reportan el uso de mRNA circulante derivado de placenta para estudio de aneuploidías y complicaciones del embarazo

| ESTUDIO                        | EDAD DE GESTACIÓN (semanas) | GENES ESTUDIADOS                                     | ENFERMEDAD ESTUDIADA     | TÉCNICA  | RESULTADO   |
|--------------------------------|-----------------------------|--|--------------------------|--|---|
| <b>ANEUPLOIDÍAS</b>            |                             |  |                          |  |   |
| Tsui et al. 2010               | Media: 12,9                 | <i>PLAC4</i>   | Trisomía 21              | Espectrometría de masas y PCR <sup>a</sup> digital | Sensibilidad diagnóstica del 100% y especificidad diagnóstica del 89,7%   |
| Arcelli et al. 2010.           | Rango: 20-22                | Genes involucrados en desarrollo anormal del corazón | Cardiopatías congénitas  | Microarray y QRT-PCR                               | Sensibilidad diagnóstica del 42% y especificidad diagnóstica del 95%. Con una tasa de falsos positivos del 10%                            |
| Tsui et al. 2009               | Media: 15                   | <i>SERPINB2</i>                                      | Trisomía 18              | Espectrometría de masas                            | Detección de trisomía 18 en todos los casos   |
| Lo et al. 2007                 | Media: 14,7                 | <i>PLAC4</i>   | Trisomía 21              | Espectrometría de masas                            | Sensibilidad diagnóstica del 90% y especificidad diagnóstica del 96,5%  |
| Ng et al. 2004                 | Media 12,5                  | <i>βhCG</i>  | Trisomía 18 y 21         | QRT-PCR  | Niveles más bajos en trisomía 18, con diferencias estadísticamente significativas   |
| Oudejans et al. 2003           | Rango: 9-13                 | <i>LOC90625, PTTG1P, DSCR4</i>                       | Trisomía 21              | RT-PCR <sup>b</sup><br>Secuenciación               | Detección <i>LOC90625</i> en 100% de las muestras utilizando 1.600 μl de plasma   |
| <b>PATOLOGÍAS DEL EMBARAZO</b> |                             |  |                          |  |   |
| Pang et al. 2005               | Rango: 16-40                | <i>CSH1, GH2, KISS1, and ADAM12</i>                  | RCIU                     | QRT-PCR  | GH2 correlacionado con peso al nacimiento y medidas biométricas y ADAM12 con gestantes con RCIU y preeclampsia                            |
| Masuzaki et al. 2005           | 37 <sup>c</sup>             | <i>βhCG, hPL, GAPDH</i>                              | Placenta previa-percreta | QRT-PCR  | Marcadores sensibles para monitorear apoptosis en la placenta y anomalías en la invasión del trofoblasto                                  |
| Purwosunu et al. 2009          | Rango: 15-20                | Panel de mRNAs                                       | Preeclampsia             | QRT-PCR  | Incremento de los niveles de FLT1, VEGFA, endoglin, PLAT, SERPINE1, PLAC1, y SELP son buenos predictores de la ocurrencia de preeclampsia |
| Shimizu et al. 2009            | Rango 15-20                 | <i>PP13</i>  | Preeclampsia             | QRT-PCR  | Buen marcador para predecir preeclampsia  |
| Purwosunu et al. 2007          | Media: 39                   | <i>PAI-1 y tPA</i>                                   | Preeclampsia             | QRT-PCR  | Los niveles de PAI-1 y tPA se encuentran aumentados con diferencias estadísticamente significativas                                       |
| Farina et al. 2006             | Media: 32                   | Panel de RNAm  | Preeclampsia             | QRT-PCR  | Diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles   |
| Ng et al. 2003                 | Media: 37                   | <i>CRH</i>   | Preeclampsia             | QRT-PCR  | CRH buen marcador de preeclampsia con diferencias estadísticamente significativas   |

<sup>a</sup> Reacción en cadena de la polimerasa.<sup>b</sup> PCR en tiempo real.<sup>c</sup> Se tomaron muestras antes y después de las cirugías que se realizaron en la semana 37 y 75 días después.

246 fetos diagnosticados con cardiopatías congénitas compara- 303  
247 dos con controles normales<sup>67</sup>.

### 248 ARN de origen feto-placentario en plasma 304 249 materno en complicaciones del embarazo 305

250 También se han reportado diferencias en los niveles de ARN 306  
251 fetal en plasma materno en complicaciones del embarazo 307  
252 como placenta previa, restricción de crecimiento intrauteri- 308  
253 no (RCIU) y preeclampsia. 309

254 Debido a estudios realizados en preeclampsia con ADN 310  
255 fetal plasmático, se pensó que el ARNm también podría estar 311  
256 involucrado en esta patología. Por este motivo, Ng et al 312  
257 estudiaron la expresión del gen de la hormona liberadora 313  
258 de corticotropina (CRH) en mujeres con preeclampsia en el 314  
259 tercer trimestre. Se encontró que la expresión de CRH se 315  
260 encontraba disminuida en mujeres con preeclampsia compa- 316  
261 rado con los controles<sup>68</sup>. En el 2006, Farina et al<sup>69</sup> estudiaron 317  
262 la expresión de un panel de ARNm y encontraron diferencias 318  
263 estadísticamente significativas en comparación con los con- 319  
264 troles en los transcritos de hPL, inhibina A, KISS-1, proteína 320  
265 plasmática asociada a embarazo (PAPP-A), inhibidor del acti- 321  
266 vador de plasminógeno-1 (PAI-1), selectina-P y receptor del 322  
267 factor del crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y a raíz 323  
268 de estos resultados se analizó si era posible predecir la pree- 324  
269 clampsia en mujeres asintomáticas midiendo la expresión 325  
270 de la proteína placentaria 13 (PP13), dando como resultado 326  
271 diferencias estadísticamente significativas entre mujeres 327  
272 asintomáticas que desarrollaron preeclampsia y controles 328  
273 sanos<sup>70</sup>. Adicionalmente, se han estudiado los genes involu- 329  
274 crados en la coagulación activador de plasminógeno tisular 330  
275 (tPA) y PAI-1, y se encontró que su expresión está signifi- 331  
276 cativamente incrementada en pacientes con preeclampsia 332  
277 ( $p < 0,0001$ )<sup>71</sup>. Purwosunu et al (2009) evaluaron los nive- 333  
278 les de ARNm de PAI-1, tPA, factor de crecimiento endotelial 334  
279 vascular, receptor 1 del factor de crecimiento endotelial 335  
280 vascular, endoglin, gen específico de placenta-1 y selec- 336  
281 tina P en mujeres con y sin preeclampsia. Se encontró que 337  
282 la expresión de todos los genes evaluados estaba aumentada 338  
283 en el plasma de pacientes con preeclampsia y la expresión 339  
284 génica de todos los genes evaluados se correlacionó posi- 340  
285 tivamente con la severidad de la enfermedad<sup>72</sup>.

286 Adicionalmente, en RCIU se ha reportado que la concen- 341  
287 tración de ARNm de la hormona del crecimiento (GHZ) se 342  
288 correlaciona de manera estadísticamente significativa con 343  
289 el peso al nacer y las medidas biométricas fetales. Además, 344  
290 la concentración de ARNm de ADAM12 se encontró aumen- 345  
291 tada en gestantes con RCIU y preeclampsia con diferencias 346  
292 estadísticamente significativas comparado con las pacientes 347  
293 normales<sup>73</sup>.

294 Masuzaki et al encontraron que los niveles de ARNm de los 348  
295 genes  $\beta$ hCG y hPL disminuyen y aumentan, respectivamente, 349  
296 en pacientes con placenta previa<sup>74</sup>.

### 297 Discusión 350

298 El estudio de los ácidos nucleicos fetales libres circulan- 351  
299 tes en el plasma materno abre nuevas posibilidades para 352  
300 estrategias en la detección de condiciones fetales que 353  
301 predispongan a enfermedad, diagnóstico prenatal no inva- 354  
302 sivo, determinación de riesgo para sufrir complicaciones del

embarazo y severidad de la patología. También muy impor- 303  
304 tante es el impacto que ha tenido en la generación de 305  
306 conocimiento sobre la fisiología de la placenta y la regula- 307  
308 ción de la unidad madre-feto-placenta, es probable que este 309  
310 conocimiento derive en nuevas estrategias en la prevención, 311  
312 diagnóstico, pronóstico y tratamiento de patologías fetales 313  
314 y del embarazo. Finalmente, cabe resaltar que el estudio 315  
316 de ARN fetal libre en plasma materno tiene la ventaja de 317  
318 poder determinar perfiles de expresión génica mientras que 319  
320 el análisis de ADN fetal libre en plasma materno tiene la 321  
322 ventaja de poder evaluar epigenéticamente al feto. 323

### 314 Conflicto de intereses 315

316 Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses. Q4 317

### 318 Bibliografía 319

- 317 1. Brandenburg H, Jahoda MGJ, Pijpers L, Reuss A, Kleyer WJ, 318  
319 Wladimiroff JW. Fetal loss rate after chorionic villus sam- 320  
321 pling and subsequent amniocentesis. *Am J Med Genet.* 322  
323 1990;35:178-80.
- 324 2. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of Endogenous and Added 325  
326 RNA in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clin Chem.* 327  
328 2002;48:1647-53.
- 329 3. Leon S, Shapiro B, Sklaroff D, Yaros M. Free DNA in the serum 330  
331 of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res Mar.* 332  
333 1977;37:646-50.
- 334 4. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman 335  
336 CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. 337  
338 *Lancet.* 1997;350:485-7.
- 339 5. Leo LM, Poon, Circulating Fetal RNA in Maternal Plasma. *Ann N* 340  
341 *Y Acad Sci.* 2001;945:207-10.
- 342 6. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel-Hadi M, Abdel-Fattah S, 343  
344 Arent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic 345  
346 pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. 347  
348 *Prenat Diagn.* 2007;27:415-8.
- 349 7. Diana WB. Fetomaternal cell trafficking: A new cause of 350  
351 disease? *Am J Med Genet.* 2000;91:22-8.
- 352 8. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, et al. 353  
354 mRNA of placental origin is readily detectable in maternal 355  
356 plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4748-53.
- 357 9. Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen ueber- 358  
359 Puberteklampsie. En: Vogel, ed. Leipzig; 1893. 360
- 361 10. P M, P M.:1; Acides nucleiques du plasma sanguin chez 362  
363 l'homme. *C R Acad Sci.* Vol 142. Paris1948:241-243. 364
- 365 11. EM T, PH S, RI C. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies 366  
367 to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythema- 368  
369 tosus. *J Clin Invest.* 1966;45:1732-40. Q3 370
- 371 12. Harbeck R, Hoffmann A, Carr R. Studies on the nature of circula- 372  
373 ting DNA in systemic lupus erythematosus (SLE). *J Rheumatol.* 374  
375 1975;2:194-203. 376
- 377 13. Lindstedt G, Lundberg P, Ivarsson S, Lindberg J. Circulating 378  
379 heat-labile DNA binder(s) in chronic active hepatitis and rheu- 380  
381 matoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 1975;62:183-5. 382
- 383 14. Sorenson G, Pribish D, Valone F, Memoli V, Bzik D, Yao S. 384  
385 Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy 386  
387 genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 388  
389 1994;3:67-71. 390
- 391 15. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun 392  
393 M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of 394  
395 patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous 396  
397 leukaemia. *Br J Haematol Apr.* 1994;86:774-9. 398

Cómo citar este artículo: Ayala-Ramírez P, et al. Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo. *Clin Invest Gin Obst.* 2011. doi:10.1016/j.gine.2011.09.006

- 362 16. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, et al. K-ras mutations are found  
363 in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal  
364 cancer. *Gastroenterology*. 1997;112:1114-20.
- 365 17. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautze J,  
366 et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung  
367 cancer patients. *Nat Med*. 1996;2:1033-5.
- 368 18. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite  
369 alterations in serum DNA of head and neck cancer patients.  
370 *Nat Med*. 1996;2:1035-7.
- 371 19. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J,  
372 Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): A  
373 potential prognostic marker for posttraumatic development  
374 of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*. 2008;30:  
375 352-8, 3.
- 376 20. Lee T, Montalvo L, Chrebtow V, Busch M. Quantitation of genomic  
377 DNA in plasma and serum samples: higher concentrations  
378 of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*.  
379 2001;41:276-82.
- 380 21. Bianchi D. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for  
381 prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999;105:574-83.
- 382 22. van Wijk LJ, de Hoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, Mulders  
383 MA, et al. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of  
384 pregnant women. *Clin Chem*. 2000;46:729-31.
- 385 23. van Wijk LJ, de Hoon AC, Griffioen S, Mulders MA, Tjoa ML,  
386 van Vugt JM, et al. Identification of triploid trophoblast cells in  
387 peripheral blood of a woman with a partial hydatidiform molar  
388 pregnancy. *Prenat Diagn*. 2001;21:1142-5.
- 389 24. Lo YM, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PW, et al.  
390 Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and  
391 Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet*.  
392 1998;62:768-75.
- 393 25. Smid M, Lagona F, De Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L.  
394 Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis  
395 from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin Chem*.  
396 1999;45:1570-2.
- 397 26. Zhong X, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D  
398 and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex  
399 polymerase chain reaction. *BJOG*. 2000;107:766-9.
- 400 27. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM.  
401 Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *Am J Hum Genet*.  
402 1999;64:218-24.
- 403 28. Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I,  
404 et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA  
405 from the maternal circulation. *Prenat Diagn*. 1995;15:641-6.
- 406 29. Martinhago CD. Accuracy of fetal gender determination in  
407 maternal plasma at 5 and 6 weeks of pregnancy. *Prenat Diagn*.  
408 2006;26:1219-23.
- 409 30. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackerzie IZ, Chamberlain P,  
410 Gilmer MD, et al. Prenatal determination of fetal rhesus D status  
411 by DNA amplification of peripheral blood of rhesus-negative  
412 mothers. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;731:229-36.
- 413 31. Finning K, Martin P, Soothill P, Arent N. Prediction of fetal D status  
414 from maternal plasma: introduction of a new noninvasive  
415 fetal RHD genotyping service. *Transfusion*. 2002;42:1079-85.
- 416 32. Lo Y. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic  
417 applications. *Clin Chem*. 2000;46:1903-6.
- 418 33. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez  
419 de Alba M, Lora-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al. Prenatal  
420 detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from  
421 maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2002;22:946-8.
- 422 34. Chiu R, Lau T, Cheung P, Gong Z, Leung T, Lo Y. Noninvasive  
423 prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia  
424 by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem*.  
425 2002;48:778-80.
- 426 35. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal  
427 diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from  
428 maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46:301-2.
- 429 36. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaiharu T. Prenatal  
430 DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal  
431 plasma. *Lancet*. 2000;356:1170.
- 432 37. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M,  
433 García-Hoyos M, Lora-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al.  
434 Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal  
435 plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn*. 2003;23:232-4.
- 436 38. Invernizzi P, Battezzati P, Podda M, Simoni G. Presence of fetal  
437 DNA in maternal plasma decades after pregnancy: further comments.  
438 *Hum Genet*. 2002;111, 576-576.
- 439 39. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size  
440 Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma.  
441 *Clin Chem*. 2004;50:88-92.
- 442 40. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY,  
443 et al. Detection of the placental epigenetic signature of the  
444 maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*.  
445 2005;102:14753-8.
- 446 41. Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY,  
447 et al. Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Trisomy 18  
448 by Epigenetic Allelic Ratio Analysis in Maternal Plasma:  
449 Theoretical and Empirical Considerations. *Clin Chem*.  
450 2006;52:2194-202.
- 451 42. Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, et al.  
452 Systematic Search for Placental DNA-Methylation Markers on  
453 Chromosome 21: Toward a Maternal Plasma-Based Epigenetic  
454 Test for Fetal Trisomy 21. *Clin Chem*. 2008;54:500-11.
- 455 43. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, et al.  
456 Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal  
457 aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13116-21.
- 458 44. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al.  
459 Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneu-  
460 ploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in  
461 maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:20458-63.
- 462 45. Fan H, Blumenfeld Y, Chitkara U, Hudgins L, Quake S. Noninvasive  
463 diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing  
464 DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*.  
465 2008;105:16266-71.
- 466 46. Korshunova Y, Maloney RK, Lahey N, Citek RW, Bacher B, Budiman  
467 A, et al. Massively parallel bisulphite pyrosequencing  
468 reveals the molecular complexity of breast cancer-associated  
469 cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum  
470 DNA. *Genome Res*. 2008;18:19-29.
- 471 47. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, et al.  
472 Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in  
473 preeclampsia. *Clin Chem*. 1999;45:184-8.
- 474 48. Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, et al.  
475 Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in pre-  
476 eclampsia. *Clin Chem*. 2002;48:2141-6.
- 477 49. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, et al.  
478 Increased Fetal DNA Concentrations in the Plasma of Preg-  
479 nant Women Carrying Fetuses with Trisomy 21. *Clin Chem* 45.  
480 1999;17:47-51.
- 481 50. Leung T, Zhang J, Lau T, Hjelm N, Lo Y. Maternal plasma fetal  
482 DNA as a marker for preterm labour. *Lancet*. 1998;352:1904-5.
- 483 51. Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S,  
484 et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with  
485 hyperemesis gravidarum. *Clin Chem*. 2001;47:2164-5.
- 486 52. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y,  
487 et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women  
488 with invasive placenta. *Clin Chem*. 2002;48:353-4.
- 489 53. Koprski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of Tumor  
490 Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma.  
491 *Clin Cancer Res*. 1999;5:1961-5.
- 492 54. Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al.  
493 Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in  
494 plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*.  
495 1999;59:1188-91.

Cómo citar este artículo: Ayala-Ramírez F, et al. Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo. *Clin Invest Gin Obst*. 2011. doi:10.1016/j.gine.2011.09.006

- 486 55. Poon L, Leung T, Lau T, Lo Y. Presence of fetal RNA in maternal  
487 plasma. *Clin Chem*. 2000;46:1832-4.
- 488 56. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, et al.  
489 Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma  
490 of Cancer Patients and Healthy Individuals. *Clin Chem*.  
491 2002;48:1212-7.
- 492 57. Hasselmann D, Rappil G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular  
493 tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from  
494 degradation in human serum. *Clin Chem*. 2001;47:1488-9.
- 495 58. Wong BC, Chiu RW, Tsui NB, Chan KC, Chan BW, Lau TK, et al.  
496 Circulating Placental RNA in Maternal Plasma Is Associated  
497 with a Preponderance of 5' mRNA Fragments: Implications  
498 for Noninvasive Prenatal Diagnosis and Monitoring. *Clin Chem*.  
499 2005;51:1786-95.
- 500 Q8 59. Vogelstein B, Kinzler K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:  
501 9236-41.
- 502 60. Chang H, Ali S, Cho S, Karman R, Shih I. Detection of allelic  
503 imbalance in ascitic supernatant by digital single nucleotide  
504 polymorphism analysis. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2580-5.
- 505 61. Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, et al. Sys-  
506 tematic micro-array based identification of placental mRNA in  
507 maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expres-  
508 sion profiling. *J Med Genet*. 2004;41:461-7.
- 509 62. Ng EK, El-Sheikhah A, Chiu RW, Chan KC, Hogg M, Bindra R,  
510 et al. Evaluation of Human Chorionic Gonadotropin (beta)-  
511 Subunit mRNA Concentrations in Maternal Serum in Aneuploid  
512 Pregnancies: A Feasibility Study. *Clin Chem*. 2004;50:1055-7.
- 513 63. Oudejans CB, Go AT, Visser A, Mulders MA, Westerman BA,  
514 Blankenstein MA, et al. Detection of Chromosome 21-encoded  
515 mRNA of Placental Origin in Maternal Plasma. *Clin Chem*.  
516 2003;49:1445-9.
- 517 64. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, et al.  
518 Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal  
519 chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med*. 2007;13:218-23.
- 520 65. Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, Chow KC, Leung TY, Lau TK, et al.  
521 Synergy of Total PLAC4 RNA Concentration and Measurement  
522 of the RNA Single-Nucleotide Polymorphism Allelic Ratio for  
523 the Noninvasive Prenatal Detection of Trisomy 21. *Clin Chem*.  
524 2010;56:73-81.
- 525 66. Tsui NB, Wong BCK, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM.  
526 Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP  
527 allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINE2 mRNA: a  
528 feasibility study. *Prenat Diagn*. 2009;29:1031-7.
- 529 67. Arcelli D, Farina A, Cappuzzello C, Bresin A, De Sanctis P,  
530 Perolo A, et al. Identification of circulating placental mRNA  
531 in maternal blood of pregnancies affected with fetal congeni-  
532 tal heart diseases at the second trimester of pregnancy:  
533 implications for early molecular screening. *Prenat Diagn*. 2010  
534 Mar;30:229-34, on line.
- 535 Q9 68. Ng EK, Leung T, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, et al. The  
536 Concentration of Circulating Corticotropin-releasing Hormone  
537 mRNA in Maternal Plasma Is Increased in Preeclampsia. *Clin*  
538 *Chem*. 2003;49:727-31.
- 539 69. Farina A, Sekizawa A, Purwosunu Y, Rizzo N, Banzola I, Concu M,  
540 et al. Quantitative distribution of a panel of circulat-  
541 ing mRNA in preeclampsia versus controls. *Prenat Diagn*.  
542 2006;26:1115-20.
- 543 70. Shimizu H, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nakamura M, Farina A,  
544 Rizzo N, et al. PP13 mRNA expression in the cellular component  
545 of maternal blood as a marker for preeclampsia. *Prenat Diagn*.  
546 2009;29:1231-6.
- 547 71. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N,  
548 Wikijosoaitro GH, et al. Cell-free mRNA concentrations of  
549 plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen  
550 activator are increased in the plasma of pregnant women with  
551 preeclampsia. *Clin Chem*. 2007;53:399-404.
- 552 72. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okazaki S, Farina A, Wibowo N,  
553 Nakamura M, et al. Prediction of preeclampsia by analysis  
554 of cell-free messenger RNA in maternal plasma. *Am J Obstet*  
555 *Gynecol*. 2009;200, 386.e381-7.
- 556 73. Pang WW, Tsui MH, Sahota D, Leung TY, Lau TK, Lo YM, et al. A  
557 strategy for identifying circulating placental RNA markers for  
558 fetal growth assessment. *Prenat Diagn*. 2009;29:495-504.
- 559 74. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Miura S,  
560 Yoshimura S, et al. Placental mRNA in maternal plasma and  
561 its clinical application to the evaluation of placental status in  
562 a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem*.  
563 2005;51:923-5.