

**POLIMORFISMOS  
GENETICOS ASOCIADOS  
A PRE ECLAMPSIA**

**TESIS DOCTORAL**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
QUIRÚRGICAS**

**TRABAJO DE JUSTIFICACIÓN PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTOR  
REALIZADA POR:**

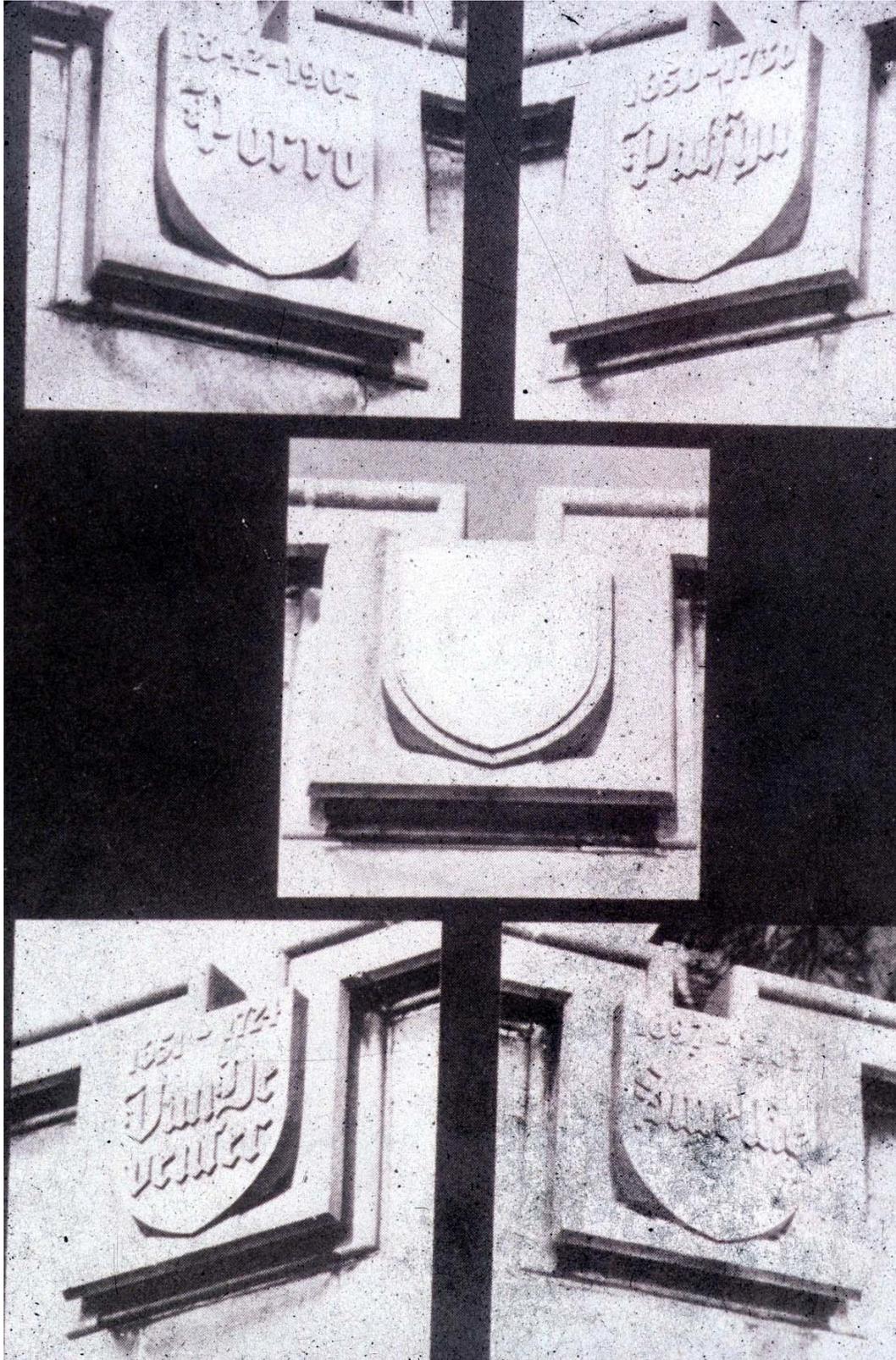
**INGRID CAROLINA BAQUERO MEJÍA**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A  
PRE-ECLAMPSIA**

**Directores: Francisco Leyva Cobián y José Ramón de Miguel  
Sesmero**

**Tutor: Francisco Javier Llorca**

**Santander, 2012**



En el frontifcio de la Universidad de Chicago, están estos cinco escudos, mandados a ubicar ahí por el Dr. Joseph Delee. En ellos figuran los nombres de obstetras que contribuyeron al desarrollo de esta rama de la medicina, pero uno de ellos quedó en blanco para poder escribir el nombre de la persona que esclarezca la etiología de la pre eclampsia.

## **INDICE**

### **AGRADECIMIENTOS**

### **ABREVIATURAS UTILIZADAS**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

<b><u>1. Estado actual del conocimiento sobre pre-eclampsia.</u></b>	1
1.1. Pre-eclampsia y eclampsia	1
1.1.1. Concepto, antecedentes históricos y clasificación	1
1.1.2. Epidemiología	3
1.1.2.1. Incidencia y prevalencia	3
1.1.3. Factores predisponentes al desarrollo de la pre-eclampsia	4
1.1.4. Aspectos clínicos y diagnósticos de la pre-eclampsia	5
1.1.4.1. Presentación clínica	5
1.1.4.2. El síndrome HELLP	7
1.1.5. Efectos de la pre-eclampsia sobre el feto y valoración del bienestar fetal	7
<b><u>2. Aspectos fisiológicos e inmunológicos de la placenta</u></b>	8
2.1. Fisiología del embarazo y de la placentación	8
2.2. Decidualización	9
2.3. La placenta como un órgano inmunológico	10
2.4. Tolerancia materna fetal	11
<b><u>3. La pre-eclampsia como alteración inmunológica: Inmunopatogenia</u></b>	12
3.1. Homeostasis inmunológica: Inmunidad innata y adquirida	12
3.1.1. Balance TH1/TH2	13
3.2. Alteraciones de la placentación e isquemia placentaria	14
3.2.1. Mala adaptación inmunológica	14
3.2.2. Isquemia placentaria	15
3.2.3. Estrés oxidativo y metabolismo lipídico	15
3.3. Disfunción endotelial sistémica	19
<b><u>4. Polimorfismos genéticos</u></b>	21
4.1. Conceptos y definiciones	21
4.2. Genes asociados a pre-eclampsia.	22
4.3. Otros genes candidatos de asociación con pre-eclampsia	28
4.3.1. Posibles nuevos genes candidatos a ser asociados con pre-eclampsia.	28
4.3.2. Aspectos genéticos, bioquímicos y moleculares de los polimorfismos a estudiar.	31
4.3.2.1. Catecol-O-metiltransferasa (COMT)	31
4.3.2.2. Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	34
4.3.2.3. Metaloproteinasa de la matriz extracelular (MMP-9)	35
4.3.2.4. Antígeno leucocitario humano G (HLA-G)	42
<b><u>5. Modelos experimentales de pre-eclampsia</u></b>	46

#### **II. HIPOTESIS**

#### **III. OBJETIVOS**

#### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

<b><u>1. Diseño del estudio. Población de estudio y controles</u></b>	50
<b><u>2. Obtención y manipulación de muestras de sangre circulante</u></b>	50
<b><u>3. Extracción y aislamiento del DNA</u></b>	50
<b><u>4. Reactivos químicos y tampones</u></b>	51
<b><u>5. Selección de variantes genéticas de estudio: cebadores y endonucleasas de restricción</u></b>	51
<b><u>6. Método de genotipado: SNP</u></b>	52
6.1. Amplificación de los productos purificados mediante PCR- RFLP	52

<u>7. Análisis estadístico de los datos</u>	53
7.1. Estadística descriptiva	53
7.2. Análisis estadísticos	53
<b>V. RESULTADOS</b>	55
<u>1. Descripción de las poblaciones consideradas</u>	55
<u>2. Variables clínicas y factores de riesgo</u>	56
<u>3. Polimorfismos genéticos en pre-eclampsia</u>	60
3.1. Metaloproteinasa 9 de la matriz extracelular (MMP-9)	60
3.2. Catecolmetiltransferasa (COMT)	64
3.3. Antígeno de histocompatibilidad humana G (HLA-G)	67
3.4. Metil-tetra-hidrofolato-reductasa (MTHFR)	70
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	73
<b>VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	84
<b>VIII. ANEXOS</b>	86
<b>ANEXO 1. Revisión metodológica suplementaria</b>	86
1.1. Técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos	86
1.2. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	86
1.2.1. Introducción	86
1.2.2. Componentes y optimización de la PCR	87
1.2.3. Electroforesis	89
1.2.4. Detección del DNA	91
<b>ANEXO 2. Análisis estadístico de los datos</b>	92
2.1. Tests no paramétricos utilizados en el estudio	92
2.1.1. Test del <i>chi</i> cuadrado ( $\chi^2$ )	92
2.1.2. Test de Fisher	92
2.1.3. Frecuencias fenotípicas, genotípicas y alelicas. Fórmulas para su cálculo	92
2.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg	94
2.3. Estudios de asociación	94
2.4. Análisis de polimorfismos y haplotipos	95
2.5. Desequilibrio de ligamiento y haplotipos	96
<b>ANEXO 3. Base de datos del estudio</b>	98
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	111

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración de todas las gestantes (pacientes y controles) que de forma altruista aceptaron ser partícipes de este estudio. Agradezco también a los doctores Francisco Leyva Cobián y José Ramón De Miguel Sesmero, directores de esta tesis y al Dr. Francisco Javier Llorca tutor de la misma por su orientación e instrucción durante todo el proceso de este trabajo.

A todos los miembros del Servicio de Inmunología del HUMV que me proporcionaron todas las facilidades necesarias para realizar el proyecto. Igualmente a todos los servicios médicos, centros de salud, matronas y áreas de recogida de muestras del Servicio Cántabro de Salud, que desinteresadamente colaboraron para hacer posible la realización de esta tesis.

A Carlos José, porque sin su apoyo incondicional nada de esto hubiese sido posible.

A mis padres, a mis hermanos y a mis abuelos, ya que a pesar de la distancia que nos ha separado sentía su presencia y apoyo en todo momento. Gracias por la confianza que siempre han tenido en mí.

Finalmente doy gracias a Dios porque me ha permitido permanecer fiel a Él, porque cada día ha podido ser gracias a su presencia en mi vida.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

### A

**A:** *Adenine* (adenina)  
**ACE-1:** *Angiotensin-Converting-Enzyme-1* (enzima convertora de la angiotensina-1)  
**ACEI:** *ACE Inhibitor* (inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina)  
**ADMA:** *Asymmetric Di Methyl Arginine* (dimetil-arginina asimétrica)  
**AGT:** *Angiotensinogen* (angiotensinógeno)  
**AGTR:** *Angiotensin II Receptor type 1* (receptor de angiotensina II tipo 1)  
**AT1:** *Angiotensin II Receptor type 1* (receptor de angiotensina II tipo 1). Ver AGTR

### B

**bp:** *Base Pair* (par de bases)  
**BSA:** *Bovine Serum Albumin* (albúmina sérica bovina)

### C

**C:** *Cytosine* (citosina)  
**CI:** *Confidence Interval* (intervalo de confianza)  
**COMT:** *Catechol-O-Methyl Transferase* (catecol-O-metiltransferasa)  
**COX2:** *CycloOXygenase-2* (ciclo-oxigenasa-2)  
**CNS:** *Central Nervous System* (sistema nervioso central)  
**CYP1A1:** *Cytochrome P450 1A1* (citocromo P450 1A1)  
**CYP1A2:** *Cytochrome P450 1A2* (citocromo P450 1A2)  
**CYP1B1:** *Cytochrome P450 1B1* (citocromo P450 1B1)

### D

**DM:** *Diabetes mellitus* (diabetes mellitas)  
**DNA:** *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)  
**dNTP:** *Deoxyribonucleotide Tri Phosphate* (desoxirribonucleótido trifosfato)

### E

**EAE:** *Experimental Autoimmune Encephomyelitis* (encefalitis autoinmunitaria experimental)  
**ECM:** *Extra Cellular Matrix* (matriz extracelular)  
**E. coli:** *Escherichia coli*  
**EDTA:** *Ethylene Diamine Tetracetic Acid* (ácido etilen-diamino-tetra-acético)  
**EGF:** *Epidermal Growth Factor* (factor de crecimiento epidérmico)  
**eNOS:** *Endothelial NOS* (óxido nítrico sintetasa endotelial)  
**EtBr:** *Ethidium bromide* (bromuro de etidio)  
**EVT:** *Extravillous Trophoblast* (trofoblasto extraveloso)

### G

**G:** *Guanine* (guanina)  
**GGT:** *Gamma-Glutamyl-transpeptidase* (gamma-glutamyl-transpeptidasa)  
**GM-CSF:** *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)  
**GOT:** *Glutamic-Oxalacetic-Transaminase* (glutámico-oxalacético-transaminasa)  
**GPT:** *Glutamic-Pyruvic Transaminase* (glutámico-pirúvico-transaminasa)  
**GPIIb/IIIa:** *Glycoprotein GPIIb/GPIIIa* (glicoproteína IIb/IIIa)  
**GST:** *Glutathione-S-Transferase* (glutathione-S-transferasa)

### H

**HELLP:** *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count syndrome* (síndrome de hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombopenia)  
**HIF:** *Hypoxia Inducible Factor* (factor inducido por la hipoxia)  
**HLA:** *Human Leukocyte Antigen* (antígeno leucocitario humano)  
**HTA:** Hipertensión arterial  
**HUMV:** Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla”

### I

**Ig:** *Immunoglobulin* (inmunoglobulina)  
**IL:** *Interleukin* (interleucina).  
**INF:** *Interferon* (interferón)  
**iNOS:** *Inducible NOS* (óxido nítrico-sintetasa inducible)  
**IU:** *Internacional Unit* (Unidad internacional)  
**IUD:** *Intrauterine Device* (dispositivo intrauterino)

### K

**KO:** *Knock Out* (noqueado)

## L

**LD:** *Linkage Disequilibrium* (desequilibrio de ligamiento)  
**LDH:** *Lactate DeHydrogenase* (láctico-deshidrogenasa)  
**LDL:** *Low Density Lipoprotein* (lipoproteína de baja densidad)  
**LIF:** *Leukemia Inhibitory Factor* (factor inhibidor de leucemia)  
**LPS:** *Lipopolysaccharide* (lipopolisacárido)

## M

**2ME:** *2-Methoxyestradiol* (2-metoxiestradiol)  
**2ME2:** *2-Methoxyestradiol* (2-metoxiestradiol)  
**Met:** *Methionine* (metionina)  
**MHC:** *Major Histocompatibility Complex* (complejo principal de histocompatibilidad)  
**MMP:** *Matrix Metallo-Proteinase* (metaloproteínasa de la matriz extracelular)  
**mRNA:** *Messenger RNA* (ácido ribonucleico mensajero)  
**MTHFR:** *Methylene-Tetra-HydroFolate Reductase* (metil-tetra-hidrofolato-reductasa)

## N

**NAD:** *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida y adenina)(forma oxidada)  
**NADH:** *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida y adenina)(forma reducida)  
**NC-IUBMB:** *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Comisión de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular)  
**NK:** *Natural Killer* (agresora por naturaleza, de naturaleza agresiva)  
**NOS:** *Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico-sintetasa)

## O

**OC:** *Oral Contraceptive* (anticonceptivo oral)  
**OMIM:** *Online Mendelian Inheritance in Man* (herencia mendeliana humana en internet)  
**OR:** *Odds Ratio* (disparidad, razón de posibilidades)

## P

**PAI-1:** *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (inhibidor del activador del plasminógeno-1)  
**PBS:** *Phosphate Buffered Saline* (tampón fosfato salino)  
**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)  
**PE:** *Preeclampsia* (pre-eclampsia)  
**PECAM-1:** *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (molécula plaquetaria de adhesión a las células endoteliales-1)  
**PGF:** *Placental Growth Factor* (factor de crecimiento placentario)  
**PRCP:** *ProlylCarboxyPeptidase* (prolil-carboxi-peptidasa o angiotensinasa C)

## R

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción)  
**RNA:** *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico)

## S

**SAH:** *S-adenosyl-L-homocysteine* (S-adenosil-L-homocisteína)  
**SAM:** *S-adenosylmethionine* (S-adenosil-metionina)  
**sFIt-1:** *Soluble fms-like tyrosine kinase-1* (tirosin-cinasa soluble-1 similar a fms)  
**SLE:** *Systemic Lupus Erythematosus* (lupus eritematoso diseminado)  
**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de nucleótido simple)

## T

**T:** *Thymine* (timina)  
**Taq:** *Termus aquaticus*  
**TBE:** *Tris/Borate/EDTA* (tampón de Tris, borato y EDTA)  
**TIMPs:** *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (inhibidor tisular de metaloproteinasas)  
**TGF-β:** *Transforming Growth Factor-β* (factor de crecimiento transformante-β)  
**TNF-α:** *Tumor Necrosis Factor-α* (actor de necrosis tumoral-α)  
**Treg:** *Regulatory T cell* (célula T reguladora)

## U

**U:** *Uracil* (uracilo)  
**uPA:** *Urokinase-type Plasminogen Activator* (activador del plasminógeno tipo urocinasa)  
**3'-UTR:** *3'-Untranslated Region* (región no traducida-3')  
**UV:** *Ultra Violet* (ultravioleta)

## V

**Val:** *Valine* (valina)  
**VCAM-1:** *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (molécula de adhesión de las células vasculares-1)  
**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor* (factor de crecimiento del endotelio vascular)  
**VNTR:** *Variable Number Tandem Repeat* (repeticiones en tándem de número variable)

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. Estado actual del conocimiento sobre pre-eclampsia.**

### **1.1. Pre-eclampsia y eclampsia**

#### **1.1.1. Concepto, antecedentes históricos y clasificación**

La pre-eclampsia es un trastorno multisistémico del embarazo y del puerperio, que complica aproximadamente al 6 a 8% de todos los embarazos en los países desarrollados<sup>1-3</sup>. No existe una prueba específica para su diagnóstico, y este se basa en dos características clínicas como son: (i) la hipertensión arterial (HTA) (>140 mm Hg de sistólica o >90 mm Hg de diastólica, tomada en posición sentada) y (ii) proteinuria (>0,3 g en 24 horas)<sup>1-3</sup>.

Entre los criterios diagnósticos de la pre-eclampsia encontramos la HTA. La HTA es la complicación médica más frecuente del embarazo. Se acostumbra clasificarla como<sup>56</sup>: (i) HTA pre-existente, habitualmente presente ya antes de las 20 semanas de embarazo, (el subtipo afecta a 3-5% de las embarazadas, un 25% de este grupo de pacientes desarrolla pre-eclampsia) e (ii) HTA asociada al embarazo (que se presenta en el 12% de las embarazadas, un 6 a 7% corresponde a HTA gestacional, sin mayor repercusión, y un 5 a 6% a pre-eclampsia)<sup>56</sup>. En la tabla I vemos la clasificación de los trastornos hipertensivos que complican el embarazo, utilizada por el *National High Blood Pressure Education Program*, publicado en el año 2000 y que continúa en vigencia para realizar dicha diferenciación según ciertos parámetros clínicos encontrados en las pacientes.

**Tabla I.** Clasificación de los trastornos hipertensivos que complican el embarazo\*

---

#### **Hipertensión gestacional**

Presión arterial >140/90 mm Hg por primera vez durante el embarazo

No hay proteinuria

Normalización de la presión arterial < 12 semanas después del parto

Diagnóstico final efectuado sólo después del parto

Son posibles otros signos de pre-eclampsia, por ejemplo malestar epigástrico o trombocitopenia.

#### **Pre-eclampsia**

Presión arterial > 140/90 mm Hg después de la semana 20 de gestación

Proteinuria > 300 mg/24h o >1+ en el papelillo reactivo

Mayor probabilidad de pre-eclampsia

Presión arterial > 160/110 mm Hg

Proteinuria de 2,0 g/24h o > 2+

Creatinina sérica > 1,2 mg/dl, a menos que estuviera elevada antes

Plaquetas < 100.000/mm<sup>3</sup>

Hemólisis microangiopática (aumento de LDH)

Elevación de ALT o AST

Cefalea o algún otro trastorno cerebral o visual persistente

Dolor epigástrico persistente

#### **Eclampsia**

Convulsiones no atribuibles a otras causas en una mujer que experimenta pre-eclampsia

#### **Pre-eclampsia sobrepuesta a hipertensión crónica**

Proteinuria de nuevo inicio > 300 mg/24h en mujeres hipertensas, pero sin proteinuria antes de la semana 20 de gestación

Aumento súbito de la proteinuria o presión arterial o recuento plaquetario < 100.000/mm<sup>3</sup> en mujeres con HTA y proteinuria antes de la semana 20 de gestación

#### **Hipertensión crónica**

Presión arterial > 140/90 mm Hg antes del embarazo o diagnosticada antes de la semana 20 de gestación o bien hipertensión diagnosticada por primera vez después de la semana 20 de gestación y que persiste después de la semana 12 del periodo postparto.

---

\*Adaptado del National High Blood Pressure Education Program; Working group report on high blood pressure in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000;183:51.

A su vez la pre-eclampsia se clasifica en moderada o grave, en base a la severidad de la HTA y del grado de proteinuria, como también de la presencia de síntomas y signos que manifiesten compromiso de otros órganos<sup>1,2</sup> (Tabla II). En la pre-eclampsia moderada, la presión arterial no sobrepasa los 160/110 mm Hg, la proteinuria es menor de 5 g en 24 horas, la diuresis mayor de 500 ml en 24 horas, y puede asociarse a edema generalizado moderado, pero sin compromiso de la coagulación, función hepática ni compromiso neurológico. Por su parte, en la pre-eclampsia grave, los valores de presión arterial y proteinuria son superiores, la diuresis en 24 horas menor de 500 ml, el edema es generalizado, pudiendo llegar a anasarca y hasta desarrollar edema pulmonar; también puede asociarse a trombocitopenia, elevación de enzimas hepáticas o manifestaciones de compromiso del sistema nervioso central. Estas últimas características corresponden al cuadro clínico del síndrome de hiperperfusión encefálica, manifestándose con cefalea, alteraciones visuales (fosfenos, disminución de agudeza visual, etc.) y alteración de la conciencia<sup>2,4,5,57,58</sup>. Cuando este cuadro descrito está presente se habla de signos premonitorios de eclampsia inminente.

**Tabla II.** Clasificación de la pre-eclampsia

CARACTERISTICA	MODERADA	GRAVE
Presión sistólica (mm Hg)	< 160	160
Presión diastólica (mm Hg)	< 110	110
Proteinuria (g/24h)	< 3	3
Diuresis (ml/24h)	500	< 500
Edema	Generalizado moderado	Generalizado (anasarca)
Compromiso neurológico	Ausente	Alteraciones en el CNS*
Compromiso coagulación	Ausente	Trombocitopenia
Compromiso hepático	Ausente	Elevación enzimas hepáticas

\*(del inglés *Central Nervous System*, CNS). Incluye irriutabilidad, cefalea, hiperreflexia, fotopsias o tinnitus

La eclampsia se define como la ocurrencia de crisis convulsivas durante el embarazo o puerperio, para la cual no se encuentra otra causa sino el síndrome de hiperperfusión encefálica<sup>2,6</sup>. Si bien la eclampsia se puede considerar, de acuerdo a la nomenclatura empleada, como el estadio final de la pre-eclampsia, algunos autores refieren que hasta un 20% de las pacientes pueden no presentar el cuadro clínico neurológico premonitorio antes de la crisis convulsiva<sup>1</sup>. Por ello se ha considerado que la eclampsia más que una etapa terminal de la pre-eclampsia, es más bien una manifestación más de esta última<sup>1</sup>.

Aproximadamente un 5-20% de las pre-eclampsias hace una eclampsia, complicando hasta un 0,3% de los embarazos, pero pudiendo llegar hasta un 15% en países subdesarrollados<sup>1,2</sup>. Se estima que la eclampsia es la causa del 10% de las muertes maternas en países desarrollados. La eclampsia tratada tiene una mortalidad de menos del 2%<sup>2,4,57</sup> y sin tratamiento de un 7 a 30%<sup>7-9</sup>. Más aún, en Latinoamérica, el síndrome hipertensivo del embarazo (pre-eclampsia y eclampsia) es la principal causa de mortalidad materna<sup>9</sup>.

Siendo la pre-eclampsia un trastorno multisistémico, las complicaciones maternas son diversas. Las principales son: desprendimiento prematuro de placenta normo-inserta, edema pulmonar, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, daño hepato-celular, coagulación intravascular diseminada, síndrome de hiperperfusión encefálica y muerte<sup>2</sup>.

Como es de suponer, la pre-eclampsia y eclampsia también se relacionan con complicaciones fetales, siendo las más frecuentes: prematuridad, retardo del crecimiento intrauterino, asfisia perinatal y mortalidad perinatal. La pre-eclampsia y eclampsia son condiciones exclusivas del embarazo y puerperio. Generalmente, se presentan pasadas las 20 semanas de embarazo, en el parto y puerperio precoz (dentro de las primeras 48 horas del parto). Clásicamente, el 50% de la eclampsia se presenta durante el embarazo, un 25% en el parto y un 25% en el puerperio precoz<sup>1,2,8</sup>. Ocasionalmente puede ocurrir antes de las 20 semanas, y en esta circunstancia debe sospecharse un embarazo molar o una degeneración hidrópica placentaria<sup>1</sup>. Igualmente, puede presentarse pasadas las 48 horas del puerperio, especialmente en algunas etnias africanas, en las cuales hasta un 60% de las eclampsias ocurren en este periodo<sup>1</sup>.

## **1.1.2. Epidemiología**

### **1.1.2.1. Incidencia y prevalencia**

La pre-eclampsia es considerada un problema de salud pública debido a su alta prevalencia<sup>314</sup>. Es una de las causas más frecuentes de mortalidad materno-fetal en países en desarrollo<sup>315</sup>. Afecta entre un 5 a 12% de los embarazos, siendo la principal causa de muerte materna en el mundo<sup>317-319</sup>, igualmente es causa de preocupación en los países desarrollados por su gran relación causal con el retraso de crecimiento intrauterino y partos prematuros<sup>316</sup>.

Muchas investigaciones coinciden en que su origen se relaciona con la interacción entre factores genéticos y ambientales. Por esta razón, varios estudios han explorado tales factores genéticos tratando de identificar regiones cromosómicas y genes candidatos cuyas variantes se relacionen con una mayor susceptibilidad a la enfermedad. Igualmente diversos estudios de asociación han identificado algunos genes de susceptibilidad a la pre-eclampsia, pero los resultados no se han confirmado en todas las poblaciones, quizá por su complejidad clínica y genética.

Existen grandes diferencias en la incidencia de enfermedades hipertensivas del embarazo y pre-eclampsia entre países desarrollados y los que se encuentran en vía de desarrollo<sup>1-3</sup>. La mortalidad materna en Estados Unidos y Europa es de 10 por 100.000 nacimientos vivos, en Latinoamérica es de 220 por 100.000 nacimientos vivos y en África es de 430 por 100.000 nacimientos<sup>56</sup>. Básicamente, está marcada diferencia está determinada por aspectos socioeconómicos ligados a deficiencias en los sistemas de salud y a las condiciones socio sanitarias que se presentan en cada uno de ellos, ligados igualmente a deficiencia de recursos nutricionales, en especial, aporte de minerales entre otros aspectos<sup>341</sup>. En la tabla III se resume la prevalencia de la pre-eclampsia en diferentes partes del mundo.

**Tabla III.** Prevalencia de pre-eclampsia en el mundo

PAÍS	AÑO	PREVALENCIA (%)	REFERENCIA
Reino Unido	2001	11	364
Estados Unidos	2001	5-8	407
Brasil	2001	2,3	363
Alemania	2010	2,31	359
Nigeria	2011	2-17	362
España	1986	1,1	361

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia de pre-eclampsia podría ser siete veces más alta en los países en vía de desarrollo, (un 2,8% de los nacimientos vivos), que en los países desarrollados (un 0,4%)<sup>342</sup>.

### 1.1.3. Factores predisponentes al desarrollo de la pre-eclampsia

**Entre los factores predisponentes para el desarrollo del cuadro sobresalen los siguientes:**

**(i) Nuliparidad:** Aproximadamente el 75% de los casos de pre-eclampsia corresponden a primigestas. Esta alta incidencia de la enfermedad en primigestas se atribuye a un menor desarrollo de la vascularización uterina, ya que se ha confirmado que el calibre de sus arterias uterinas es menor que el de las múltiparas.

**(ii) Historia familiar:** Las madres, hermanas e hijas de pacientes que han presentado pre-eclampsia o eclampsia, tienen una incidencia significativamente mayor de la enfermedad, lo que apunta a factores genéticos predisponentes, probablemente relacionados con los sistemas reguladores de presión arterial entre otras posibles dianas genéticas y/o moleculares relacionadas con la compleja fisiopatología del cuadro.

**(iii) Grupos de edad extremos:** La mayor parte de los estudios muestra una incidencia mayor antes de los 20 años y después de los 35 años, siendo una curva en "J" la que mejor representa la relación incidencia-edad.

**(iv) Embarazo múltiple:** La incidencia de la enfermedad es alrededor de 5 veces mayor que la observada en la población general de embarazadas, lo que se atribuye a mayor demanda placentaria.

**(v) Enfermedad de base:** (i) **HTA crónica** (la incidencia de la enfermedad se quintuplica en relación a lo esperado); (ii) **diabetes mellitus** (existe una mayor incidencia de pre-eclampsia-eclampsia en embarazadas diabéticas con inadecuado control metabólico y con nefropatía diabética); (iii) **mola hidatidiforme** (la aparición de pre-eclampsia-eclampsia es más precoz y frecuente en las molas de gran tamaño).

Por tanto los factores de riesgo para la pre-eclampsia pueden ser divididos en aquellos que dependen de factores maternos y los que dependen de factores ambientales<sup>298-301</sup> (tabla IV).

**Tabla IV.** Factores de riesgo para pre-eclampsia

---

#### **FACTORES MATERNOS**

##### **1. Pregestacionales**

Edad materna menor de 20 y mayor de 35 años  
Etnias africanas  
Historia personal de pre-eclampsia (en embarazos anteriores)  
Presencia de algunas enfermedades crónicas tales como: obesidad, enfermedad renal, neurofibromatosis, enfermedades autoinmunitarias (síndrome antifosfolípido), trombofilias y dislipidemia

##### **2. Gestacionales**

Primigravidez o embarazo de un nuevo compañero sexual  
Sobredistensión uterina (embarazo gemelar y polihidramnios)  
Embarazo molar en nulípara

#### **FACTORES AMBIENTALES**

Malnutrición por defecto o por exceso  
Escasa ingesta de calcio antes y durante la gestación  
Deficiencias de magnesio, zinc y selenio  
Alcoholismo durante el embarazo  
Bajo nivel socioeconómico  
Cuidados prenatales deficientes  
Estrés crónico

---

Por otra parte, cada uno de estos factores tendría su posible implicación fisiológica en el desarrollo del cuadro.

La tabla V, muestra la relación entre algunos de estos factores de riesgo y la posible implicación fisiopatológica en la isquemia uteroplacentaria que tendría lugar en la pre-eclampsia.

**Tabla V.** Causas de isquemia uteroplacentaria

FACTORES MORFOLÓGICOS	FACTORES FUNCIONALES
Primiparidad	Desbalance entre vasoconstrictores y vasodilatadores
Embarazos múltiples	Predominio del tromboxano sobre la prostaciclina
Mola hidatidiforme	Déficit de óxido nítrico
Enfermedades inmunológicas (SLE, síndrome antifosfolípido)	Déficit del sistema calicreína-cinina

#### 1.1.4. Aspectos clínicos y diagnósticos de la pre-eclampsia

##### 1.1.4.1. Presentación clínica

Como se ha mencionado la pre-eclampsia se define clínicamente como un síndrome multisistémico de severidad variable, específico del embarazo, caracterizado por una reducción de la perfusión sistémica generada por vaso espasmo y activación de los sistemas de coagulación. Se presenta después de 20 semanas de gestación, durante el parto o en las primeras 6 semanas después de éste. El cuadro clínico se caracteriza por HTA (140/90) acompañada de proteinuria y es frecuente que además se presenten cefalea, acúfenos, fosfenos, edema, dolor abdominal y alteraciones de bioquímicas<sup>5</sup>.

La tabla VI, muestra las diferentes presentaciones clínicas de los distintos síndromes hipertensivo del embarazo.

**Tabla VI.** Diagnostico diferencial de los síndromes hipertensivos del embarazo

CARACTERÍSTICA	HTA	PRE-ECLAMPSIA	HTA + PRE-ECLAMPSIA	HTA TRANSITORIA
Paridad	multípara	primigestante	multípara	multípara
Semana de inicio	< 20	>20	< 20	>36
Antecedente familiar	HTA	Pre-eclampsia	HTA	HTA
Fondo de ojo	esclerosis	edema	esclerosis y edema	-
Proteinuria (>300mg/l)	±	+	+	-
Acido úrico (>5mg/dl)	-	+	+	-
Deterioro renal	±	+	+	-
TA posparto	elevada	normal	elevada	normal
Recurrencia	+	-	+	+

Las pruebas complementarias que se realizan para ayudar al diagnostico de la pre-eclampsia, se relacionaran en la tabla VII.

**Tabla VII.** Analítica y su interpretación

DETERMINACIÓN	INTERPRETACIÓN	VALOR NORMAL EN EL EMBARAZO*
<b>Función renal</b>		
Creatinina plasmática	Un valor elevado más proteinuria sugiere pre-eclampsia	0,8 mg/dl
Uremia	Permite diferenciar de neuropatía	hasta 35-40 mg/dl
Uricemia	Indicador tardío de gravedad	2,5 a 4 mg/dl
Proteinuria en 24h	300 mg/día o más correlación con mal pronóstico fetal	Ausente o trazas < 300 mg/día
Sedimento de orina	Cilindros granulosos indican daño renal	
Urocultivo	No microorganismos	
<b>Estudio hematológico</b>		
Hematocrito	Hemoconcentración o hemolisis	34,5 - 49,5%
Hemoglobina	Valora hemoconcentración	11 g/dl
Recuento plaquetas	Valores < 100.000 sugieren consumo	150.000-300.000 /mm <sup>3</sup>
Coagulograma con fibrinógeno	Hipofibrinogenemia en casos severos	200-400 mg/dl
Frotis de sangre circulante	Pueden aparecer esquistocitos que indican la magnitud del daño endotelial	Seri -morfología normal Discreta leucocitosis
<b>Función hepática</b>		
GPT y GOT	Su aumento sugiere compromiso hepático	GOT: 1-31 IU/l GPT: 2-40 IU/l
LDH	Se asocia a hemolisis y daño hepático	hasta 230 mg/dl

\*Valores normales en el HUMV.

Tras el correcto diagnóstico y clasificación del cuadro se procede a utilizar protocolos para su tratamiento adecuado. La tabla VIII nos muestra los tratamientos más utilizados sus dosis y el mecanismo de acción de cada uno de ellos.

**Tabla VIII.** Medicamentos antihipertensivos utilizados\*

FÁRMACO	DOSIS DIARIA	COMENTARIO
Alfa metildopa	250-500mg/8 horas oral.	Agonista alfa adrenérgico central, resistencia periférica.
Labetalol	100-200 mg/6-8 hora oral.	Bloqueador no selectivo de los receptores alfa y beta
Hidralacina	Dosis iniciales 50 mg/día repartidas en 3-4 tomas. oral.	Si a las 48 horas la presión arterial no se normaliza, se aumenta progresivamente la dosis de hidralacina hasta una dosis máxima de 200 mg/día.

Están contraindicados el atenolol, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), los bloqueantes de los receptores de angiotensina y los diuréticos.

\*Protocolo seguido por el servicio de Ginecología y Obstetricia del HUMV.

### 1.1.4.2. El síndrome HELLP

El síndrome de hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia, (HELLP, de sus siglas en inglés referentes a *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low platelets count*) pertenece al grupo de las microangiopatías trombóticas, que se caracterizan por anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción orgánica<sup>61</sup>.

En el síndrome HELLP se detecta elevación de las enzimas hepáticas como consecuencia de un daño hepatocelular severo secundario a la deposición de fibrina en los sinusoides hepáticos. Se presenta entre el 0,5-0,9% de todas las gestaciones y entre el 4-14% de todas aquellas mujeres que desarrollan pre-eclampsia/eclampsia<sup>61</sup>.

Las manifestaciones clínicas son variadas, desde síntomas generales como debilidad, fatiga y vómitos, hasta formas severas como la pérdida de la visión y hemorragias hepática e intracraneal, entre otras. La mayoría de las pacientes manifiestan el síndrome tras 27-37 semanas de gestación, pero se puede observar también en el puerperio, desde los primeros momentos después del parto hasta los 7 días después, con un pico de incidencia a las 48 horas.

La mortalidad materna asociada con este síndrome es de 1-24%, y la perinatal hasta más del 40%, ambas muy relacionadas con el momento del diagnóstico y las condiciones materno-fetales.

El objetivo del tratamiento está encaminado a interrumpir la gestación, evitar las convulsiones, controlar la HTA asociada con este síndrome, que se observa entre el 82-88 % de los casos, y de los trastornos de la coagulación asociados. La plasmaféresis, los corticoesteroides y el trasplante hepático, son otras medidas terapéuticas que se han empleado.

Existen dos sistemas de clasificación de este síndrome, basados en las observaciones clínicas y de laboratorio<sup>61</sup> (tabla IX).

**Tabla IX.** Clasificación del síndrome HELLP

---

#### Primer sistema de clasificación

Trombocitopenia (recuento plaquetario).

Clase 1:  $\leq 50 \times 10^9 / l$

Clase 2:  $\geq 50 \times 10^9 / l$  y  $\leq 100 \times 10^9 / l$

Clase 3:  $\geq 100 \times 10^9 / l$  y  $\leq 150 \times 10^9 / l$

Hemólisis y disfunción hepática.

LDH  $\geq 600$  IU/l.

GPT y/o GOT  $\geq 40$  IU/l

#### Segundo sistema de clasificación

Síndrome HELLP completo

Recuento plaquetario  $< 100 \times 10^9 / l$

LDH  $\geq 600$  IU/l

GOT  $\geq 70$  IU/l

**Síndrome de HELLP incompleto** (Solo 1 ó 2 criterios presentes)

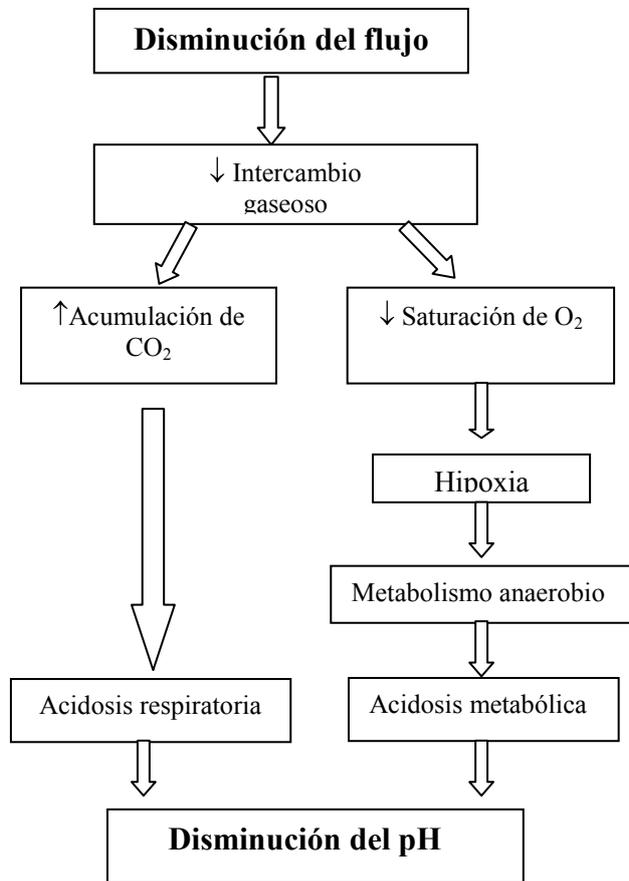
---

### 1.1.5. Efectos de la pre-eclampsia sobre el feto y valoración del bienestar fetal

La pre-eclampsia es una entidad que no solo involucra a la madre, sino también al feto.

Los métodos que utilizamos como parámetro evaluador del estado del niño consisten en la valoración del test de Apgar, el análisis de ácidos y bases en el cordón umbilical y la aparición de complicaciones neonatales. La asociación de estos parámetros permite evaluar su estado y adoptar las medidas oportunas.

Las tres características mencionadas han sido valoradas como variables dentro del presente estudio. Esto permite conocer el estado de bienestar del niño al nacer. La edad gestacional y el peso constituyen variables que reflejan igualmente el desarrollo intrauterino y el bienestar fetal (figura 1).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo de las alteraciones en el recién nacido al disminuir el flujo placentario.

## **2. Aspectos fisiológicos e inmunológicos de la placenta**

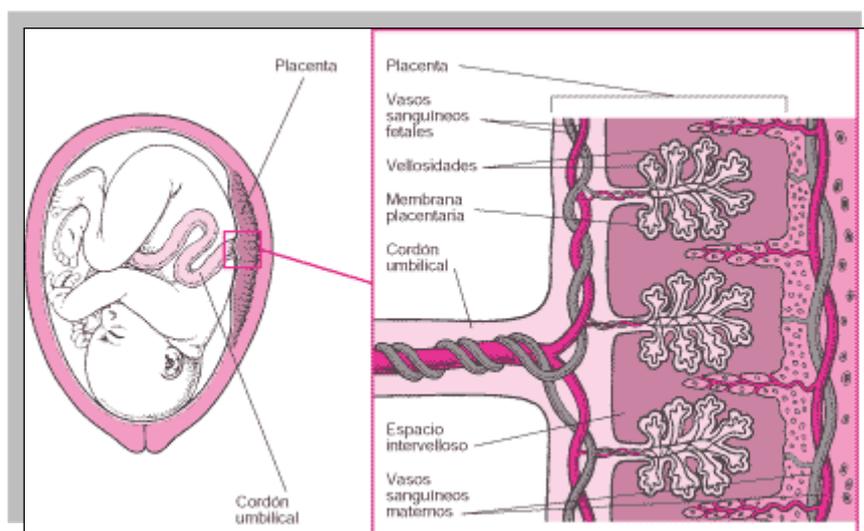
### **2.1. Fisiología del embarazo y de la placentación**

La formación de la placenta se inicia pocas horas después de la implantación, cuando un grupo de células del cigoto comienzan a diferenciarse en células del trofoblasto que formarán la placenta. Estas células trofoblásticas tienen un comportamiento biológico único que asemeja un proceso neoplásico por su capacidad de infiltrar o invadir el endometrio.

El trofoblasto va formando múltiples ramificaciones llamadas vellosidades coriales que se infiltran en el endometrio. Alrededor de cada una de estas vellosidades llegan las arterias maternas y forman lagos sanguíneos que regresan, por las venas, a la circulación materna<sup>13</sup>. Esto implica que la membrana que rodea las vellosidades coriales, membrana placentaria, es la frontera entre madre y feto. La sangre materna llega hasta los lagos sanguíneos que rodean las vellosidades coriales, pero nunca pasa al feto.

La sangre fetal circula por el cordón umbilical y llega a las vellosidades de la placenta, donde queda en contacto con la sangre materna, sólo a través de la membrana

placentaria, nunca sobrepasándola ya que la placenta humana es hemocorial (la sangre materna y fetal nunca se mezclan). La figura 2 muestra como es la relación feto placentaria, donde la placenta queda firmemente adherida a la pared interna de la cavidad uterina, mediante las vellosidades coriales que infiltran el endometrio sin llegar hasta la pared muscular (cara materna de la placenta). La cara opuesta de la placenta (cara fetal), está cubierta por las membranas fetales o corioamnióticas que son atravesadas por el cordón umbilical. Por lo tanto, la placenta se encuentra entre la pared uterina y la bolsa amniótica que protege al feto.



**Figura 2.** Relación feto-placentaria. Ilustración tomada de <sup>408</sup>.

La placenta realiza múltiples acciones y suple temporalmente las funciones que, al nacimiento, realizarán los aparatos respiratorio, digestivo, excretor y otros muchos órganos y sistemas. Una de éstas es la función respiratoria; es decir, el intercambio de gases que permite la difusión del oxígeno de la sangre materna a la fetal y del dióxido de carbono del feto a la madre. La función nutricia implica la difusión de elementos nutritivos de la sangre materna a la fetal, carbohidratos, grasas, aminoácidos, vitaminas y minerales que se utilizarán para la producción de energía y para la estructuración de proteínas. La placenta tiene, también, una función hormonal muy importante secretando gonadotrofina coriónica cuya función es mantener el cuerpo lúteo responsable de la producción de la progesterona, hormona indispensable para mantener el embarazo en las primeras semanas y fundamental para la implantación. La placenta tiene una importante función excretora, pues es a través de ella que se eliminan las sustancias de desecho o tóxicas al feto. No todas las sustancias cruzan la “barrera placentaria” dependiendo del tamaño de las moléculas, la placenta puede ser selectiva para dejar pasar o no algunas sustancias sirviendo como filtro<sup>13</sup>.

## 2.2. Decidualización

La decidua es el tejido derivado de la madre con diversas funciones biológicas, nutritivas, estructurales e inmunológicas.

Durante la decidualización, están involucradas las arterias espirales.

El establecimiento del embarazo depende de que el trofoblasto se ancle e invada el endometrio decidualizado y de que la vasculatura uterina sea destruida y moldeada para suplementar con nutrientes a la circulación fetoplacentaria. Es probable que la

remodelación vascular este mediada más por señales maternas (e.g: progesterona) que por estímulos feto-placentarios<sup>19, 63</sup>.

Es importante que las células del trofoblasto invadan y generen modificaciones de las arterias uterinas; es decir, una sobreinvasión trofoblastica generaría ruptura uterina y la subinvasión por su parte traería como consecuencia una disminución del flujo sanguíneo produciendo consecuencias negativas sobre el embarazo<sup>19,20,63</sup>. En este contexto, es probable que las metaloproteasas de la matriz extracelular (del inglés *matrix metalloproteinases*, MMP) tuviesen un papel fundamental. La MMP-9 se produce en queratinocitos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos y una gran variedad de células tumorales<sup>343</sup> y por lo tanto, podría estar implicada en la decidualización. Esto está apoyado por estudios que demostraron que la MMP-9 se encuentra incrementada en la pared arterial del cordón umbilical de fetos procedentes de un embarazo complicado con pre-eclampsia<sup>343</sup>.

El principal tipo de linfocitos encontrado en la decidua son las células agresoras naturales (del inglés *natural killer*, NK) alcanzando el 70% del total de leucocitos deciduales. Su fenotipo CD56<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>CD3<sup>-</sup> difiere del encontrado en la circulación, el cual es CD56<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>CD3<sup>+</sup>. Las células NK uterinas persisten en la mucosa del útero la cual se irá transformando en la decidua a medida que el embarazo progresa; la presencia de estas células NK es propia del embarazo temprano ya que a después de la 20 semana comienzan a desaparecer, estando totalmente ausentes al término del mismo. Es importante recalcar que las células NK uterinas no se encuentran antes de la menarquía ni después de la menopausia y por ende se cree que juegan un papel importante en enfermedades gestacionales como la pre-eclampsia y el aborto recurrente. La función de las células NK deciduales está definida, por su presencia abundante durante la implantación y por estar en contacto con las células del trofoblasto invasor, en la implantación y en el desarrollo de la placenta.

En el miometrio y en el endometrio, hay gran número de macrófagos regulados por las concentraciones de hormonas ováricas. La tolerancia fetal, se mantiene gracias a la conservación en la relación CD4/CD8; si esta relación se pierde se produciría una activación autoinmunitaria que conduciría a pérdidas recurrentes del embarazo.

### **2.3. La placenta como un órgano inmunológico**

La placenta provee un microambiente inmunológico único, donde existe un estado de tolerancia mutua entre dos tejidos antigénicamente diferentes<sup>14,15,62</sup>.

Para entender la inmunología del embarazo se requiere familiarizarse con la estructura placentaria y los tipos celulares que allí se encuentran<sup>13, 16</sup>.

La placenta es un órgano hemocorial, lo que quiere decir que el trofoblasto placentario está en contacto directo con la sangre materna formando la interfaz materno fetal, es decir, las células del trofoblasto fetal cubren las vellosidades placentarias y están en contacto directo con la sangre materna; en otros términos, la sangre materna baña directamente los tejidos coriales sin interposición de tejido materno<sup>17</sup>.

Existen varios tipos de células trofoblasticas en la placenta que inician la homeostasis con la madre<sup>13</sup>.

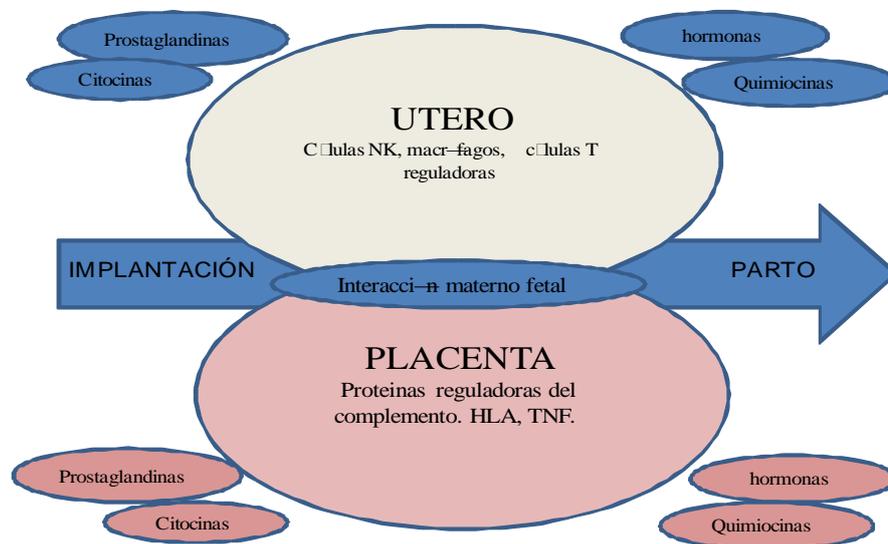
El sinciotrofoblasto se desarrolla a partir de la agregación de células citotrofoblasticas que se fusionan para formar el sincitio; este proceso de fusión involucra fosfolípidos y moléculas de adhesión; el sincitiotrofoblasto es una membrana involucrada directamente con la sangre materna, envolviendo al feto y alojando las células inmunitarias efectoras, funciona como lugar de intercambio de moléculas y es un lugar privilegiado, desde un punto de vista inmunológico, para proteger al feto de posibles agresiones citotóxicas maternas<sup>17</sup>.

La mucosa uterina se transforma y se prepara para la invasión del trofoblasto en un proceso llamado decidualización. (ver sección 2.2) En este proceso el trofoblasto, que deriva del blastocito, está compuesta entre otras células, por células dendríticas y macrófagos. Estas se encargan de transferir las IgG maternas al feto. En este proceso el trofoblasto se diferencia en dos: el veloso y el extra veloso.

Para que se mantenga la tolerancia al feto el trofoblasto expresa moléculas HLA de clase I no clásicas que le permite ser un órgano inmunoprivilegiado evitándose la actuación de células citotóxicas<sup>13,16-18</sup>.

En la figura 3 se ilustra esquemáticamente, el principio por el que procesos maternos y fetales contribuyen a generar un ambiente seguro.

Hay abundancia de hormonas inmunomoduladoras tales como prolactinas, gonadotropina corionica, progesterona y quimiocinas. Estas moléculas controlan cuantitativa y cualitativamente las células del sistema inmunológico. Mientras que en la figura 4 se muestran algunos factores que intervienen en la placentación.



**Figura 3.** Interacción entre útero y placenta

#### 2.4. Tolerancia materna fetal

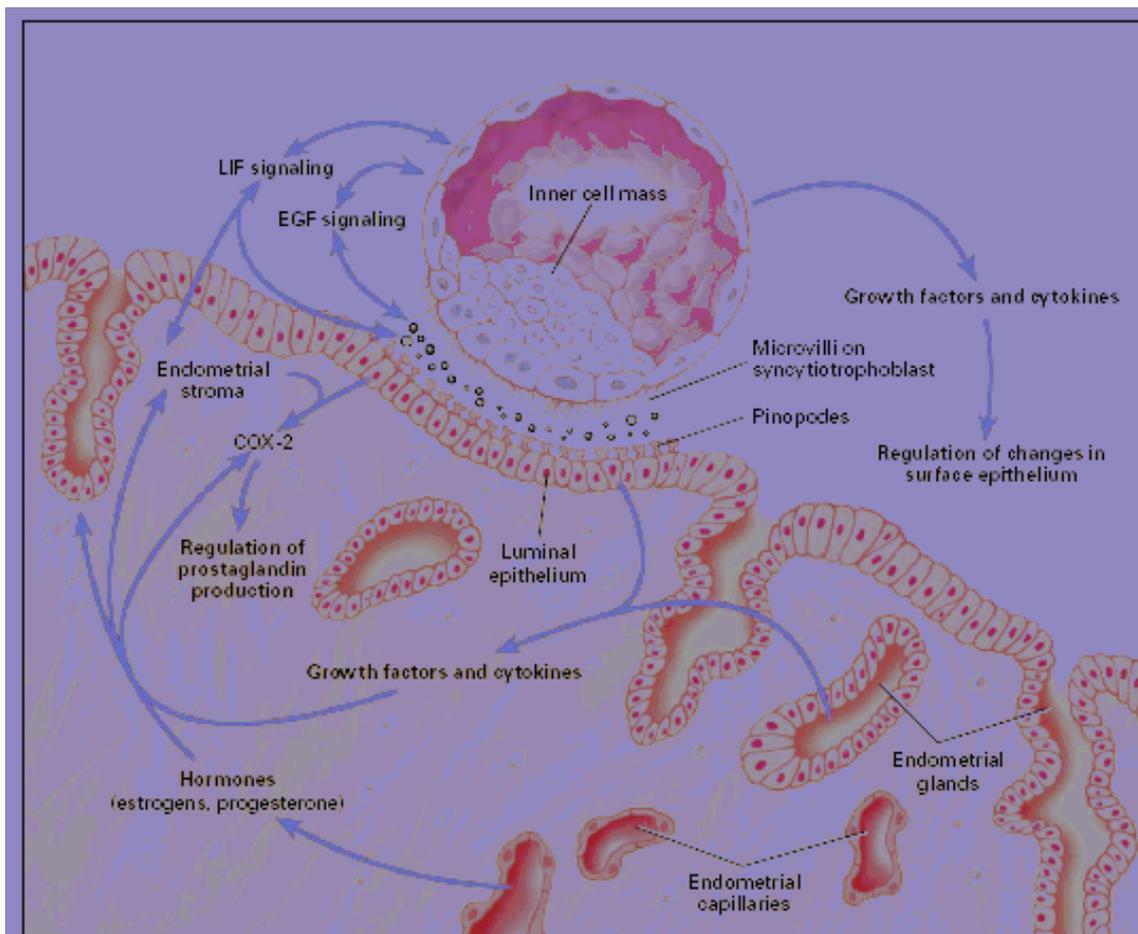
La tolerancia inmunológica está definida como la ausencia de respuesta frente a lo propio. Es una de las características fundamentales del sistema inmunitario.

Después de muchos estudios se ha asumido que la placenta es muy importante para explicar la tolerancia. Hace años se describía como un lugar pasivo o neutral, pero ahora se concibe como un lugar activo para la tolerancia. La placenta se presenta como sitio activo para la misma, ya que actúa como barrera inmunológica donde dos organismos antigénicamente diferentes se toleran entre sí, convirtiendo el embarazo en un reto inmunológico donde el útero, las hormonas y las citocinas, tales como, la interleucina 4 (del inglés *interleukin 4*, IL4) e interleucina 10 (del inglés *interleukin 10*, IL10) producidas en alta concentración durante este, generan una disminución de la inmunidad celular tipo TH1 en la interfaz feto materna.

### 3. La pre-eclampsia como alteración inmunológica: Inmunopatogenia

#### 3.1. Homeostasis inmunológica: Inmunidad innata y adquirida

Las respuestas inflamatorias innatas aparecen antes que las respuestas inmunitarias adquiridas. El sistema innato responde rápidamente a los estímulos y es relativamente inespecífico, mientras que el sistema adquirido se desarrolla más lentamente pero tiene una forma precisa de acción con su respuesta específica a los antígenos y “memoria” inmunológica. Básicamente, puede decirse que el sistema inmunitario innato puede interactuar con el adquirido pero no se necesita de esta interacción para su función, mientras que el sistema adquirido no puede funcionar sin las señales del sistema innato.



**Figura 4.** Placentación

Se muestra el proceso que se piensa necesario para la receptividad uterina y la proximidad y adhesión del blastocito. La implantación exitosa es el resultado final de una compleja interacción molecular entre el útero hormonalmente preparado y el blastocisto maduro<sup>409</sup>.

COX-2= Ciclooxigenasa 2 (*cyclooxygenase 2*); EGF= Factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*); LIF= Factor inhibidor de leucemia (*leukemia inhibitory factor*).

Una respuesta inflamatoria sistémica no necesariamente es generada por un estímulo antigénico. En el embarazo, es casi seguro que ésta no se produce por la estimulación antigénica por parte del feto genéticamente diferente.

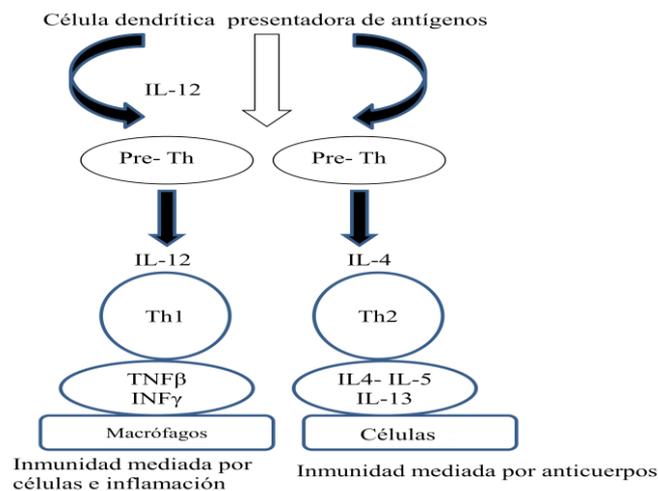
El sistema inmunitario adquirido tiene la capacidad de distinguir entre los tejidos propios y no propios y responder a antígenos propios y extraños, como en las enfermedades autoinmunitarias.

El sistema inmunitario innato reacciona más ampliamente a señales de “peligro”, usando una amplia gama de receptores con patrones de reconocimiento que se transforman para responder de diferentes formas. Estas señales pueden ser externas (de patógenos) o internas (de productos generados durante el daño tisular, la isquemia, la necrosis o el estrés oxidativo). Cuando las células inflamatorias se activan, liberan citocinas y quimiocinas que atraen y “activan” a las células de inmunidad adquirida (linfocitos T o B) para generar respuestas específicas a los antígenos, en forma de anticuerpos o células citotóxicas. Ambos sistemas actúan simultánea y secuencialmente.

Durante la placentación, las células NK, linfocitos del sistema inmunitario innato, juegan un papel importante en la decidua, pues representan una parte importante de la respuesta inflamatoria decidual. Las células NK deciduales son un tipo especializado de las células NK presentes antes de la concepción, en el endometrio de la fase lútea. Parece que facilitan la placentación al secretar citocinas que promueven la infiltración de las arterias espirales por el trofoblasto invasor. Esta respuesta inflamatoria local es un hecho importante de la placentación y ocurre temprano en el embarazo<sup>19</sup>.

### 3.1.1. Balance TH1/TH2

Durante el embarazo, el sistema inmunitario es muy activo y bajo ciertas condiciones patológicas puede contribuir a daños en el feto alterando el delicado balance de la interfaz materno-fetal. Por ejemplo, células inmunitarias como los macrófagos, secreten altas concentraciones de citocinas TH1, contribuyendo a la pérdida del equilibrio inmunológico. Se demostró que durante el embarazo normal existe un predominio de células TH2 y de sus citocinas características (IL4, IL5, IL6, IL10). (Ver figura 5). El trofoblasto fetal expresa receptores de baja afinidad para algunas de las citocinas TH1, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (del inglés *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF $\alpha$ ), el interferón- $\gamma$  (del inglés *interferon- $\gamma$* , INF $\gamma$ ) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF). Se ha demostrado que el INF $\gamma$  inhibe el crecimiento trofoblastico y junto al TNF $\alpha$  inhiben el desarrollo embrionario, fetal y la proliferación del trofoblasto<sup>52-55, 60-63</sup>.



**Figura 5.** Respuesta inmunitaria TH1/TH2.

Dependiendo de las citocinas que predominen en el medio se diferenciará una población TH1 ó TH2. Se muestran algunas de las citocinas predominantes en cada una de ellas. El embarazo normal está asociado con un incremento en la respuesta tipo TH2. Los cambios ocurren junto con el incremento en la producción de inmunoglobulinas y disminución de la respuesta TH1.

### 3.2. Alteraciones de la placentación e isquemia placentaria

La pre-eclampsia aparece solamente en presencia de placenta, aún en ausencia de feto (mola hidatiforme), en el caso de embarazo extrauterino y se detiene dramáticamente luego de la expulsión de la placenta en el postparto<sup>57</sup>.

Se ha sugerido que las alteraciones patológicas más precoces aparecen en la circulación útero-placentaria, lo cual origina una isquemia placentaria y lo que es considerado como el estadio I de la enfermedad<sup>58</sup>. En el estadio II, la placenta isquémica secreta varios factores circulantes que provocan la lesión de las células endoteliales en la madre y aparece el cuadro clínico de pre-eclampsia<sup>6,58</sup>.

Existen muchos argumentos que sugieren que la isquemia placentaria desempeña un papel central en la pre-eclampsia<sup>7</sup>: Los más evidentes son: (i) el examen histológico de las placentas de mujeres con pre-eclampsia muestran numerosos infartos placentarios y un estrechamiento esclerosante de las arteriolas<sup>8</sup>; (ii) las biopsias de las placentas de estas pacientes revelan una invasión trofoblástica inadecuada de las arteriolas deciduales maternas lo que origina vasos endurecidos<sup>9</sup>; (iii) los factores de riesgo maternos para la pre-eclampsia incluyen condiciones médicas que las predisponen a una insuficiencia vascular tales como la HTA crónica, la diabetes, el lupus y enfermedades trombosantes adquiridas o hereditarias<sup>3</sup>; (iv) los embarazos múltiples o la mola hidatiforme que aumentan la masa placentaria pero con una disminución relativa del flujo sanguíneo, aumentando el riesgo de pre-eclampsia<sup>3</sup> y (v) los modelos de pre-eclampsia realizados en animales se basan en producción de una isquemia placentaria alterando así el flujo sanguíneo<sup>10</sup>.

Dentro de las hipótesis etiológicas se considera que el trastorno endotelial es la alteración principal resultando en una perfusión deficiente de la placenta, ante lo cual se liberan factores que lo lesionan y aumentan su sensibilidad frente a los agentes vasopresores.

Para tratar de explicar la pre-eclampsia se han planteado cuatro factores etiológicos principales o hipótesis etiopatogénicas: (i) mala adaptación inmunológica; (ii) isquemia placentaria; (iii) estrés oxidativo y (iv) susceptibilidad genética<sup>320</sup>.

#### 3.2.1. Mala adaptación inmunológica

Apoyan esta hipótesis algunas observaciones epidemiológicas tales como: (i) el menor riesgo de padecerla después del primer embarazo; (ii) el efecto protector de la multiparidad; (iii) promiscuidad; (iv) el uso de dispositivos intrauterinos (del inglés *intrauterine device*, IUD) o anticonceptivos orales; (v) historia de transfusiones sanguíneas y (vi) la historia de abortos. Dentro de los fenómenos inmunopatológicos que ocurren en la pre-eclampsia cabe destacar: la presencia de anticuerpos contra células endoteliales, la activación del complemento, el depósito de complejos inmunitarios y complemento en las arterias espirales, placenta, hígado, riñón y piel.<sup>1</sup> Por otra parte se ha postulado que la actividad de las células inmunitarias en la decidua puede liberar mediadores que actúan sobre las células endoteliales como el TNF $\alpha$  e IL-1, como también la asociación de la pre-eclampsia con la presencia de determinados alelos de los genes del sistema HLA-G (expresada sólo en trofoblasto)<sup>321</sup> y otras moléculas HLA tales como HLA-DR4 y HLA-A23, HLA-A29, HLA-B44 y HLA-DR7<sup>322</sup>.

Los genes que podrían estar involucrados en el desarrollo de la pre-eclampsia pueden ser agrupados de acuerdo al papel que juegan en su etiología, es decir: (i) aquellos que regulan la placentación; (ii) los reguladores de la presión arterial; (iii) los genes involucrados en la isquemia placentaria y (iv) los genes que intervienen en el daño y/o remodelación del endotelio vascular.

Puesto que la placentación anormal debida a fallos trofoblasticos también estaría implicada, mutaciones específicas en los genes que codifican para MMP que degradan matriz extracelular, jugarían también cierto papel.

### **3.2.2. Isquemia placentaria**

En el desarrollo placentario normal ocurre la proliferación de las células trofoblásticas. El trofoblasto invade la pared de la porción decidual de las arterias espirales (primera oleada), con destrucción de su capa muscular esquelética y con ello la desaparición de receptores para estímulos vasopresores neurógenos y humorales; posteriormente dicha invasión se extiende a la porción miometrial de las arterias espirales (segunda oleada). La primera oleada de sustitución, ocurre entre las semanas 10 y 16, cuando se sustituye la capa endotelial y la segunda ocurre entre las semanas 16 y 22, cuando se extiende a las porciones de la capa miometrial<sup>323</sup>. La consecuencia de lo anterior se traduce en que el feto obtiene un acceso directo a la sangre arterial materna, con lo cual, la madre no puede reducir los nutrientes de la sangre placentaria sin reducir los destinados a sus propios tejidos; La vascularización materno-fetal no puede controlar el volumen de sangre que llega a la placenta y la placenta puede secretar hormonas y otras sustancias directamente en la circulación de la madre. En la pre-eclampsia está ausente la invasión trofoblástica de la porción miometrial de las arterias espirales (segunda oleada), conservando a ese nivel la capa músculo-esquelética y los receptores para estímulos vasopresores, por tanto, no se da el cambio necesario de vasos de resistencia a vasos de capacitancia. Se ha determinado que el diámetro medio de las arteriolas espirales del miometrio en 50 mujeres embarazadas normales era de 500  $\mu\text{m}$  y en 36 mujeres con pre-eclampsia fue de 200  $\mu\text{m}$ <sup>324</sup>. Esta anomalía de las arterias espirales conduce a un aporte sanguíneo restringido, insuficiente para un feto en crecimiento, lo que produce isquemia placentaria y restricción del crecimiento fetal intrauterino. De esta manera, la placenta isquémica produce y libera sustancias citotóxicas con desprendimiento de tejido placentario, particularmente micropartículas de sincitio-trofoblasto, que provocan daño endotelial con la consecuente vasoconstricción y aumento de la presión arterial materna. Además al desarrollarse la disfunción endotelial, se producen aterosclerosis aguda y trombosis que predisponen a los infartos placentarios. Se ha sugerido que la severidad de la pre-eclampsia está correlacionada positivamente con la magnitud de la invasión trofoblástica defectuosa<sup>325</sup>.

### **3.2.3. Estrés oxidativo y metabolismo lipídico**

Esta hipótesis sostiene que elementos placentarios y maternos conducen a una pérdida del equilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, generándose estrés oxidativo sobre el endotelio comprometiéndose de esta manera su función. La producción de radicales libres es un hecho fisiológico en el organismo, pero este último dispone de elementos antioxidantes que minimizan el efecto nocivo del primero; cuando predomina el efecto pro oxidante (estrés oxidativo) entonces se produce la lesión endotelial. Los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poli insaturados de las membranas celulares (peroxidación lipídica) lesionando a estas con posterior muerte celular. Esta peroxidación lipídica causaría lisis de células endoteliales, fragmentación del endotelio y aumento de la permeabilidad<sup>326</sup>. También se ha observado que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (del inglés *low density lipoprotein*, LDL) produce lesión arterial inhibiendo la producción de óxido nítrico e hipoactividad de la enzima prostaciclina-sintetasa, con la consecuente disminución de la producción de prostaciclina. Las moléculas pequeñas y densas de LDL parecen tener más acceso al espacio subendotelial donde se unen a proteoglicanos y residen por más tiempo que las otras LDL. Estas partículas (más fácilmente oxidables) se oxidan en este espacio sin la protección de los antioxidantes circulantes. Las LDL oxidadas son

bastante reactivas; alteran las proteínas y fosfolípidos de membrana y aumentan la expresión de moléculas que intervienen en el reclutamiento de monocitos. El daño de la membrana altera la función endotelial mientras que los monocitos incorporan más LDL oxidadas para formar células espumosas y eventualmente estrías grasas características iniciales de la aterosclerosis<sup>327</sup>.

La actividad de la enzima tromboxano-sintetasa puede aumentar, lo que incrementa el desbalance prostaciclina/tromboxano A2 a favor de esta última acentuando sus efectos nocivos (vasoconstricción, incremento de la agregación plaquetaria, producción de endotelina y activación de la cascada de la coagulación)<sup>328</sup>. Las endotelinas son polipéptidos con la actividad vasoconstrictora más intensa; en el ser humano la única producida es la endotelina 1<sup>329</sup>. Los factores placentarios liberados pueden también incrementar la liberación de endotelina, tromboxano y angiotensinógeno. Estos factores vasoactivos incrementan las concentraciones de calcio intracelular y así estimulan la contracción del músculo liso vascular; adicionalmente el incremento de actividad de la proteincinasa C conduce a un incremento de sensibilidad de las miofibrillas al calcio e incremento del efecto vasoconstrictor<sup>329</sup>.

Durante el desarrollo placentario normal, el citotrofoblasto invade las arteriolas espirales maternas y las remodelan completamente para formas vasos de gran capacidad y de débil resistencia<sup>9</sup>. Esta invasión endovascular del citotrofoblasto implica el reemplazo, no solamente del endotelio, sino también de la túnica muscular media.

En la pre-eclampsia existe solo una invasión superficial por el citotrofoblasto de las arteriolas uterinas espirales lo cual conduce a una perfusión placentaria reducida y a una insuficiencia placentaria<sup>11</sup>.

Paradójicamente en la placenta normal existe poca o nula invasión de las vénulas uterinas. El mecanismo primario que conduce a una débil invasión/diferenciación trofoblastica en la pre-eclampsia es desconocido; sin embargo, factores genéticos, inmunológicos y ambientales (como la hipoxia y la malnutrición) desempeñan un papel importante (Figura 6).

Varios investigadores sugieren que las diferencias de tensión en O<sub>2</sub> serían el *primum movens* regulador de la capacidad invasiva del citotrofoblasto<sup>12</sup>. Se considera que la remodelación de las arteriolas espirales comienza al final del primer trimestre y se completa entre la 18 y 20 semanas. A pesar de que la edad gestacional en la cual cesa la invasión trofoblastica de las arteriolas es desconocida, los estudios histológicos han mostrado que la invasión trofoblastica disminuye en la columna decidual cuando la edad gestacional aumenta. La diferenciación del trofoblasto durante la invasión implica la modificación de la expresión de varios tipos de moléculas, incluyendo citocinas, moléculas de adhesión, MMP y de las moléculas HLA-G<sup>13</sup>.

En el curso de su diferenciación, el trofoblasto modifica el perfil de expresión de las moléculas de adhesión, pasando de un fenotipo epitelial (integrinas 6ab4, aVb5 y E-caderina) a un fenotipo endotelial (integrinas a1b1, a5b3, moléculas de adhesión de las plaquetas a las células endoteliales 1 (del inglés *platelet endothelial cell adhesion molecule* 1, PECAM-1) también llamada CD31 y V-caderina), un fenómeno que se ha denominado pseudo-vasculogenesis<sup>14</sup>.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el trofoblasto de las pacientes con pre-eclampsia no sufren estas modificaciones fenotípicas ni la pseudo-vasculogenesis<sup>15</sup>. Las vías de señalización que regulan esta pseudo-vasculogenesis podrían implicar una gran variedad de factores de transcripción, de factores de crecimiento y de citocinas<sup>16</sup>.

Estudios más recientes se han dirigido a conocer más exactamente los factores implicados en la angiogenesis como el factor de crecimiento del endotelio vascular (en inglés, *vascular endothelial growth factor*, VEGF), las angiopoyetinas y la familia de las

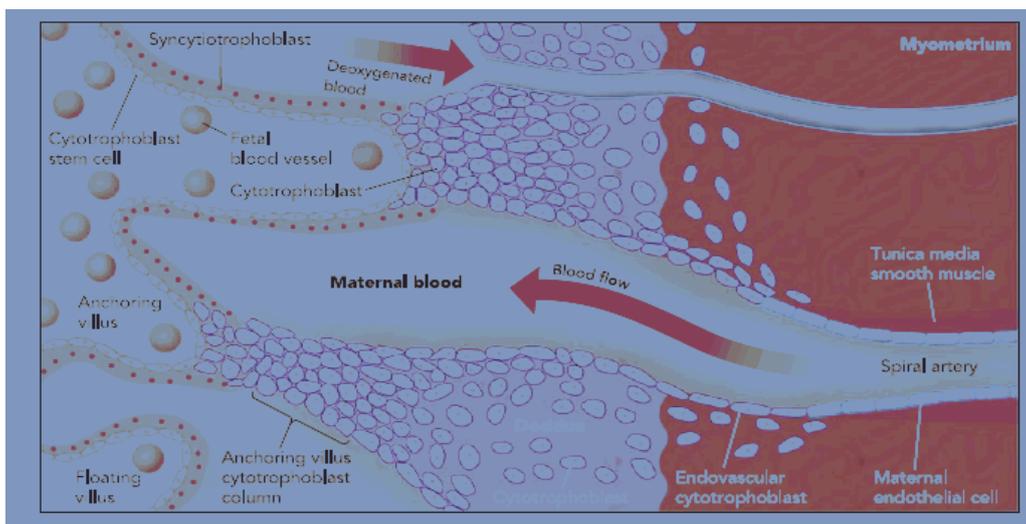
efrinas, entre otros. También se ha demostrado que el trofoblasto expresa VEGF, factor de crecimiento placentario (en inglés *placental growth factor*, PGF), VEGF-C y sus respectivos receptores<sup>17</sup>. Además, el bloqueo de sus vías de transducción disminuye la expresión de la integrina α1 (un marcador de pseudo-vasculogénesis) *in vitro*<sup>17</sup>. Pero ningún experimento *in vivo* ha podido implicar directamente a la vía del VEGF en el defecto de la pseudo-vasculogénesis.

Más recientemente, se ha demostrado que el trofoblasto invasivo expresa también L-selectinas, unas moléculas de adhesión necesarias para la extravasación de los leucocitos<sup>18</sup>. Se ha sugerido que las anomalías del sistema de las selectinas en la interfaz materno-fetal podrían ser los responsables de las anomalías de la implantación en la pre-eclampsia.

Finalmente, la expresión de moléculas HLA-G por el trofoblasto, unas moléculas cuya expresión está disminuida en la pre-eclampsia, podría proteger al trofoblasto del ataque por las células NK en el sitio de implantación<sup>19,63</sup>.

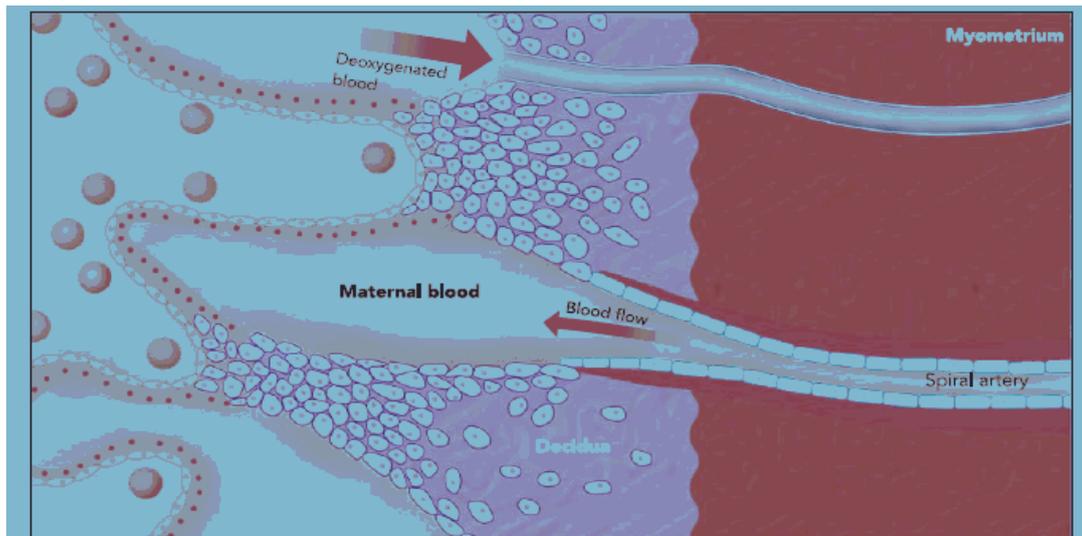
Las modificaciones secundarias de la placenta incluyen el ateroma, la necrosis fibrinoide, la trombosis y el infarto<sup>20</sup>. Aún cuando todas estas lesiones no están presentes en todas las pacientes, se ha encontrado una correlación entre la severidad de la enfermedad y la extensión de las lesiones.

La remodelación anormal de las arteriolas espirales origina una isquemia placentaria, que a su vez origina la secreción de factores solubles en la circulación materna; sin embargo, aún no se dispone de la prueba de una relación causal entre la placentación anormal y el síndrome materno<sup>7</sup> (Figura 7).



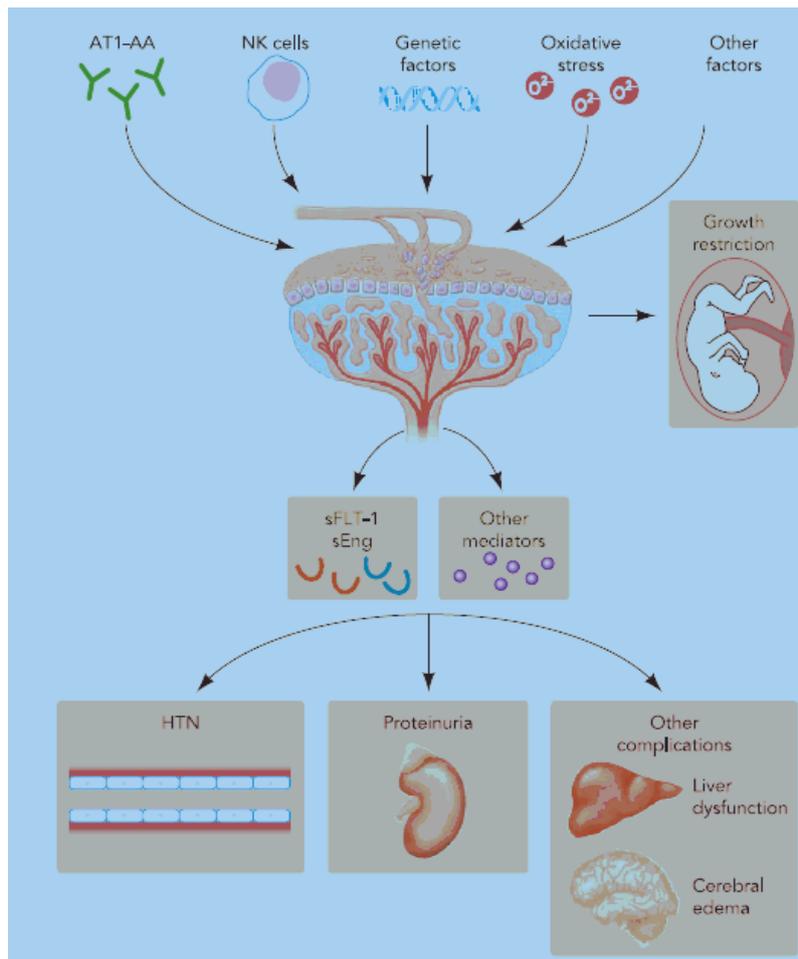
**Figura 6.** Distribución de las estructuras placentarias y flujo sanguíneo durante la placentación de un embarazo normal. Figura tomada de <sup>406</sup>.

En el desarrollo normal de la placenta, el citotrofoblasto invasivo de origen fetal invade las arterias espirales maternas, transformándolas desde vasos de baja resistencia en vasos de capacitancia de alta resistencia, capaces de proveer la adecuada perfusión de sustancias necesarias para el crecimiento fetal. Durante este proceso de invasión vascular, el citotrofoblasto se diferencia desde un fenotipo epitelial a uno endotelial, proceso conocido como pseudovasculogénesis o mimetismo vascular. En la pre-eclampsia el citotrofoblasto falla en el proceso de adoptar el fenotipo endotelial invasivo.



**Figura 7.** Placentación durante la pre-eclampsia<sup>406</sup>

La figura 8 muestra el resumen de eventos patogénicos en la pre-eclampsia: Factores inmunológicos, el estrés oxidativo, anomalías en las células NK y otros factores, causarían la disfunción placentaria, en la cual se incrementan factores angiogénicos y otros mediadores de la inflamación induciendo la tríada clásica del cuadro: hipertensión, proteinuria y edema entre otras complicaciones de la pre-eclampsia.



**Figura 8.** Eventos patogénicos en la pre-eclampsia<sup>406</sup>.

Resumen de los eventos patogénicos que ocurren en la pre-eclampsia.

El estrés oxidativo, anomalías en las células NK y otros factores podrían causar la disfunción placentaria. Esto permitiría el aumento de factores anti-angiogénicos y otros mediadores de la inflamación que inducirían HTA, proteinuria y otras complicaciones de la pre-eclampsia.

AT1-AA=Autoanticuerpos contra la angiotensina II tipo 1 (del inglés *angiotensin II receptor type 1 autoantibody*); sFLT-1=Tirosin-cinasa soluble similar a fms-1 (del inglés *soluble fms-like tyrosine kinase-1*); sEng= Endoglina soluble (del inglés *soluble endogline*)

### 3.3. Disfunción endotelial sistémica

Una disfunción endotelial generalizada podría explicar una gran parte de los aspectos clínicos de la pre-eclampsia: la HTA por alteración del control endotelial del tono vascular, la proteinuria por un aumento de la permeabilidad glomerular, la coagulopatía como resultado de la expresión anormal de los factores pro-coagulantes y la disfunción hepática secundaria a la isquemia<sup>21</sup>.

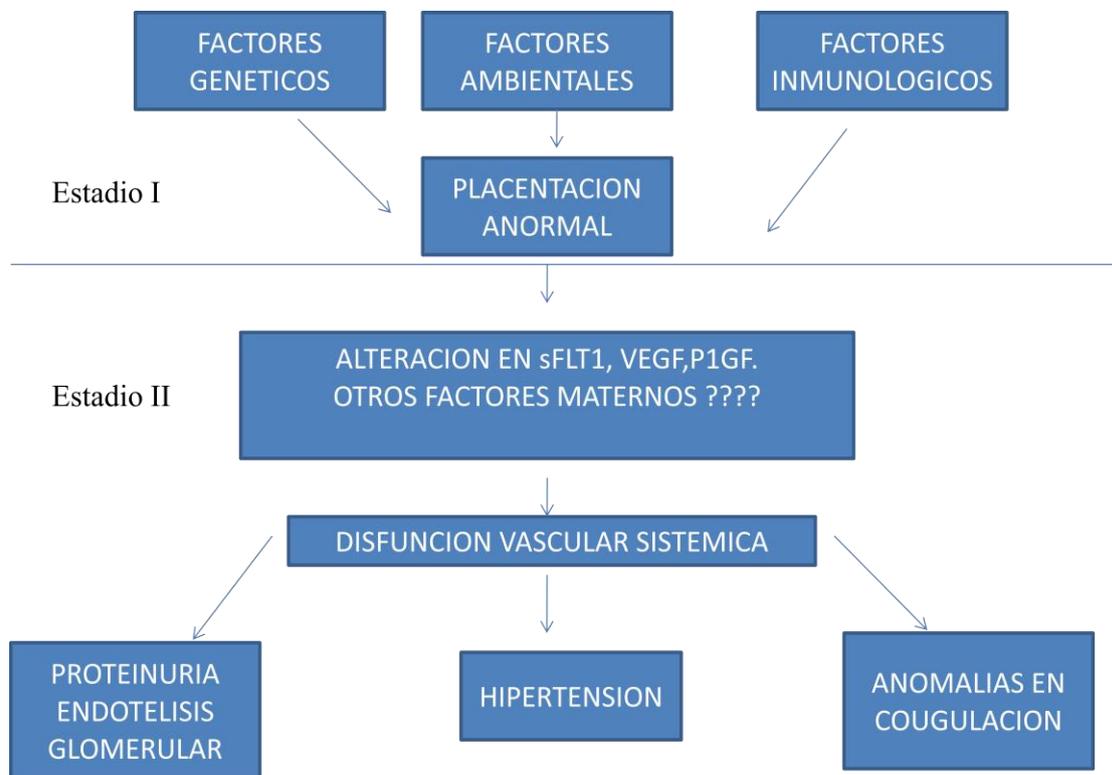
Los resultados de muchos estudios soportan la teoría de una disfunción endotelial como el origen de las lesiones maternas en la pre-eclampsia. Se ha descrito un aumento de las concentraciones circulantes de fibronectina, del factor VIII y de la trombosmodulina, todos marcadores de lesión endotelial<sup>22</sup>.

La vasodilatación inducida por el flujo se encuentra alterada en los vasos de las pacientes con pre-eclampsia lo cual sugiere una disfunción endotelial<sup>23</sup>. Una disminución de la producción de las moléculas vasodilatadoras derivadas del endotelio como las prostaciclina, un aumento de los niveles de las endotelinas y una reactivación acentuada a la angiotensina II sugieren igualmente una disfunción endotelial<sup>24</sup>.

Varios laboratorios han intentado identificar los factores circulantes responsables de esta disfunción endotelial. Algunos han descrito las alteraciones de las citocinas/factores de crecimiento/moléculas de adhesión tales como el TNF $\alpha$ , la IL6, la IL-1b, el Fas ligando, lípidos oxidados y la dimetilarginina asimétrica (del inglés *asymmetric di-methyl-arginine*, ADMA), los cuales son liberados por la placenta y otros tejidos maternos durante la pre-eclampsia<sup>1,27</sup>. Sin embargo no existe ninguna prueba de que alguno de estos factores sea responsable de la enfermedad.

Recientemente se ha descrito que la neurocinina-B (similar a la sustancia P) producida por las placentas en la pre-eclampsia, puede inducir una hipertensión transitoria en la rata, pero sin causar proteinuria ni endoteliosis glomerular<sup>28,66,345</sup>. Además se ha considerado que la hipersensibilidad a la angiotensina II, anomalía constante en la pre-eclampsia, podría ser secundaria a una hiperexpresión del receptor de la bradicinina (B2)<sup>29</sup>. Otros resultados recientes indican que pacientes con pre-eclampsia presentan una hiperexpresión y un aumento de secreción de los sFLT-1, que son antagonistas naturales del VEGF<sup>17, 30</sup>.

En la figura 9, se resume los factores involucrados en la patogenia de la pre-eclampsia.



**Figura 9.** Patogenia de la pre-eclampsia

El factor de inicio en la pre-eclampsia puede ser la reducción de la perfusión útero- placentaria, secundaria a una anomalía en la invasión de las arterias espirales uterinas por las células citotrofoblásticas extravelosas, asociada a alteraciones locales del tono vascular, del balance inmunológico y del estado inflamatorio, algunas veces con predisposición genética. Tomado de <sup>346</sup>

## **4. Polimorfismos genéticos**

### **4.1. Conceptos y definiciones**

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base. A éstos se les llama polimorfismos de un único nucleótido (del inglés *single nucleotide polymorphism*, SNP). Otros polimorfismos son repeticiones, en un número variable de veces, de una secuencia corta (del inglés *variable number tandem repeat*, VNTR). En otras ocasiones, los polimorfismos se deben a deleciones o inserciones de secuencias cortas de nucleótidos. El cambio de un único nucleótido, si ocurre en una zona codificante puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, y ello puede resultar en una modificación de su actividad o función. Los cambios también pueden ocurrir en zonas del promotor de un gen y modificar su expresión. Estas zonas promotoras modulan el proceso de transcripción del DNA en RNA. Lo mismo puede ocurrir si el cambio se produce en un intrón. Aunque los intrones no se traducen a proteína, cambios en su estructura pueden modular la expresión del gen. Otras veces, probablemente la mayoría, los cambios son silentes y no tienen repercusiones funcionales. Los estudios moleculares específicos podrían de manifiesto si los polimorfismos son funcionales por su parte los estudios epidemiológicos serían fundamentales para valorar si hay efectos en la salud de la población<sup>387-389</sup>.

Cuando el objetivo de un estudio es identificar un polimorfismo o variante en un gen que esté relacionado con una enfermedad se pueden emplear diferentes estrategias. En primer lugar, es importante obtener evidencia de que al menos una fracción de la enfermedad está determinada genéticamente. Para ello son útiles los estudios de agregación familiar, los de gemelos o los de emigrantes. En segundo lugar, hay que identificar dónde están los genes de interés para la enfermedad. En esta fase se realizan estudios denominados de ligamiento, que emplean como marcadores genéticos una serie de polimorfismos repartidos por todo el genoma. En estos estudios se suelen emplear familias grandes con varios miembros afectados y sus análisis permiten identificar zonas del genoma de interés, pero tienen poca resolución. En esas zonas identificadas puede haber centenares de genes interesantes y miles de polimorfismos candidatos. Para identificar con mayor precisión los genes de interés y, dentro de esos genes, el o los polimorfismos responsables, se emplean estudios de asociación, en los que se compara la frecuencia relativa de las diferentes variantes de una serie de polimorfismos entre los individuos afectados y un grupo control adecuado. Estos estudios suelen seleccionar «genes candidatos» (aquellos cuya función puede estar relacionada con la enfermedad de interés), y dentro de esos genes se busca como marcadores genéticos a determinados polimorfismos, normalmente de tipo SNP, repartidos a lo largo del gen.

En cuanto a la metodología de estudio, se suelen emplear diseños epidemiológicos clásicos basados en individuos no relacionados, como estudios de casos y controles o de cohortes. También se pueden emplear diseños basados en familias, en los que los individuos de control son parientes de los casos, como los diseños de casos y hermanos sanos o tríos (caso y padres)<sup>396</sup>.

Por tanto en epidemiología genética las estrategias de investigación son de dos tipos: descriptivas y analíticas<sup>352</sup>. Las descriptivas, tanto las de poblaciones como las de familias, se basan en el estudio del tiempo, el lugar y la persona. Los estudios analíticos, por el contrario, tienen como objetivo identificar la función de factores genéticos en la historia natural de las enfermedades, tanto en poblaciones como en familias.

En el caso de enfermedades de herencia multifactorial, se distinguen dos componentes: el atribuible a diferencias genéticas y el originado por diferencias en exposiciones ambientales<sup>353</sup>. La evaluación de los factores de riesgo puede incluir exposiciones ambientales o características genéticas. Estas últimas pueden ser tanto productos genéticos, como proteínas o enzimas, o marcadores genéticos basados en secuencias de DNA.

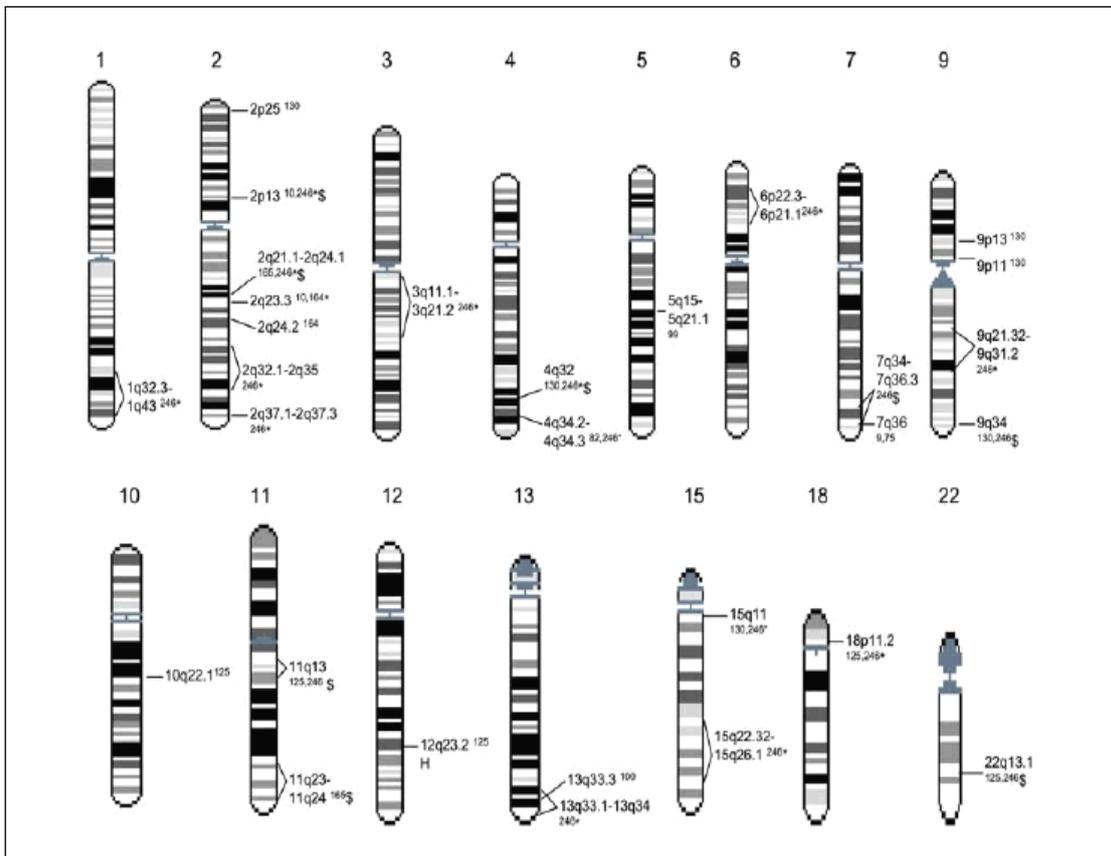
#### **4.2. Genes asociados a pre-eclampsia.**

El cambio de un nucleótido por otro es una mutación que, cuando se presenta en más del 5% de la población, se le conoce como SNP<sup>347,348</sup>. En algunos casos, la herencia de un solo “error” en un único gen lleva a una enfermedad. Debido a su origen, estas enfermedades son llamadas monogénicas. Un sistema complejo, son las enfermedades poligénicas, que en la mayoría de estas ocurre un fenómeno conocido como “pleiotropía”, término que alude a los efectos de muchos genes para desencadenar una patología. Una de estas entidades es la pre-eclampsia.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polimerase chain reaction*, PCR) que han supuesto un avance importante en el estudio de muchas enfermedades, donde aquellas de origen poligenico adquieren gran relevancia<sup>349</sup>.

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos, que son aquellos que están basados en características fisiológicas o bioquímicas y genotípicos, aquellos que basan su información en el estudio del DNA<sup>350</sup>. Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y con menor poder de discriminación que los genotípicos; esto se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del fenotipo con el ambiente y, por tanto es susceptible de modificarse al cambiar las condiciones ambientales a las que se encuentra expuesto el individuo. Sin embargo, el paradigma de los factores ambientales que interactúan con el genoma en el origen de ciertas enfermedades surgió ya a mediados del siglo XIX, cuando se observó que ciertos individuos se caracterizaban por presentar mayor grado de resistencia a un grupo de enfermedades infecciosas que otros. No obstante pasaron más de 100 años para que se desarrollasen los primeros métodos analíticos para identificar factores ambientales y genéticos involucrados en proceso patológicos. El gran avance de la biología molecular en las últimas décadas ha permitido desarrollar nuevos y mejores métodos genotípicos de tipificación.

Es bien conocido que la predisposición genética influye acentuadamente en cada uno de los pasos que componen la cascada fisiopatológica de la pre-eclampsia<sup>402</sup>. Por ello se ha realizado múltiples investigaciones para explorar tales factores genéticos, tratando de identificar las regiones cromosómicas (ver figura 10) y genes candidatos, cuyas variantes estén relacionadas con una mayor susceptibilidad a la enfermedad.



**Figura 10.** Regiones de susceptibilidad para pre-eclampsia y su localización cromosómica. Figura tomada de <sup>174</sup>.

Diversos estudios de asociación han relacionado algunos genes de susceptibilidad a pre-eclampsia, los cuales se muestran en las tablas IX y X. Sin embargo, los resultados no han sido replicados consistentemente en algunos de estos trabajos al estudiar diferentes poblaciones y genes aislados; esto se debe a la complejidad clínica y genética, característica de la enfermedad. Con respecto a esto último, se considera que la pre-eclampsia es una enfermedad genéticamente compleja porque no sigue un patrón de herencia mendeliano y porque, además de presentar variabilidad fenotípica (expresividad variable, penetrancia incompleta y fenocopias), presenta variabilidad genotípica (heterogeneidad genética, pleiotropismo y epistasis o interacción entre los productos de los genes)<sup>403,404</sup>. Esto hace considerar siempre la influencia de otros genes asociados, adicionales al que se está estudiando. Con este referente, se han realizado estudios de ligamiento genético a través de los cuales se evalúa la transmisión de los genes de la enfermedad en conjunto con determinados marcadores genéticos. Por su proximidad a los genes en cuestión, dichos marcadores señalan regiones cromosómicas candidatas que facilitan el levantamiento del mapa de posibles genes implicados en la pre-eclampsia<sup>405</sup>.

**Tabla IX.** Descripción de los principales genes relacionados con susceptibilidad a pre-eclampsia\*

MECANISMO FISIOPATOLÓGICO	GEN	LOCALIZACIÓN	ALELO DE RIESGO	TÉCNICA DE GENOTIPADO
Alteración en el control de la presión arterial y en la remodelación de arterias espirales y placentación	<i>AGT</i>	1q42-43	T235/G(-6)A	PCR-RFLP
	<i>ACE</i>	17q32	Ins/Del(intron)	PCR
	<i>AT-1</i>	3q21-q25	T573/ G1062 C1166	PCR-RFLP
	<i>REN</i>	1q32	↑Expresión	PCR-RFLP
Alteración en el control de esta. Modificación en la remodelación vascular y endotelial	<i>ET-1</i>	6p23-24	Asn198	PCR-RFLP
	<i>NOS3</i>	7q36	Asp298	PCR-RFLP
Inducción de hiperhomosteinemia que produce lesión endotelial y trombosis	<i>MTHFR</i>	1p36.3	T677	PCR-RFLP
	<i>CBS</i>	21q22.3	844ins68	PCR-RFLP
Tendencia a trombosis Hiperfibrinólisis Infartos placentarios	<i>F2</i>	11p11-q12	A20210	PCR-RFLP
	<i>FVL</i>	1q24	FL+; G1691A	PCR-RFLP
	<i>GPIIIa</i>	17 q21-23	T98 (33Pro)	PCR
	<i>PAI-1</i>	7q21.3-q22	-675 4G/4G -844 A/A	PCR-RFLP
Inadecuada remodelación temprana del intersticio e invasión trofoblástica alterada	<i>MMP1</i>	11q22.2	2G	PCR
Aumento del potencial oxidativo, lesión endotelial. Aumento especies reactivas	<i>EH</i>	-	Tyr113, Arg139	-
	<i>ApoE</i>	19q13.2	-491A/T ε4	PCR-RFLP
	<i>SOD1</i>	-	↓ expresión	-
	<i>GSTP1</i>	-	Val105	-
Alteración de la tolerancia inmunitario materno fetal; alterada invasión trofoblástica y placentación junto con una respuesta inflamatoria y lesión endotelial	<i>HLA-G</i>	6p21.3	T107	PCR-RFLP
	<i>HLA-DRB</i>	-	A11	-
	<i>HL-DR4</i>	6p21.3	HLA-DRB1 DR4	-
	<i>TNFα, IL1β</i>	6p21.3	TNFα2; -511T,E2.	PCR-RFLP

AGT: angiotensinogeno, ACE: enzima convertidora de angiotensina; AT-1: receptor de angiotensina II tipo 1; ET-1: endotelina 1; eNOS: sintetasa del óxido nítrico endotelial; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; CBS: cistationina B sintetasa; F2: protrombina; FVL: factor V de Leiden; PAI-1 inhibidor del activador del plasminogeno 1; MMP-1: metaloproteinasas 1; MEC: matriz extracelular; EH: epóxido hidrolasa; SOD1: superóxido dismutasa; GSTP1: glutatión S transferasa.

\*Copiado y modificado de <sup>49,410</sup>.

En la tabla X se esquematizan los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y los genes asociados esta en cada uno de ellos. Además la tabla XI hará referencia a cada uno de estos procesos mostrando los genes asociados y el numero de estudios realizados con ellos tanto en los estudios confirmados como no confirmados.

**Tabla X.** Resumen de los factores fisiopatológicos relevantes en pre-eclampsia y sus correspondientes genes candidatos\*

DESÓRDEN	DIANA PRINCIPAL	GENES	CONSECUENCIA FINAL
Metabolismo lipídico	Endotelio	<i>LPL, ApoE, LCHAD</i>	Pre-eclampsia
Estrés oxidativo	Endotelio	<i>EPHX, GSTP1, CYP1A1, SOD</i>	Pre-eclampsia
Isquemia placentaria	Placenta	<i>STOX-1, SERPINA 3, ACVR 2, IGFI, IGFI</i>	Pre-eclampsia
Isquemia placentaria	Vasos, Angiogénesis	<i>AGT, eNOS, ACE, AT1R, PRCP, VEGF, PIGF</i>	Pre-eclampsia
Isquemia placentaria	Hemostasis	<i>FVL, MTHFR, Protombina, CBS, PAI-, FXIII, FVII, GPIIIa</i>	Pre-eclampsia
Isquemia placentaria	Sistema inmunitario	<i>HLA-G, TNF<math>\alpha</math>, IL-1, IL-10, CD14R, CTLA- 4</i>	Pre-eclampsia

\*Basada en <sup>174</sup>

**Tabla XI.** Polimorfismos en diversos genes y estudios sobre riesgo en pre-eclampsia\*

GEN	POLIMORFISMO	ESTUDIOS REALIZADOS (CONFIRMADOS)
<b>Genes vasoactivos</b>		
<i>AGT</i>	M235T	16(5)
	T174M	2(1)
<i>ACE</i>	Intron 16 ins/del	13(4)
<i>AT1R</i>	1166A>C	9(1)
<i>Renina</i>	1051G>A	1(0)
<i>PRCP</i>	E112D	1(0)
<i>ET-1</i>	K198N	1(0)
<i>ER<math>\alpha</math></i>	Pvull	1(0)
	Codón 10 T>C	1(0)
	Codón 87 G>C	1(0)
	rs928554	1(0)
<i>ER<math>\beta</math></i>	rs1256030	1(0)
	C_11462708_1_	1(0)
	rs1048315	1(0)
<i>eNOS</i>	E298D	16(4)
<i>VEGF</i>	405 G>C	1(1)
	-2578 C>A	2(0)
	936 C>T	1(1)
	-634G>C	1(0)
<b>Genes asociados a trombofilias</b>		
<i>Factor V</i>	1691G>A	43(15)
<i>MTHFR</i>	677C>T	42(8)
<i>Protrombina</i>	20210G>A	25(3)
<i>PAI-1</i>	-675 4G/5G	11(2)
<i>GP IIIa</i>	98C>T	2(1)
<i>Fibrinogeno <math>\beta</math></i>	-455G>A	1(0)
<i>Factor XIIIa</i>	V34L	2(0)
<i>Cistationin <math>\beta</math></i>	844 ins68	2(0)
<i>sintetasa</i>	699C>T	1(0)
	1080C>T	1(0)
<i>Factor VII</i>	-323ins/del	1(0)

\*Copiado y modificado de <sup>174</sup>.

**Tabla XI.** Polimorfismos en diversos genes y estudios sobre riesgo en pre-eclampsia (continuación)\*

GEN	POLIMORFISMO	ESTUDIOS REALIZADOS (CONFIRMADOS)
<b>Genes asociados al estrés oxidativo/metabolismo lipídico</b>		
<i>EPHX</i>	<i>Exon3Tyr113His</i>	4(1)
	<i>Exon4His139Arg</i>	3(0)
<i>GST</i>	<i>GST1b Ile105Val</i>	3(1)
	<i>GSTM1delección</i>	1(0)
	<i>GSTT1 delección</i>	1(0)
<i>CYP1A1</i>	<i>Exon7 Ile462Val</i>	2(0)
<i>SOD2</i>	<i>Val 9 Ala</i>	1(0)
<i>LPL</i>	<i>-93T&gt;G</i>	2(0)
	<i>Exon2 Asp9Asn</i>	3(0)
	<i>Exon6 Asn291Ser</i>	4(2)
	<i>Exon9 Ser447X</i>	4(0)
<i>ApoE</i>	$\epsilon 2$	6(1)
	$\epsilon 3$	6(0)
	$\epsilon 4$	6(0)
<i>CETP</i>	<i>TaqIB B1/B2</i>	1(0)
	<i>Arg451Gln</i>	1(0)
<i>LIPC</i>	<i>-514C&gt;T</i>	1(0)
<i>LIPE</i>	<i>-60C&gt;G</i>	1(0)
<i>ApoCIII</i>	<i>-428C&gt;T</i>	1(0)
<i>MPO</i>	<i>-463G&gt;A</i>	1(0)
<i>NADPH/NAD Oxidasa</i>	<i>242C&gt;T</i>	1(0)
<b>Respuesta inflamatoria/inmunológica</b>		
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>-308G&gt;A</i>	10(2)
	<i>-850C&gt;T</i>	1(1)
	<i>-4845T&gt;G</i>	1(1)
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>-889T&gt;C</i>	1(1)
	<i>rs3783550</i>	1(1)
	<i>-511C&gt;T</i>	3(0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>-3957C&gt;T</i>	1(0)
	<i>Exon5 3953 E1/E2</i>	2(0)
<i>IL-1 RA</i>	<i>IL-1RA</i>	3(1)
<i>IL-6</i>	<i>-174G&gt;C</i>	3(0)
	<i>-592C&gt;A</i>	1(0)
	<i>-819C&gt;T</i>	3(0)
<i>IL-10</i>	<i>-1082G&gt;A</i>	4(2)
	<i>-2849G&gt;A</i>	3(1)
<i>IFN <math>\gamma</math></i>	<i>874A&gt;T</i>	2(0)
<i>TGF <math>\beta</math></i>	<i>10T&gt;C/25C&gt;G</i>	1(0)
<i>CD14 receptor</i>	<i>-260C&gt;T</i>	1(1)
<i>CTLA-4</i>	<i>49A&gt;G</i>	1(1)

\*Copiado y modificado de <sup>174</sup>.

Por otra parte, la tabla XII, nos muestra algunos de los estudios basados en análisis de ligamiento reportados en la literatura realizados en pre-eclampsia<sup>177</sup>.

**Tabla XII.** Estudios de análisis de ligamiento en pre-eclampsia\*

ANÁLISIS	INVESTIGADORES	AÑO	ESTUDIO
Ligamiento de AGT	Arngrímsson et al	1993	Angiotensinogeno: ¿un gen candidato involucrado en pre-eclampsia?
Ligamiento de NOS3	Arngrímsson et al	1997	Evidencia de un locus familiar en la región del gen eNOS asociado a hipertensión inducida por el embarazo.
Ligamiento con la región cromosómica 2p, 3p y 15q	Arngrímsson et al	1999	Un scan del genoma revela locus de susceptibilidad materna a pre-eclampsia en el cromosoma 2p13
	Moses et al	2000	Un rastreo del genoma en familias australianas y de Nueva Zelanda confirma la presencia de un locus de susceptibilidad materna para preeclampsia en el cromosoma 2.
	Lachmeijer et al	2001	Un rastreo del genoma para pre-eclampsia En Holanda.
	Laivuori et al	2003	Locus de susceptibilidad para pre-eclampsia en el cromosoma 2p25 y 9p13 en familias finlandesas.
Asociación entre el marcador de microsatélites D2S286 y la región 2p	Laasanen et al	2003	Marcador de microsatelite asociado a la región 2p13 en pacientes finlandesas con pre-eclampsia y colestasis obstetrica sugieren un locus de riesgo común.
	Laivuori et al	2003	Locus de susceptibilidad para pre-eclampsia en el cromosoma 2p25 y 9p13 en familias finlandesas.

\*Copiado y modificado de <sup>177</sup>.

### 4.3. Otros genes candidatos de asociación con pre-eclampsia

#### 4.3.1. Posibles nuevos genes candidatos a ser asociados con pre-eclampsia.

Dentro de las hipótesis planteadas en el estudio de las posibles etiologías de la pre-eclampsia se han considerado la placentación, la decidualización y la invasión del trofoblasto como posibles dianas etiológicas principales, ya que, tras el parto, desprendida la placenta, el proceso patológico se detiene.

En el proceso de placentación actúan varios factores vasculares, inmunológicos y genéticos que se ven afectados por agentes externos que podrían igualmente jugar un papel en la fisiopatología de la entidad. Veamos algunos de ellos y las razones por las que podrían ser seleccionados como genes candidatos. Tres genes y sus productos génicos están implicados en la placentación y el embarazo.

La enzima catecol-*O*-metiltransferasa (del inglés *catechol-O-methyl-transferase*, COMT) cataliza la síntesis de un derivado del estradiol, el 2-metoxiestradiol (del inglés *2-methoxyestradiol*, 2-ME). En condiciones normales la concentración sérica de 2-ME aumenta a medida que prospera el embarazo y esta actividad COMT está suprimida en las mujeres que tienen pre-eclampsia<sup>102</sup>.

El gen *COMT* codifica la síntesis de la enzima y se ubica en el cromosoma 22, en concreto en la región 22q11.1-22q11.2<sup>330</sup>. Este gen contiene un polimorfismo en el codón 158 con la sustitución de la base purínica guanina por adenina. Esta transición de un solo nucleótido condiciona el remplazo del aminoácido valina por metionina en la enzima codificada por el gen, dando lugar al llamado *val158met*<sup>154</sup>. Es ampliamente aceptado que la variación genética en el codón 158 del gen *COMT* es la principal causa de alteración de la función enzimática en humanos<sup>153,154</sup>. Los genotipos y alelos *COMT* se relacionan con las concentraciones de actividad enzimática *COMT* de tal forma que: (i) el genotipo *Val/Val* condiciona la máxima actividad *COMT* H-H; (ii) *Val/Met* la intermedia *COM* H-L y (iii) *Met/Met* la más baja *COMT* L-L de 3 a 4 veces menor actividad.<sup>153</sup> Algunos estudios plantean que una alteración *COMT/2ME* debido a un genotipo *COMT*, favorecería una concentración elevada de HIF-1, permitiendo una disfunción en la angiogénesis y una insuficiencia placentaria.<sup>102</sup> Este incremento afecta la invasión trofoblástica provocando defectos vasculares, hipoxia e inflamación. Esto a su vez genera una menor concentración de estrógenos placentarios, y por ende, menor *2ME* creándose un círculo vicioso<sup>102</sup>.

Se ha descrito también la importancia de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo vascular<sup>59</sup>. La etiología de la hiperhomocisteinemia es muy variada, produciéndose concentraciones elevadas de homocisteína en sangre en diferentes entidades nosológicas. No obstante, en la población general, es mucho más frecuente encontrar sujetos con homocisteína baja o moderadamente elevada, sin padecer ninguna enfermedad de base<sup>59</sup>. La principal causa de hiperhomocisteinemia moderada en nuestro medio es una mutación en la posición 677 del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (del inglés *methylene tetra-hydrofolate reductase*, (*MTHFR*), que consiste en un cambio de citosina (C) por timina (T) y, por consiguiente, un cambio de alanina (ala) por valina (val) en la proteína<sup>59</sup>.

El 73 % de pacientes con homocisteína superior a 40  $\mu\text{mol/l}$  son homocigotos para C677T *MTHFR*<sup>2,56</sup>. La prevalencia de homocigotos para esta mutación en la población europea oscila entre el 5 y el 15%<sup>59</sup>. La mutación C677T en el gen *MTHFR* provoca una variedad termolábil de dicha enzima que, en los sujetos homocigotos (genotipo *TT*), muestra una reducción cercana al 50% en la capacidad de donar grupos metilo a la enzima metionina sintetasa con lo que disminuye la velocidad de conversión de homocisteína hacia metionina, elevándose las concentraciones de homocisteína<sup>57</sup>. Se ha descrito concentraciones elevadas de homocisteína en la circulación materna o fetal que se asocia con enfermedad vascular placentaria y con el riesgo de pre-eclampsia en la madre y/o retardo del crecimiento intrauterino en el feto<sup>331</sup>. Se han realizado estudios donde se encontraron concentraciones más elevadas de homocisteína en embarazos complicados por pre-eclampsia. Los resultados apoyan que la hiperhomocisteinemia puede ser un marcador de riesgo para enfermedad vascular placentaria y pre-eclampsia materna<sup>332</sup>.

Las MMP son una familia de endopeptidasas que contienen zinc capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular (del inglés *extracellular matrix*, ECM) tanto intersticial como de la membrana basal<sup>333</sup>. Se cree que las MMP desempeñan un papel importante en la progresión tumoral y en las metástasis<sup>293</sup>. Se conocen hasta el momento veintiséis en mamíferos y veinte dos en humanos. Las MMP en humanos se agrupan en cinco clases de acuerdo a su estructura primaria y a la especificidad del sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, tipo de membrana y las no clasificadas<sup>334</sup>.

Las MMP regulan el comportamiento de la célula de muchas maneras: (i) por la interacción célula-matriz y célula-célula; (ii) por la activación o inactivación de señales moleculares autocrinas o paracrinas y de los receptores de superficie celular y permitiendo la degradación de la ECM, generando la invasión. La regulación se ejerce en la fase transcripcional y durante la secreción, la activación, la inhibición y la degradación<sup>335</sup>.

Estudios *in vitro* sugieren que el éxito de la implantación y placentación son el resultado de un equilibrio entre la secreción de MMP del trofoblasto y sus inhibición por TIMPs<sup>336</sup>. Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 degradan colágeno tipo IV<sup>337</sup>, el principal componente de la membrana basal y por tanto se considera que son unas enzimas claves en el proceso de la implantación, ya que permiten la invasión de las células trofoblasticas a través de la decidua materna y de la vascularización<sup>294</sup>.

Se ha descrito que las MMP-2 se expresa preferiblemente durante el primer trimestre mientras que la MMP-9 predomina más tardíamente<sup>338</sup>. Por otra parte es conocido que pueden tener otras funciones durante el proceso de implantación tales como el proceso de activación del TGF- $\beta$ <sup>339</sup> o modulando ciertos factores angiogénicos<sup>340</sup>.

Además de estos tres genes, debemos considerar también a un miembro del complejo principal de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*, MHC) de clase I no clásico, el HLA-G; al cual se le ha asignado un papel en el embarazo<sup>411,412</sup>. El HLA-G se expresa principalmente en el trofoblasto extraveloso (del inglés *extravillous trophoblast*, EVT) del tejido de la decidua y además permite la inhibición de las células NK uterinas maternas del trofoblasto<sup>41</sup>. Esta interacción es esencial en el balance inmunológico feto-materno necesitado para una óptima invasión trofoblastica durante la placentación. En los embarazos pre eclámpticos, la expresión de moléculas HLA-G en el EVT está reducida, asociándose como papel causante de la insuficiencia placentaria<sup>412</sup>.

El HLA-G tiene más de veinte alelos que se diferencian<sup>413</sup> y se expresan cuatro isoformas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3 y -G4) y tres isoformas solubles (HLA-G5, -G6 y -G7)<sup>414</sup>.

Ciertos alelos específicos de HLA-G se han asociado con pre-eclampsia<sup>321</sup>. Uno de estos alelos asociados a dicha entidad clínica, ha sido la presencia de una inserción de 14 pares de bases en la región no traducida en 3' (del inglés *3'-untranslated region*, UTR) en el exón 8<sup>304</sup>. Se describió que el polimorfismo en el gen *HLA-G* conocido como inserción *14bp* está asociado con menor expresión de su mRNA<sup>304</sup> como también en el HLA-G soluble en suero.

Varios estudios han enfocado el papel específico del polimorfismo *HLA-G 14bp* en pre-eclampsia<sup>262, 304, 321, 415, 416</sup>. Sin embargo los resultados son contradictorios. Algunos muestran que el genotipo materno *HLA-G 14bp* no tiene influencia en el desarrollo de la entidad. Se han descrito tanto asociaciones positivas<sup>304, 321</sup> como negativas<sup>262,416</sup> en relación con la pre-eclampsia.

### 4.3.2. Aspectos genéticos, bioquímicos y moleculares de los polimorfismos a estudiar.

#### 4.3.2.1. Catecol-O-metiltransferasa (COMT)

**Definición:** Es una de las enzimas que degradan catecolaminas (e.g: dopamina, adrenalina y noradrenalina). Esta codificada por el gen *COMT*.

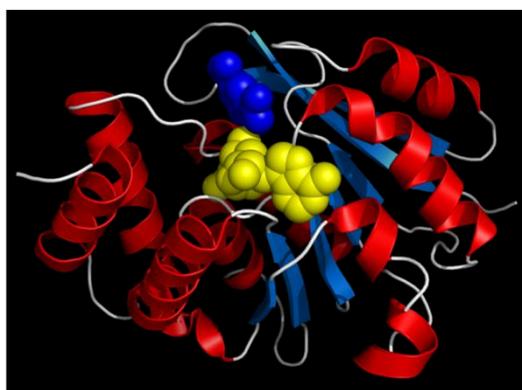
**Sinonimia:** No tiene

**Símbolo:** COMT

**Identificador OMIM:** 116790

**Identificador NC-IUBMB:** EC 2.1.1.6

**Estructura:** La enzima COMT introduce un grupo metilo a las catecolaminas, el cual es donado por la S-adenosil metionina, siendo pues sustrato de esta cualquier compuesto que tenga estructura catecol como lo son los catecolestrógenos y los catecolflavonoides. En la figura 11, se muestra la estructura tridimensional de la enzima



**Figura 11.** Diagrama de cintas de la estructura molecular propuesta para la COMT. Se muestra la enzima interaccionando con la S-adenosil-metionina (en amarillo) y con el 3,5-dinitrocatecol (en azul intenso). Estructura generada por Schrodinger, Inc., GNU Image Manipulation Program y PyMOL.

**Función y Genética:** La COMT interviene en el metabolismo de la dopamina y la noradrenalina y el gen que la codifica se encuentra ubicado en el cromosoma 22q11.2<sup>146</sup>. La sustitución de un nucleótido por otro crea el polimorfismo *Val/Met158*, que provoca cambios en la actividad de la COMT<sup>147</sup>. La enzima COMT, cataliza la transferencia de un grupo metilo de la coenzima S-adenosil-metionina (del inglés, S-adenosylmethionine, SAM), a uno de los grupos hidroxilo de las catecolaminas, en presencia de magnesio, para degradarlas. Es la principal enzima de los mamíferos involucrada en la degradación metabólica de la dopamina liberada (más de 60% de la degradación metabólica de la dopamina en la corteza frontal) e igualmente está involucrada en el degradación del estradiol en sus metabolitos, los catecol-estrógenos<sup>149</sup>.

La enzima es codificada por el gen *COMT*, en el cromosoma 22 que tiene dos alelos polimórficos (Val=valina o H=high o G=guanina y Met=metionina o L=low o A=adenina) y da lugar a tres genotipos [*Val/Val* (HH=actividad enzimática alta), *Val/Met* (HL=actividad enzimática media) y *Met/Met* (LL=actividad enzimática baja)]. Los polimorfismos del gen determinan la actividad de la enzima y la capacidad de

degradar o inactivar las catecolaminas<sup>102,153,176,268, 272,274</sup>. A continuación la tabla XII, nos muestra la distribución en la población española de las frecuencias genotípicas y alélicas del mismo.

**Tabla XIII.** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *Val/Met* del gen *COMT* encontradas en diferentes poblaciones del mundo.\*

POBLACIÓN	N	FRECUENCIA GENOTÍPICA			FRECUENCIA ALELICAS	
		<i>Val/Val</i>	<i>Met/Val</i>	<i>Met/Met</i>	<i>Val</i> (H o G)	<i>Met</i> (L o A)
España	113	0,31	0,50	0,19	0,57	0,43
Perú	106	0,42	0,51	0,07	0,68	0,32
Colombia	168	0,78	0,20	0,02	0,88	0,12
Ghana	195	0,55	0,39	0,06	0,74	0,26
Kenia	102	0,44	0,47	0,09	0,68	0,32
Rusia	48	0,29	0,40	0,31	0,49	0,51
Inglaterra	265	0,22	0,47	0,31	0,45	0,54
EE UU	129	0,24	0,54	0,22	0,51	0,49
Sureste Asiático	99	0,29	0,43	0,27	0,51	0,49
Taiwán	125	0,53	0,44	0,03	0,75	0,25
China	98	0,67	0,30	0,03	0,82	0,18

\*Basado en lo comunicado por Palmatier et al. & DeMille et al y en la base de datos ALFRED.

N= número de individuos.

Los polimorfismos del gen *COMT* determinan la actividad de la enzima *COMT* y la capacidad de degradar o inactivar las catecolaminas (Ver figura 12). Por ello, factores genéticos que afecten la función de *COMT* podrían también afectar la función dopaminérgica

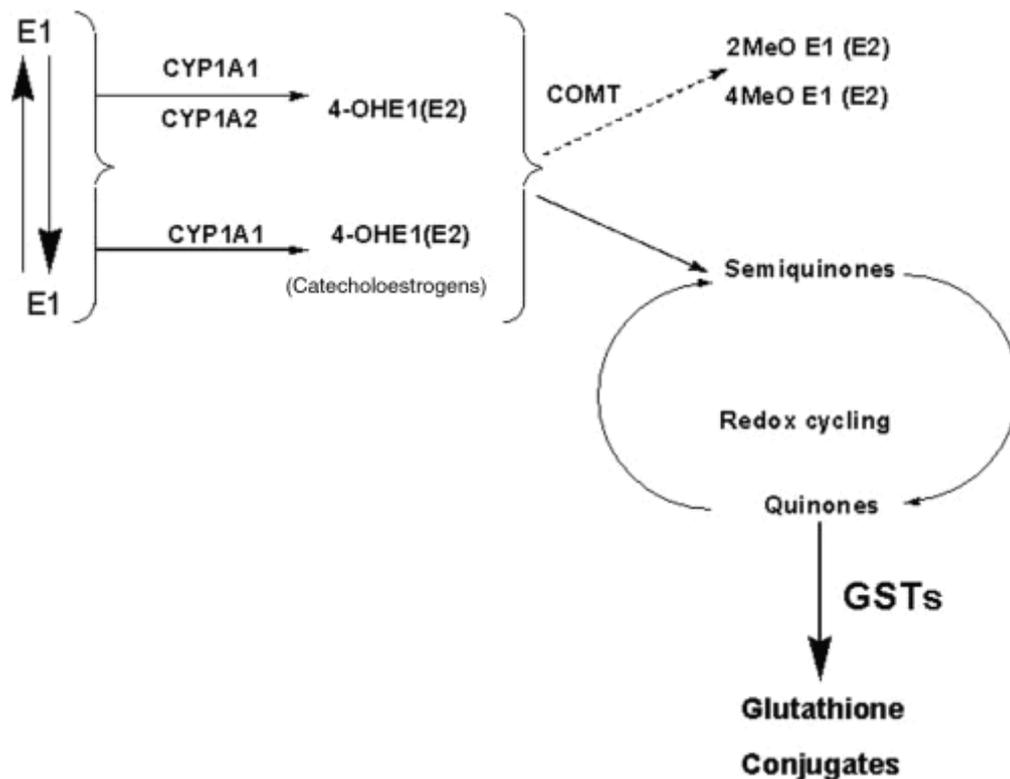
En detalle, este gen contiene una mutación reciente en términos evolutivos en la que una guanina (G) es reemplazada por una adenina (A) y que en la proteína se manifiesta por la presencia de una metionina (Met) en vez de una valina (Val), en el codón 108 (forma soluble de la *COMT*) o el codón 158 (forma unida a la membrana de la *COMT*); por eso, la denominación *Val108/158Met*. La enzima que contiene metionina es inestable a 37°C y su actividad es cuatro veces menor con respecto a la enzima que contiene valina. Los alelos *Met* y *Val* son codominantes y los individuos heterocigotos tienen una actividad enzimática que es intermedia con respecto a los individuos homocigotos. La alta actividad relacionada con el alelo *Val* produce un mayor catabolismo de la dopamina y en contraparte el alelo *Met* se relaciona con un menor catabolismo, lo cual puede estar asociado con diferentes condiciones y características neuropsiquiátricas. Este polimorfismo funcional del gen, por otro lado, se ha demostrado es variable en las distintas poblaciones humanas, y su estudio en relación a enfermedades neurológicas, mentales y características complejas en poblaciones saludables está relacionado con las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes grupos raciales, como por ejemplo algunas poblaciones africanas, donde se ha demostrado que el alelo de baja actividad alelo *Met* es menos común, o en poblaciones turcas, que son las mismas que las poblaciones caucásicas, pero diferentes a las orientales<sup>149</sup>.

Las enfermedades neurológicas que están relacionadas con actividad dopaminérgica y, por tanto, al gen *COMT* y las enzimas que metilan catecolaminas, son

los trastornos de Alzheimer, de Huntington y de Parkinson, las cuales han sido estudiadas en poblaciones europeas, asiáticas y norteamericanas<sup>180</sup>.

En enfermedades mentales, como la esquizofrenia, se ha establecido asociación del gen *COMT* y sus variantes enzimáticas con ciertos endofenotipos de la función cognitiva y memoria, principalmente con los genotipos que tienen el alelo *Val*. También, está involucrado en la respuesta diferencial a los fármacos utilizados en esta enfermedad.

Este polimorfismo ha sido también asociado a otras patologías, como alcoholismo, conducta agresiva, problemas de aprendizaje, la respuesta diferencial a los neurofármacos, estrés, psicosis, adicción, sensibilidad al dolor, entre otras, y ciertas características neuropsicológicas en sujetos sanos<sup>180</sup>.



**Figura12.** Catabolismo de los estrógenos

Catabolismo de estrógenos por diferentes vías enzimáticas de citocromos (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), COMT y glutation-*S*-transferasa (GSTs) y formación de catecholestrogénos.

E1=estrón; E2=estradiol; 2-OHE1(E2), 2-hidroxiestrón(estradiol); 4-OHE1(E2)=4-hidroxiestrón(estradiol); 2-MeOE1(E2)=2-metoxiestrón(estradiol); 4-MeOE1(E2)=4-metoxiestrón(estradiol).

#### 4.3.2.2. Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

**Definición:** Es una de las enzimas que cataliza la conversión 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metilentetrahidrofolato, un cosubstrato para la remetilación de la homocisteína a metionina. Esta codificada por el gen *MTHFR*<sup>373</sup>.

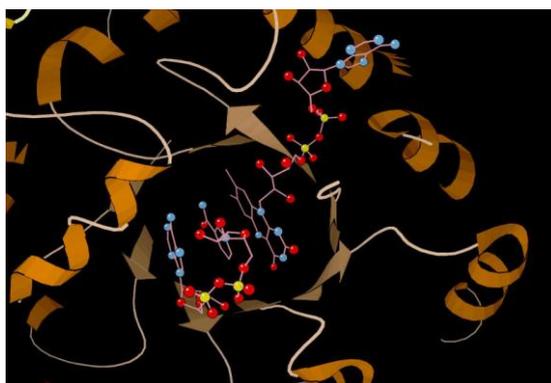
**Sinonimia:** No tiene

**Símbolo:** MTHFR

**Identificador OMIM:** 607093

**Identificador NC-IUBMB:** EC 1.5.1.20

**Estructura:** La enzima MTHFR es una enzima clave en el metabolismo de folatos y homocisteína, cataliza el metabolismo del ácido fólico y nucleótidos necesarios para la síntesis y reparación del DNA. Por lo cual variaciones en la función de la MTHFR dada por la presencia del polimorfismo en el gen que la codifica se relaciona con múltiples patologías que afectan al ser humano desde la embriogénesis y a lo largo de su vida<sup>371</sup>. La figura 13 muestra el diagrama del sitio activo de la enzima donde el cofactor flavina se superpone sobre el sustrato de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH).



**Figura 13.** Diagrama de cintas de la estructura molecular propuesta para la MTHFR. Se muestra el sitio activo de la enzima donde el cofactor flavina se superpone sobre el sustrato de NADH. Estructura generada por Schrodinger, Inc., GNU Image Manipulation Program y PyMOL.

Una de las reacciones requiere 5,10-metilentetrahidrofolato y 5-metilentetrahidrofolato en la síntesis de metionina de la homocisteína (la vía de remetilación en el metabolismo de la homocisteína)<sup>371</sup>. En esta reacción la MTHFR desempeña un papel vital reduciendo la 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, sí cataliza dicha reacción en la célula finalmente genera 5-metilentetrahidrofolato<sup>371</sup>. El 5-metiltetrahidrofolato (5CH<sub>3</sub>-FH<sub>4</sub>), dona un grupo metilo en la conversión de homocisteína a metionina<sup>372</sup>. Además de la obtención de un carbono, el 5, 10- metiltetrahidrofolato es oxidado a dihidrofolato, el cual entonces puede ser reducido por medio de la dihidrofolato reductasa con el fin de regenerar

tetrahidrofolato<sup>372</sup>. En la célula, la 5-metiltetrahidrofolato sirve como donador de metilo y fuente de tetrahidrofolato<sup>372</sup> está actúa como un receptor de unidades de un carbono produciendo una variedad de otros folatos que a su vez sirven como coenzimas tales son: (i) 5-formiltetrahidrofolato (ácido folínico, leucovorin); (ii) 10-formiltetrahidrofolato y (iii) 5,10-metilentetrahidrofolato<sup>372</sup>.

**Función y genética:** El gen humano se encuentra en el cromosoma 1, localización p36.3, codifica la enzima MTHFR que cataliza la reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, la principal forma de folato circulante y cosustrato de la remetilación de la homocisteína a metionina<sup>174</sup>.

A mediados de los años 90 se describió una variante polimórfica de este gen consistente en el cambio de C-->T del nucleótido 677 (*C677T*), con una prevalencia entre el 12-15% de la población caucásica general<sup>174,177</sup>. Este cambio comporta la substitución del aminoácido Val por Ala, y da lugar a una variante termolábil de la enzima que tiene reducida su actividad al 50%<sup>177</sup>.

Como consecuencia, las concentraciones plasmáticas de homocisteína de los individuos que presentan dicha variante pueden verse alterados, alcanzándose el estado de hiperhomocisteinemia. Numerosos estudios apoyan la hipótesis de que el exceso de homocisteína plasmática se asocia a un mayor riesgo de enfermedad coronaria, vascular cerebral y periférica<sup>182</sup>.

Por ello, aunque el déficit moderado de MTHFR no sea el único factor que determina la hiperhomocisteinemia, muchos autores han postulado la relación del polimorfismo *C677T* con las patologías asociadas a la misma.

En este sentido, si bien no existe unanimidad en cuanto al papel que el polimorfismo juega en la trombosis venosa, se ha sugerido que los homocigotos *C677T* presentan una mayor susceptibilidad para desarrollarla. Lo que sí está aceptado es que, en estos individuos, la variante enzimática de MTHFR genera condiciones proaterogénicas<sup>186</sup>.

Por otra parte, el polimorfismo *C677T* ha sido también ampliamente estudiado como factor de riesgo en mujeres con complicaciones del embarazo, habiéndose demostrado la asociación de la forma homocigota del mismo con diversas patologías obstétricas (por ejemplo: pre-eclampsia, placenta previa y retraso del crecimiento intrauterino)<sup>174</sup>.

Así mismo, se ha demostrado que las madres homocigotas para el polimorfismo *C677T* tienen una mayor probabilidad de desarrollar fetos con defectos de cierre del tubo neural (por ejemplo: espina bífida o anencefalia), especialmente cuando éstas presentan déficit añadido de ácido fólico.

#### 4.3.2.3. Metaloproteinasa de la matriz extracelular (MMP-9)

**Definición:** Es una enzima que en el hombre esta codificada por el gen *MMP9*.

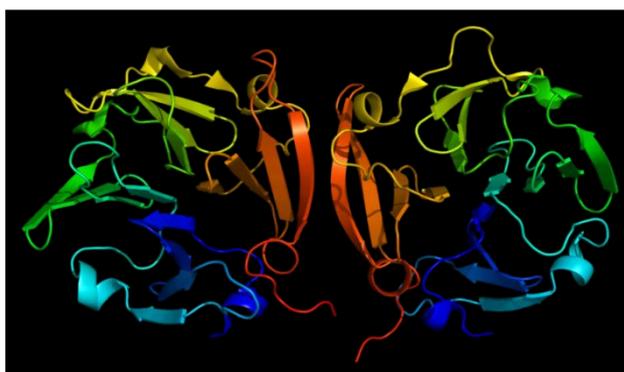
**Sinonimia:** También conocida como colagenasa tipo IV de 92 kD, gelatinasa de 92 kD o gelatinasa B.

**Símbolos:** MMP9; MMP-9; CLG4B; GELB; MANDP2.

**Identificador OMIM:** 120361

**Identificador NC-IUBMB:** EC 3.4.24.35

**Estructura:** Basándose en consideraciones estructurales y funcionales, las MMP constituyen una superfamilia de proteínas que pueden ser clasificadas dentro en, al menos, tres familias diferentes: colagenasas, gelatinasas y estromalisinas<sup>365</sup>, todas ellas similares en cuanto a que contienen un sitio de unión al zinc y que pueden ser inhibidas mediante agentes quelantes y por inhibidores específicos de tejidos<sup>366</sup>. Sin embargo, difieren en la especificidad de sustrato<sup>367</sup>. En la figura 14 se muestra el diagrama de cintas de la estructura molecular propuesta para la MMP-9.



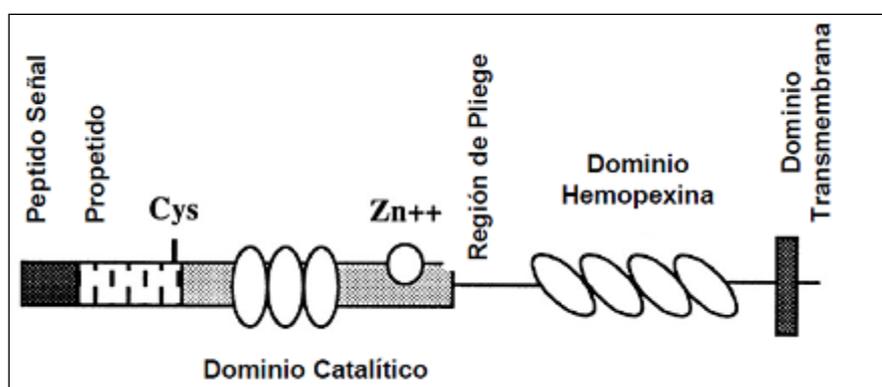
**Figura 14.** Diagrama de cintas de la estructura molecular propuesta para la MMP-9. Estructura generada por Schrodinger, Inc., GNU Image Manipulation Program y PyMOL.

Las MMP presentan una estructura general que según su actividad o función puede variar discretamente en diferentes sitios ya sea en el dominio catalítico, en el dominio hemopexina o en el dominio transmembrana (tabla XIV).

Aunque presentan algunas diferencias, sin embargo, las MMP tienen regiones y secuencias conservadas. Tales regiones estructurales incluyen a la región propéptido, que dirige la proteína hacia retículo endoplásmico. También se encuentra el sitio catalítico (específico para su actividad), cuya característica es un átomo de zinc unido a residuos de cisteína, y a un grupo tiol (SH) responsable del estado de latencia<sup>368</sup> (tabla XIV).

La región tipo hemopexina es la encargada de regular la unión a su sustrato y también a TIMPs. Los extremos amino-terminal y carboxi-terminal también interaccionan con la unión a TIMPs. La actividad de las MMP puede ser iniciada por diversas serin-proteasas y, como ya fue descrito, por enzimas de su propia familia. Uno de los principales activadores de las MMP es el activador de plasminógeno tipo urocinasa (del inglés *urokinase-type plasminogen activator*, uPA) que es una enzima que convierte el plasminógeno en plasmina y así activar a las MMP al extraer la cisteína del propéptido y dejar expuesto al átomo de zinc<sup>368, 369</sup>.

**Tabla XIV.** Estructura general de las MMP\*



ACTIVIDAD	MASA MOLECULAR (kD)
<b>Colagenasas</b>	
Colagenasa-1 (MMP-1)	52/41
Colagenasa-2 (MMP-8)	75/65
Colagenasa-3 (MMP-13)	65/55
<b>Estromelisinias</b>	
Estromelisina-1 (MMP-3)	57/45
Estromelisina-2 (MMP-10)	57/45
Metaloelastasa (MMP-12)	53/45
Matrilisina (MMP-7)	28/19
<b>Gelatinasas</b>	
Gelatinasa-A (72kD) (MMP-2)	72/67
Gelatinasa-B (92kD) (MMP-9)	92/84
<b>Tipo Membrana</b>	
MT1-MMP (MMP-14)	66
MT2-MMP (MMP-15)	
MT3-MMP (MMP-16)	
MT4-MMP (MMP-17)	
<b>Otras MMP</b>	
Estromelisina-3 (MMP-11)	55/28
MMP-19	
Enamelisina (MMP-20)	57

\* Copiado y modificado de <sup>445</sup>.

La MMP-9, posee avidéz proteolítica por las gelatinas. Por su estructura, se clasifica dentro de este grupo, presentando una región de unión a gelatinas<sup>370</sup>.

La tabla XV, muestra la clasificación de cada uno de los grupos mencionados en la tabla anterior, algunos de los sustratos donde actúan y la localización cromosómica de las mismas.

**Tabla XV.** Clasificación de las metaloproteinasas \*

Subgrupo	Nombre Alternativo	Nº de MMP	Peso Molecular		Colágeno y Otros Sustratos	Cromosoma
			Latente	Activa		
Colagenasas	-Colagenasa Intersticial.	1	55	45	-I, II, III, VII, VIII, X. Agregán, gelatina, proteoglicanos unidos a proteínas, $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), MMP-2, MMP9.	11q22-q23
	-Colagenasa de neutro filós	8	75	58	-I, II, III, V, VII, VIII, X. Agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, $\alpha$ 2-antiplasmina, $\alpha$ 1-AT.	11q21-q22
	-Colagenasa 3	13	60	48	-I, II, III, IV, IX, X, XIV. Agregán, gelatina, PAI-2, perlecán, fibronectina, MMP-9.	11q22.3
Gelatinasas	-Gelatinasa A	2	72	66	-I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV. Gelatina, agregán, elastina, fibronectina, laminina, decorín, proteoglicanos unidos a proteína, laminina, osteonectina, decorín hialurodasaversicán, $\alpha$ 1-AT, MMP-1, 9 y 13.	16q13
	-Gelatinasa B	9	92	86	-IV, V, VII, X, XIV. Gelatina, agregán elastina, fibronectina, proteoglicanos unidos a proteína, osteonectina, $\alpha$ 1-AT, plasminógeno.	20q11.2-q13.1
Estromelisinasa	-Estromelisinasa 1	3	57	45	-II, III, IV, V, IX, X, XI. Agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, antirombina, MMP-7, 8, 9 y 13.	11q23
	-Estromelisinasa 2	10	57	44	-III, IV, V. Agregán, elastina, fibronectina, gelatina, caseína, laminina, MMP-1, MMP-8.	11q22.3-q23
	-Estromelisinasa 3	11	51	44	- $\alpha$ 1-AT, $\alpha$ 2-M, caseína, agregán, fibronectina, laminina.	22q11.2
MMPs de tipo membrana	-MT1-MMP	14	66	56	-I, II, III, IV. Agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, vitronectina, $\alpha$ 1-AT, $\alpha$ 2-M, MMP-2, 13.	14q11-q12
	-MT2-MMP	15	72	60	-I, III, IV. Fibronectina, gelatina, laminina, agregán, perlecán, tenascina, MMP-2.	16q12.2-q21
	-MT3-MMP	16	64	52	-I, III, IV. Gelatina, caseína, fibronectina, MMP-2.	8q21
	-MT4-MMP	17	57	53	-IV. Gelatina.	12q24
	-MT5-MMP	24	63	28	-Proteoglicanos.	20q11.2
	-MT6-MMP, Leucolisina	25	34	28	-Gelatina, MMP-2	12q14
Otras	-Matrilisinasa	7	28	19	-IV, X. Agregán, elastina, fibronectina, IV, gelatina, laminina, decorín, $\alpha$ 1-AT MMP-1, 2, 9; MMP-9/TIMP-1.	11q21-q22
	-Metaloelastasa de macrófagos	12	54	45	-Gelatina, laminina, fibronectina, elastina, caseína, fibrina(ogeno), plasminógeno.	11q22.2-q22.3
	-RASI-1	19	54	45	-Gelatina	12q14
	-Enamelisinasa	20	54	22	-Amelogenina	11q22
	-Endometasa humana	23	ND	ND	-ND	1p36
		26	28	19	-Gelatina tipo I.	ND

\* ND: No determinado. Copiado de M Villalonga, 2000.

**Función, características y genética:** El gen humano de la MMP-9 ha sido mapeado en el cromosoma 20 20q11.2–q13.1<sup>86</sup> y varios polimorfismos de este gen han sido identificados. Varios polimorfismos en el promotor del gen *MMP9* se han implicados en la regulación de su expresión y en la susceptibilidad a varias enfermedades. Se han identificado 5 variantes de secuencias pero funcionalmente, solo dos son relevantes: SNP *-1562C/T* y un micro satélite ubicado en la posición *131bp*. El

-1562C/T polimorfismo (rs3918242) le has sido demostrado su efecto funcional sobre la transcripción génica. Un cambio de C a T en dicha posición crea dos alelos diferentes, y los genotipos *CT* y *TT* que promueven una actividad alta del promotor del mismo, incrementado el riesgo de enfermedades inflamatorias<sup>87</sup>. Este SNP, -1562C/T, genera la pérdida de unión de una proteína nuclear a dicha región y produce una actividad transcripcional incrementada en el macrófago. En estas células el genotipo *CC* permite una baja actividad del promotor mientras que los genotipos *CT* y *TT* resultan en una alta actividad transcripcional<sup>88</sup>.

En un estudio prospectivo en hombres de mediana edad, conformado por 465 casos y 1076 controles<sup>89</sup>, se demostró una asociación entre el la concentración sérica de MMP-9 y la incidencia de enfermedad coronaria en la población general.

Otros estudios más recientes y detallados han sido realizado en una población suiza de mediana edad donde se encontró no solo una asociación de las concentraciones séricas de MMP-9 y enfermedad cardiovascular sino también con factores psicosociales tales como depresión<sup>90,91</sup>. Observaciones en sujetos sanos, muestran una relación inversa entre marcadores de la formación de óxido nítrico y dicha MMP<sup>92</sup>.

En pacientes con enfermedad coronaria arterial ha sido reportado recientemente concentraciones elevadas de MMP-9. También se ha asociado este incremento en los niveles con un aumento de la mortalidad de esta enfermedad<sup>93</sup>.

Por otra parte, dicha asociación fue confirmada a nivel molecular, estudiando el polimorfismo funcional -1562C/T del gen *MMP9*, observando que los portadores del alelo T tenían mayor mortalidad cardíaca<sup>94</sup>.

Otros estudios<sup>95</sup> postulan que las concentraciones de MMP-9 podrían servir como biomarcadores en el síndrome coronario agudo. Igualmente se ha descrito la asociación de estos con arterioesclerosis y periodontitis crónica<sup>96</sup>.

Estudios moleculares de genotipado del polimorfismo funcional -1562C/T del gen *MMP9* han demostrado que portadores del alelo *T* también tiene riesgo incrementado de enfermedad arterioesclerótica grave<sup>97</sup>. Otros datos disponibles muestran una posible asociación de la MMP-9 con la patogénesis y el tratamiento de la enfermedad hipertensiva, encontrando concentraciones elevadas de la misma en mujeres con hipertensión gestacional<sup>98</sup>.

Las MMP no se pueden almacenar en muchos tipos celulares (los neutrófilos y macrófagos son excepciones) y tampoco sintetizarse y secretarse sin que haya una señal clara que son necesarias. Las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión VCAM-1 que promueven la infiltración de monocitos circulantes y de linfocitos T<sup>420</sup>. La adhesión de linfocitos T a las células endoteliales a través del receptor VCAM-1 induce la producción de MMP-2. Esta metaloproteasa facilita la degradación de la matriz extracelular<sup>333</sup>. Degradación necesaria para la migración de los linfocitos T y de los monocitos circulantes de la capa endotelial y la membrana basal. Este contacto de dichas células con el colágeno tipo I y la laminina incrementa la expresión de MMP-9 por estas células. La interacción de estas células con el colágeno induce una serie de reacciones bioquímicas que favorecen la producción de MMP-9, -1 y -3 por células musculares lisas.

En la tabla XVI, se detallaran los factores tanto activadores como represores involucrados en la producción de las MMP.

**Tabla XVI.** Algunos factores involucrados en la producción de metaloproteinasas \*

---

**Factores activadores**

*Factores que actúan en la superficie de la célula*

Ionóforo del calcio A23187  
Fusión celular  
Tipos de colágeno en el sustrato  
Concavalina A  
Cristales de urato  
Hierro  
Fagocitosis

*Agentes químicos*

AMP  
Colchicina  
Lipopolisacáridos  
Mitomicina C  
Prostaglandina E

*Agentes físicos que actúan en la célula*

Shock térmico  
Radiación UV

*Citocinas y/o factores de crecimiento*

Factor de crecimiento epidérmico  
Factor de crecimiento de fibroblastos- $\beta$   
Interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$   
Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

*Otros*

Transformación vírica, oncogenes, agentes autocrinos

**Factores represores**

Ácido retinoico  
Glucocorticoides  
Adenovirus-5  
Estrógenos y progesterona

---

\*Copiado y modificado de <sup>445</sup>.

Algunos resultados sugieren que el alelo *MMP9-1562T* está asociado a un riesgo reducido de pre-eclampsia y por lo tanto protege contra la mala adaptación de la arteria espiral y una menor degradación de la decidua.

Las concentraciones elevadas de MMP-9 han sido asociadas con este alelo T del polimorfismo mencionado, siendo esencial para el desarrollo de una adecuada interfase materno-fetal en fases tempranas de la gestación ya que facilitaría la apoptosis y degradación del trofoblasto <sup>422</sup>.

Otros autores han estudiado estos polimorfismos y otros relacionados con la patología hipertensiva del embarazo, comparando grupos sanos con gestantes con hipertensión gestacional y pre-eclampsia; encontrando diferencias significativas entre grupos. La presencia del alelo T y el genotipo CT del *-1562C<T* fueron más frecuentes en sujetos con hipertensión gestacional pero no lo fueron cuando se comparó el mismo grupo sano con gestantes con pre-eclampsia, ni cuando se comparó la frecuencia haplotípica de gestantes hipertensas o con pre-eclampsia comparadas con el grupo de gestantes sanas. Estas observaciones parecen indicar que el polimorfismo *C1562T* está

asociado con hipertensión gestacional pero no con pre-eclampsia y ayudarían a explicar las concentraciones séricas elevadas de MMP-9 observadas en hipertensión gestacional.

Otros han estudiado otro aspecto de la gestación, la implantación embrionaria como tal, y los efectos que esta puede conllevar si la pobre implantación generara un intercambio materno fetal disminuido y como consecuencia un retraso del crecimiento intrauterino. En este aspecto también las metaloproteasas han sido objeto de estudio. La MMP-2 y la MMP-9 están involucradas, ya que se ha demostrado su implicación en implantación temprana, siendo objeto tanto el *C1562T MMP9* como el *MMP 2 -1306* en el feto por medio del estudio del líquido amniótico<sup>97,337</sup>.

Los polimorfismos de secuencia de metaloproteasas han sido asociados con muchas enfermedades. Hay una correlación positiva entre la presencia de algunos polimorfismos en ellas, es el caso de la *MMP9 C1562T* y enfermedad inflamatoria.

El cambio de citosina (C) por timina (T) en la posición 1562 del gen altera la unión de proteínas nucleares, que permite un incremento de la actividad transcripcional en macrófagos, donde el promotor del gen responde a estímulos de varias citocinas y factores de crecimiento. Estudios en modelos murinos indican una asociación directa entre la expresión de MMP-9 con la morfogénesis epitelial, e igualmente se conoce la gran expresión de la MMP-2 en células mesenquimales durante el desarrollo de estructuras orgánicas donde la expresión de estas enzimas puede solaparse durante el crecimiento epitelial. Por lo tanto es posible que existan redundancias funcionales entre ambas metaloproteasas (la redundancia genética es un mecanismo que asegura un correcto funcionamiento en procesos claves del desarrollo y parece un fenómeno frecuente en etapas tempranas del desarrollo y organogénesis)<sup>323, 333, 336,337</sup>.

La gelatinasa B o MMP-9 es MMP con actividad proteolítica contra proteínas del tejido conectivo, ha sido implicada como elemento importante durante el proceso de remodelamiento del tejido conectivo asociado a aterogenesis y ruptura de la placa.

Estudios de la interacción DNA-proteína indican que el alelo *T* tiene casi dos veces más actividad del promotor que el alelo *C*, lo cual parece ser debido a una unión preferencial de una proteína represora de transcripción que se une al promotor codificado por el alelo *C*<sup>92,94</sup>.

Hasta el momento algunos datos relacionados con esta variante genética funcional y aterosclerosis indican que este SNP influye en la actividad del promotor del gen de la gelatinasa B y es alelo específico. Cuando se estudia este polimorfismo en relación al riesgo cardiovascular se ha encontrado que pacientes con el genotipo *TT* tienen riesgo para desarrollar la entidad y además lo relacionan con individuos con altas concentraciones apolipoproteínas y fibrinógeno, entre otros factores<sup>96</sup>.

Durante el embarazo se secreta la hormona estriol, la cual afecta las concentraciones de MMP-9 de las células del sistema inmunitario.

Se han realizado estudios con estriol en modelos murinos con encefalitis autoinmunitaria experimental (del inglés *experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE), encontrando que las concentraciones de MMP-9, en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con autoantígenos, fueron reducidas. Por lo tanto se concluyó que el estriol actúa a través de receptores alfa de estrógenos para reducir las concentraciones de MMP-9 de las células inmunitarias. Los estrógenos regulan la síntesis de MMP-2 y MMP-9 en varios tejidos, su expresión, actividad y concentraciones de estas enzimas son regulados por hormonas sexuales encontrando las concentraciones más elevadas en pacientes tratados con estrógenos<sup>323-326</sup>.

El 17 $\beta$ -estradiol disminuye la actividad del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (del inglés *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1 e incrementa la actividad de la plasmina y las metaloproteasas. La actividad enzimática de la MMP-9 en

respuesta a 17 $\beta$ -estradiol ha sido evidenciada en estudios que han reportado que el 17 $\beta$ -estradiol incrementa la expresión de genes inflamatorios en algunos tipos de células epiteliales tales como las del lecho corneal implicándose en el papel inflamatorio etiológico del síndrome de ojo seco.

El 17 $\beta$ -estradiol regula la expresión uterina de la MMP-9 y su actividad in vivo es un mecanismo complejo. Esta regulación estrogénica de la actividad de la MMP-9 juega un papel importante en la remodelación del tejido uterino<sup>337</sup>. Diferencias entre sexos y las variaciones en la gravedad de enfermedades inflamatorias dentro de estos grupos, sugieren la modulación de las hormonas sexuales femeninas en la respuesta inflamatoria. Los estrógenos actúan en la transcripción de genes y modulan la respuesta inflamatoria. Se han descrito tanto efectos anti-inflamatorios como pro-inflamatorios.

Por otra parte se han realizado estudios que evalúan las concentraciones de MMP-9 sérico durante el primer trimestre del embarazo y su relación con pre-eclampsia y parto pre-término; encontrándose concentraciones aumentadas de esta en pre-eclampsia correlacionándolo con la presencia de un proceso inflamatorio subyacente.

#### **4.3.2.4. Antígeno leucocitario humano G (HLA-G)**

El éxito de un embarazo humano, donde el feto reside en el interior del útero materno por nueve meses desafía los preceptos de la inmunología. Sin embargo son muchos los datos e información que tenemos de ello y de las condiciones responsables del privilegio inmunológico de esta situación biológica, donde tanto la madre como el feto contribuyen al desarrollo y mantenimiento del mismo y aportan las características propias de la interfase materno-fetal.

Una de las características principales de esta situación, es la capacidad única que tienen las células placentarias en seleccionar la expresión de genes específicos del MHC. Es esta capacidad única para la selección de moléculas específicas HLA la que sería responsable de un reprogramamiento de la respuesta inmunitaria materna local en el útero y que caracteriza el embarazo semialogénico propio de la especie humana. Este estudio se ha dirigido hacia una de las moléculas expresadas en el útero, el antígeno leucocitario humano, HLA-G.

**Definición:** Proteína del MHC humano de clase I. Heterodímero que consiste en una cadena pesada y otra ligera ( $\beta$ -2-microglobulina), la cadena pesada se ancla en la membrana citoplasmática.

Esta codificada por el gen *HLA-G*.

**Sinonimia:** No tiene

**Símbolos:** HLA-pG; MHC-G

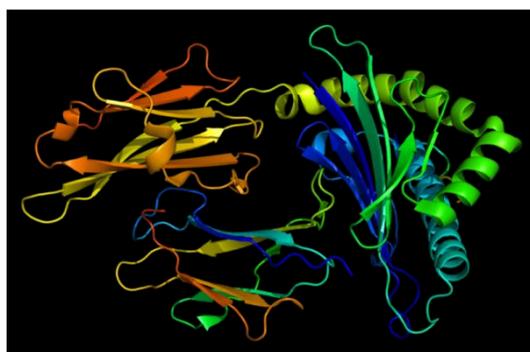
**Identificador OMIM:** 142871

**Identificador NC-IUBMB:** No tiene

**Estructura:** Las moléculas HLA de clase I tanto clásicas como no clásicas presentan una gran homología estructural<sup>374</sup> (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G, HLA-E y HLA-F) hallándose constituidas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada, glicosilada, de mayor tamaño, con una masa molecular de 45 kD, que se encuentra asociada, mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la  $\beta$ 2-microglobulina que tiene una masa molecular aproximada de 12,5 kD<sup>374</sup>. La  $\beta$ 2-microglobulina, polipéptido idéntico al componente sérico normal, es idéntica en todos los individuos de la misma especie y los genes que la codifican no se encuentran en el MHC, situándose en el cromosoma 16, en el hombre y en el cromosoma 2 en el ratón<sup>374, 375</sup>. La cadena pesada, por el contrario, es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo antigénico de las moléculas HLA de clase I<sup>375</sup>. Se distinguen tres zonas bien definidas, una zona extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una

pequeña región transmembrana, hidrófoba, y finalmente una región intracitoplasmática de unos 35 aminoácidos. La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de aproximadamente unos 90 residuos cada uno, denominados  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  mantenidos por la existencia de puentes intracatenarios<sup>375,376</sup> (Ver figura 15).

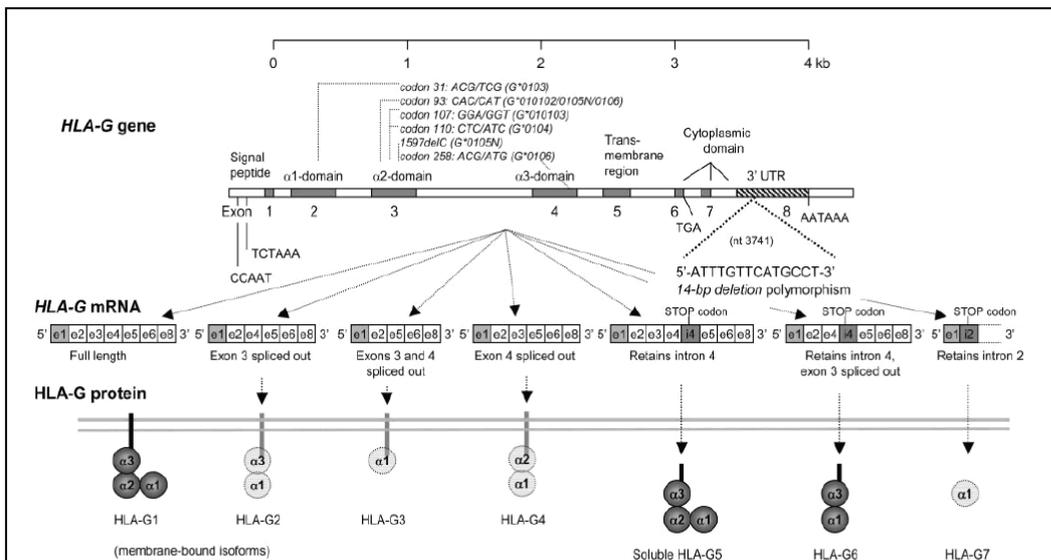
La molécula HLA-G pertenece a la familia de moléculas de histocompatibilidad no clásicas y se caracterizan por un limitado polimorfismo y una distribución celular y tisular restringida al trofoblasto fetal y células del epitelio tímico<sup>377</sup>. Esta molécula puede presentarse en siete isoformas distintas, codificadas por ajuste alternativo, cuatro de ellas son proteínas unidas a membrana (HLA-G1, -G2, -G3 y -G4), y otras tres isoformas que son proteínas solubles (HLA-G5, -G6 y -G7)<sup>376,377</sup>. Otras características estructurales de estas moléculas es que son: (i) reconocidas por ciertos receptores inhibidores, tales como KIR2DL4, ILT-2 y ILT-4 y, en consecuencia poseen, capacidad de inhibir la lisis mediada por células NK y ciertas células T; (ii) están relacionadas con la inducción de tolerancia materno-fetal<sup>377</sup>.



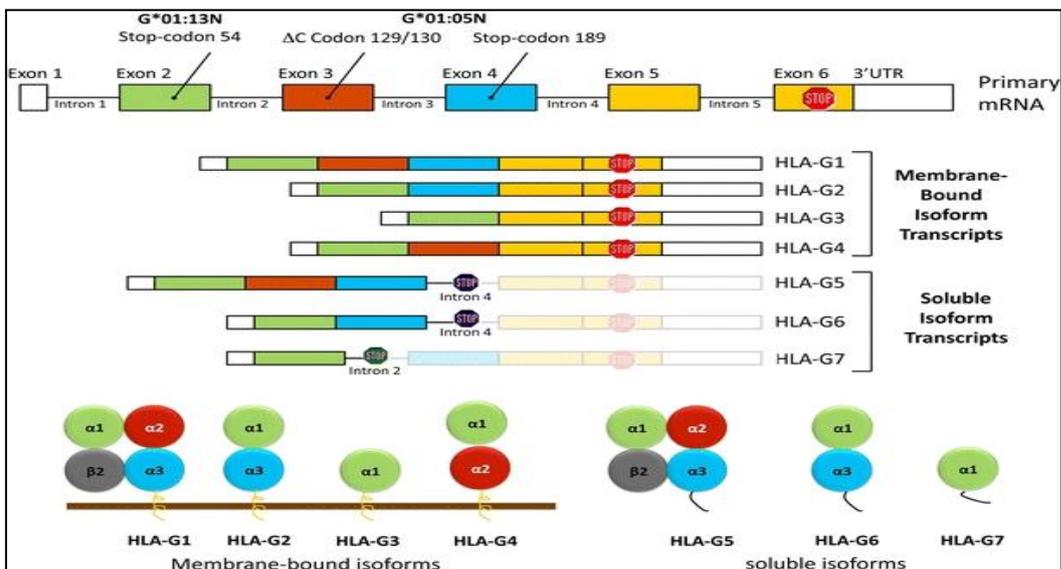
**Figura 15.** Diagrama de cintas de la estructura molecular propuesta para HLA-G. Estructura generada por Schrodinger, Inc., GNU Image Manipulation Program y PyMOL.

**Función, características generales del HLA-G y genética:** Los genes que codifican las moléculas HLA están ubicados en el cromosoma 6 región telomérica 6p21, aunque esta región contiene de 20 a 25 genes HLA clase I, relativamente pocos estos transcritos o traducidos, la mayoría son pseudogenes o fragmentos génicos. La expresión de genes de clase I está subdividida en clase Ia, (en donde se incluye el HLA-A, -B y -C) y la clase IIb (que incluye HLA-E, -F y -G). Aunque la estructura genómica del HLA-G es similar a otros genes de clase I, es única en la mayoría de sus otros aspectos. El gen *HLA-G*, cuya representación gráfica podemos observar en la figura 16, tiene ocho exones, que codifican una señal peptídica (exón 1), los dominios 1, 2, 3 (exones 2, 3 y 4 respectivamente), el dominio transmembrana (exón 5) y el dominio intra celular (exón 6 y 7) como otros genes de clase I. Sin embargo, un codón de parada prematuro en el exón 6 genera una cola citoplasmática que revela un motivo críptico<sup>427</sup>, resultado en una expresión prolongada y en un recambio lento de esta en la superficie celular y posiblemente en la presentación ineficiente de péptidos exógenos. Otra de sus características es que codifica múltiples isoformas, observadas en la figura 17, como resultado de un ajuste alternativo. Presenta las isoformas G1, similar estructuralmente a otros genes de clase I excepto por la cola citoplasmática truncada, la isoforma G2 que resulta al eliminar el exón 3 y homodimeros para formar una estructura similar al HLA de clase II (HLA clase II-like); estas dos isoformas son expresadas como proteínas solubles (HLA-G5 y HLA-G6, respectivamente) debido a la inclusión de una secuencia

del intron 4 el mRNA maduro, resultando en proteínas secretadas con 21 aminoácidos, seguidas del dominio 3. El HLA-G3 resulta de eliminar el exón 3 y 4. El HL- G4 y -G7 no son abundantes en placenta<sup>427</sup>.



**Figura 16.** Estructura genética del HLA-G. Basado de <sup>270</sup>

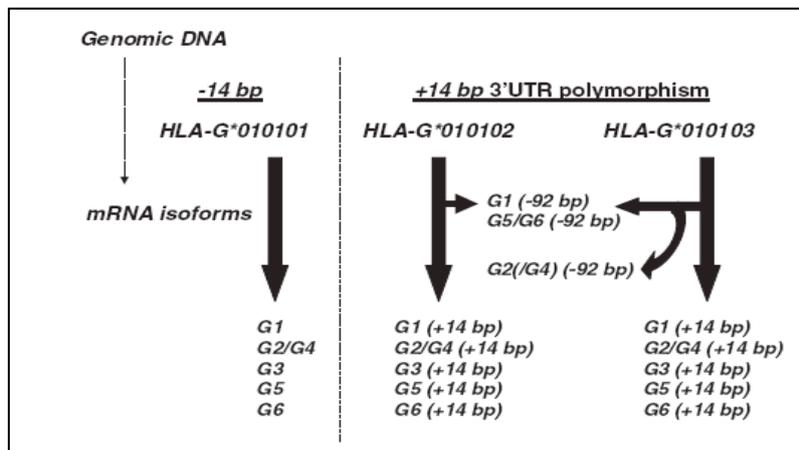


**Figura 17.** Isoformas del HLA-G producidas por ajuste alternativo del mRNA primario  
Figura reproducida de <sup>302</sup>

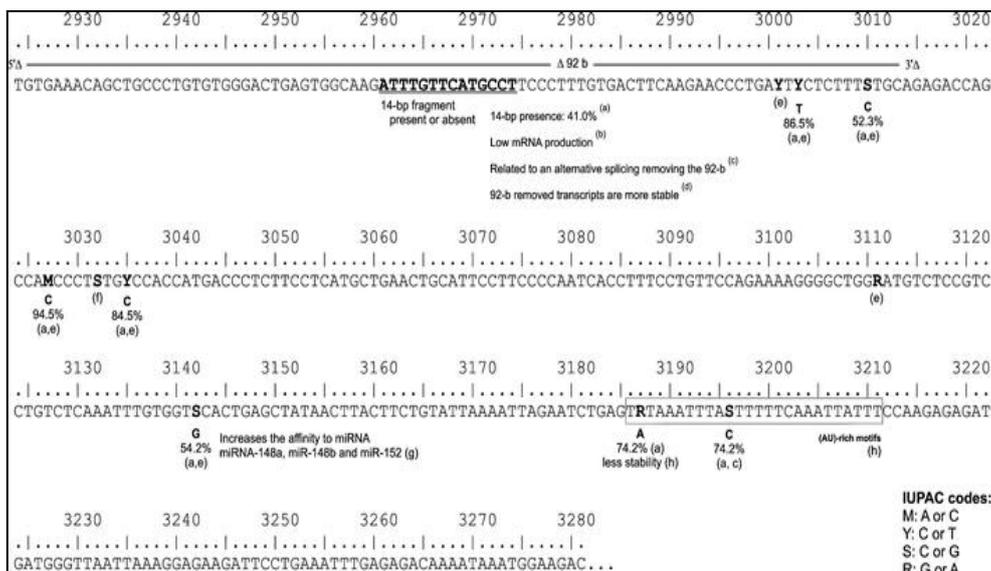
El conocimiento actual sobre la molécula HLA-G se basa en una serie de experimentos *in vitro* que muestran que el HLA-G puede inhibir células NK y la lisis mediada por células T mediante una interacción directa con receptores de estas células [las características principales de estos receptores son: (i) colectivamente se les denomina receptores de las células NK parecidos a inmunoglobulinas (del inglés *killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIR); (ii) el locus *KIR* contiene una familia de genes polimórficos y altamente homólogos que mapea dentro del complejo del receptor leucocitario (del inglés *leukocyte receptor complex*, *LRC*); (iii) El *LRC* también codifica la familia de receptores leucocitarios parecidos a inmunoglobulinas (del inglés *leukocyte*

*Ig-like receptor*, LILR), la familia de receptores inhibidores asociados a leucocitos (del inglés *leukocyte-associated inhibitory receptor*, LAIR) y el receptor Fc $\alpha$ ]. Por otra parte se ha demostrado que la IL-10 es capaz de activar la expresión del HLA-G<sup>428</sup>. Además HLA-G, tanto unido a la membrana como soluble, induce cambios en el perfil secretor de citocinas por parte de células mononucleares activadas de sangre circulante<sup>429</sup>.

Polimorfismos en la región 3'UTR y 5'UTR del gen *HLA-G* han sido descritos y asociados con la expresión del HLA-G, el cual podría afectar su función pudiendo ser importante en ciertas complicaciones del embarazo. El polimorfismo en el exón 8 de la región 3'UTR del *HLA-G*, 14bp eliminación/inserción, esta presente tanto en el gen *HLA-G* como en el transcrito. (Ver figura 18). Los alelos del *HLA-G* que contienen la secuencia 14bp han sido asociados con concentraciones bajas de su mRNA de la mayoría de sus isoformas en muestras de trofoblasto del primer trimestre<sup>304</sup>. En la población caucásica la frecuencia de este polimorfismos es similar, encontrando que la frecuencia para el alelo que incluye la secuencia 14bp es <4,5% y el alelo con la secuencia eliminada -14bp es <55%, sin embargo en población africana el alelo con la secuencia eliminada -14bp es dominante<sup>270</sup>.



**Figura 18.** Expresión de las isoforma del mRNA del HLA-G y su relación con los polimorfismos. Figura reproducida de<sup>304</sup>.



**Figura 19.** Sitos de variación descritos<sup>302, 303,304,</sup> en la región *HLA-G 3'UTR*, los cuales tendrían implicación en la expresión del *HLA-G*. Tomada de<sup>302.</sup>

### **5. Modelos experimentales de pre-eclampsia**

La pre-eclampsia continua siendo una importante causa de morbimortalidad materna y fetal alrededor de la cual existen varias teorías que explican su causa, sin embargo su etiología permanece desconocida. Los limitados progresos alrededor de los nuevos tratamientos para reducir su incidencia y la severidad de la misma ha conducido a producir modelos animales que asemejen o reproduzcan los desordenes hipertensivos del embarazo, especialmente pre-eclampsia. Sin embargo, la mayoría son incompletos a la hora de compararlos con el espectro completo de la enfermedad en humanos<sup>140</sup>.

Estos modelos experimentales han sido organizados atendiendo los mecanismos patogénicos específicos que se creen juegan un papel en la enfermedad.

Dichos mecanismos son la isquemia uterina, los daños en el sistema del oxido nítrico, la resistencia a la insulina, la actividad alterada del sistema nervioso autónomo y del sistema renina angiotensina, la activación de una respuesta sistémica inflamatoria y la activación de proteínas circulantes que interfieren en la angiogenesis. Igualmente se han realizado modelos de enfermedad renal como aspecto importante de la pre-eclampsia. El objetivo de dichos modelos ha sido ayudar a dilucidar y entender la etiología de la entidad e igualmente establecer estrategias preventivas y terapéuticas en pro de la enfermedad<sup>140</sup>. La pasada década ha significado un avance en el entendimiento de la pre-eclampsia y el desarrollo de modelos experimentales animales viables de la enfermedad ha contribuido significativamente en sus avances. Aunque muchos de estos modelos presentan importantes características de la enfermedad, continúan siendo pobres al reproducir al completo la enfermedad como se desarrolla en los humanos.

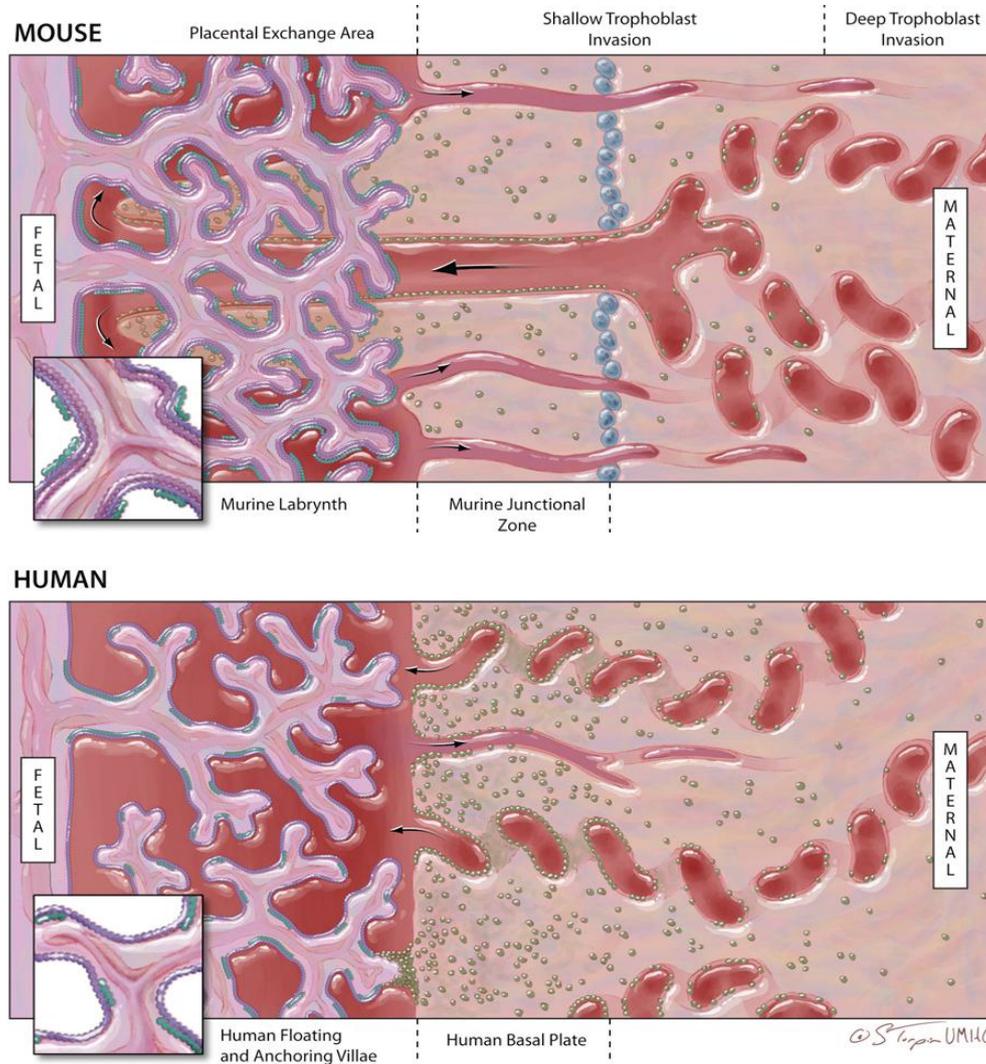
**Tabla XVIa.** Modelos murinos que desarrollan un cuadro similar a la pre-eclampsia

MODELO	RESULTADO
Ratón KO de la NOS	Inhibición crónica de la eNOS
Ratones deficientes de COMT	Generar ausencia de 2ME, para corrección exógena.
Ratón BPH/5	Cepa susceptible a desarrollar un síndrome hipertensivo inducido por el embarazo
Basados en la angiogénesis.	Administración exógena de sFLT1 para generar una angiogénesis defectuosa, alterando la placentación.
Modelos inmunológicos de pre-eclampsia	Ratón (CBA/J x DBA/2J)F1 generan un balance angiogénico alterado.
Adriamicina como inductor de pre-eclampsia	Generar una nefropatía secundaria.
Relacionados con el sistema renina/angiotensina	Sobreexpresión de angiotensinogeno.
Modelos inducidos por la insulina	Hiperinsulinemia crónica inducida.
Basados en las especies reactivas de oxígeno	Inyección de una dosis mínima de lipopolisacáridos.
Alteración del sistema nervioso simpático	Aumentar la actividad del SN simpático a través de un estrés crónico inducido.

Tomado de<sup>140, 421,430</sup>.

En la figura 20 se comparan la placenta murina y la placenta humana. Aunque ambas arquitecturas son similares, existen también importantes diferencias. Las placentas comparten una forma discoidal, cambios hemocoriales, tipos celulares análogos y una capa celular basal. En ambas especies los vasos fetales se encuentran recubiertos por una capa discontinua de citotrofoblasto, el cual está rodeado de dos capas continuas de sincitiotrofoblasto en el ratón y una sola capa del mismo en los humanos. En ratones la invasión es un poco menor y en su mayoría se limita a la

decidua materna que se encuentra más cerca del feto. A pesar de la falta de remodelación, es evidente la fase temprana de invasión trofoblástica. En los seres humanos, las células endovasculares del trofoblasto, la remodelación de las arterias y venas espirales uterinas maternas por el reemplazo de estructuras endoteliales vasoactivas y células intersticiales trofoblásticas, invaden por lo menos un tercio del miometrio uterino<sup>305, 306</sup>.



**Figura 20.** Arquitectura placentaria murina (MOUSE) y humana (HUMAN). Tomado de<sup>421</sup>, a su vez con el permiso de la Universidad de Misuri (The Curators of the University of Missouri).

## **II. HIPOTESIS**

Con este trabajo se espera encontrar: (i) un genotipo *COMT* de baja actividad en aquellas pacientes que presentan pre-eclampsia; (ii) un genotipo *MTHFR* homocigoto para el alelo *T* que genera la variante termolábil de la enzima generando susceptibilidad para hipermocisteinemia.

Por otra parte se estudiará la distribución del genotipo *MMP9* en la población normal y con pre-eclampsia ya que existen diferentes estudios referentes a la presencia del alelo *T* y su asociación a enfermedades. Entre ellas se ha planteado que aumenta el riesgo para enfermedades inflamatorias y vasculares. De igual forma será estudiado el genotipo materno en *HLA-G*.

Planteando por tanto como hipótesis del estudio la existencia de genotipos maternos de riesgo en cada uno de los genes considerados que generarían como consecuencia la expresión anormal de enzimas y/o moléculas que podrían contribuir a una placentación anómala que alteraría el flujo sanguíneo de la unidad materno-fetal, pudiendo evolucionar al desarrollo de un estado hipertensivo del embarazo, específicamente, pre-eclampsia.

### **III. OBJETIVOS**

Los objetivos del presente estudio fueron:

(i) Analizar los aspectos epidemiológicos de la pre-eclampsia. Relacionar dichos factores con la patología con el fin de crear un perfil de estudio para su detección precoz durante el embarazo.

(ii) Estudiar nuevos polimorfismos genéticos relacionados con pre-eclampsia. Para ello se seleccionaron los polimorfismos de los genes *COMT*, *MTHFR*, *MMP9* y *HLA-G*.

(iii) Determinar si hay asociación entre los polimorfismo genético *COMT*<sup>Val/Met</sup>, *MTHFR C677T* y *MMP9 -1562 C>T* en pacientes con pre-eclampsia.

(iv) Clarificar la asociación del polimorfismo materno del *HLA-G 14bp* con el desarrollo de pre-eclampsia; quedando pendiente el complementar dicho genotipado en el feto.

(v) Realizar estudios genéticos para determinar los cambios ocurridos y poder ver su asociación o la susceptibilidad para desarrollar la patología; aportar unos resultados que intenten dilucidar la etiología de esta entidad; comprender los factores vasculares y genéticos implicados, intentando relacionarlos, con el objeto de crear dianas terapéuticas o diagnósticas eficaces.

En resumen, el propósito de esta tesis es investigar los polimorfismos genéticos hipotéticamente relacionados con la pre-eclampsia, para averiguar si existe alguna asociación de susceptibilidad o resistencia con esta entidad. Si se logra asociar un polimorfismo concreto o varios con la enfermedad, se llevará a cabo el segundo objetivo del estudio, que sería crear un perfil de detección precoz de susceptibilidad para pre-eclampsia. A las mujeres que acudiesen a su primera cita de control del embarazo se estudiaría este perfil inmunogénético, con el objeto de controlar más de cerca su embarazo.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Diseño del estudio. Población de estudio y controles**

Este estudio se ha realizado en el Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla” (HUMV). El HUMV es un hospital de aproximadamente 900 camas, situado en la ciudad de Santander (Comunidad de Cantabria, España) y que pertenece al Servicio Cántabro de Salud (SCS). Para el propósito de este trabajo se ha considerado una cohorte retrospectiva compuesta de 330 pacientes dividido en casos y controles, seleccionados siguiendo unos criterios definidos de inclusión y exclusión.

La realización de este estudio siguió las normas de buena práctica clínica de la declaración de Helsinki (revisión de Hong-Kong en 1998)<sup>356</sup>. La inclusión de cada paciente con pre-eclampsia o gestante normal se confirmó mediante información verbal del objeto del estudio y posterior consentimiento informado siguiendo los criterios de la Comisión de Ética del HUMV que incluyen la confidencialidad de los datos, los beneficios y posibles riesgos asumibles y la voluntariedad de la participación.

Los criterios diagnósticos utilizados para definir la pre-eclampsia son los aprobados por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia<sup>357</sup>. Básicamente son: (i) pre-eclampsia, hallazgo tras la semana 20 gestación (salvo enfermedad trofoblástica o hidrops) de HTA (sistólica >140 mm Hg y diastólica >90 mm Hg, determinadas en dos ocasiones separadas un mínimo de 4 h) y proteinuria (>300 mg/24h o 30 mg/dl en una muestra aislada o 2+ en la tira reactiva de dos muestras distintas); (ii) pre-eclampsia grave, HTA (sistólica >160 mm Hg y diastólica >110 mm Hg), proteinuria (>2000 g/24h), creatinina sérica (>1,2 mg/dl), trombopenia (<100.000 plaquetas/ml) (o anemia hemolítica con microangiopatía), enzimas hepáticas aumentadas, cefaleas (o alteraciones visuales o dolor epigástrico), hemorragias retininas (o exudado en el fondo del ojo o edema papilar) y edema pulmonar y (iii) síndrome HELLP. El síndrome HELLP puede ser: (i) completo (plaquetas <100.000 plaquetas/ml, LDH >600 IU/ml y GOT >72 IU/ml o (ii) incompleto (sólo uno o dos de los tres criterios anteriores)<sup>61</sup>.

Este trabajo se realizó con una cohorte retrospectiva compuesta de: (i) un grupo de estudio (110 pacientes con antecedente de pre-eclampsia atendidas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del HUMV entre los años 2004 y 2008) y (ii) un grupo control (220 gestantes controladas en diferentes áreas de Cantabria, sin antecedentes de pre-eclampsia ni desarrollo de la misma durante el embarazo).

Se definió como caso de pre-eclampsia aquella paciente embarazada con hipertensión (140/90 mm Hg) y proteinuria (>300 mg/24h) que aparecen después de la semana 20 de gestación. Como control aquella mujer embarazada que en el momento de la recolección de la muestra y hasta el final del embarazo estuvo bien clínicamente, sin criterios de hipertensión y sin antecedentes de los mismos.

Los criterios básicos de inclusión fueron: (i) edad reproductiva (15-45 años) y (ii) ausencia de determinadas enfermedades (HTA, neuropatía, diabetes y enfermedades autoinmunitarias).

### **2. Obtención y manipulación de muestras de sangre circulante**

Mediante venopunción se extrajeron dos tubos de sangre: (i) uno de ellos un tubo de 10 ml sin aditivo y que tras la centrifugación correspondiente se obtuvo suero que se congeló a -20°C y (ii) un tubo con un 8% de solución de EDTA (el EDTA aglutina los iones de calcio y bloquea de esta forma la cascada de coagulación y mantienen las células estables durante 24 horas)<sup>358</sup>.

### **3. Extracción y aislamiento del DNA**

Se realizó la extracción de DNA genómico de muestras de sangre recogidas en tubos de extracción tratados con EDTA como se mencionó en el apartado anterior. El aislamiento fue realizado con un extractor automático de DNA (Maxwell® 16 System, Promega Corporation. Madison, EEUU) el cual proporciona un DNA apto para ser analizado directamente mediante métodos de amplificación estándar, entre los que se incluye la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La extracción de DNA genómico se realiza a partir de 300 µl de sangre total, asumiendo un promedio de leucocitos entre  $4,2 \times 10^6$  y  $1,2 \times 10^7$ /ml de sangre total, según los valores de un adulto normal y sano. Entre los pasos automatizados que realiza dicho equipo se incluyen: (i) lisis de la muestra en presencia de un agente caotrópico y detergente; (ii) unión de ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas; (iii) lavado de las partículas unidas para separarlas del resto de componentes celulares y (iv) elución de los ácidos nucleicos en un tampón que permite añadirlos directamente a la PCR estándar.

#### **4. Reactivos químicos y tampones**

Reactivos químicos: Albúmina sérica bovina (BSA) adquirida de New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, EEUU).

Los siguientes reactivos fueron de Merck Chemicals (Darmstadt, Germany): 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS, comercialmente conocido también como Trizma™), ácido 2-({2-[bis(carboximetil)aminometil]}-(carboximetil)amino), Acético (ácido 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil}}(carboximetil)amino)acético ó ácido etilendiaminotetraacético, EDTA), (2*S*,3*S*)-1,4-bis(sulfanil)butano-2,3-diol (ditiotritiol, DTT), fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cloruro de sodio (NaCl), acetato de magnesio [Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.4H<sub>2</sub>O], acetato de potasio (CH<sub>3</sub>COOK) y 1,2,3-propanotriol (glicerol).

Tampones: Tampón 10X TRIS-borato-EDTA (TBE) (890 mM TRIS, 890 mM ácido bórico, 20 mM EDTA, pH 8,0). El tampón TRIS-acetato (TAE) (50 mM CH<sub>3</sub>COOK, 20 mM TRIS-acetato, 10 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.4H<sub>2</sub>O, 1 mM DTT, pH 7,9, 25°C)(tampón NE Buffer 4) y el tampón utilizado para el almacenamiento de las enzimas de restricción y dilución de la BSA (20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% glicerol, pH 7,0, 25°C), fueron adquiridos a New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, EEUU).

#### **5. Selección de variantes genéticas de estudio: cebadores y endonucleasas de restricción**

Los cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los segmentos genéticos en estudio, fueron diseñados y seleccionados utilizando la base de datos y recursos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) de los EEUU, disponibles en Internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Tras su diseño se encargó su construcción a Thermo Fisher Scientific (Waltham. MA, EEUU). Los cebadores utilizados son los descritos en la tabla XVII.

**Tabla XVII.** Cebadores utilizados

GEN Y POLIMORFISMO	DIRECCIÓN DEL VECTOR	CEBADOR
<i>MMP 9 -1562 C&gt;T</i>	Forward	5'- GCCTGGCACATAGTAGGCCCC-3'
	Reverse	5'- CTTCTAGCCAGCCGGCATC-3'
<i>COMT Val 158 Met</i>	Forward	5'- GCC CGC CTG CTG TCA CC-3'
	Reverse	5'- CTG AGG GGC CTG GTG ATA GTG-3'
<i>MTHFR C677T</i>	Forward	5'- GCCACCCCGAAGCAGGGAGCTTTCAGG-3'
	Reverse	5'- CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAGAAAGAG-3'
<i>HLA G + 14bp</i>	Forward	5'- GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3'
	Reverse	5'- GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'

Una enzima de restricción o endonucleasa de restricción es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA y cortarlo en ese punto concreto, llamado sitio de restricción. Se utilizaron las enzimas que se describen en la tabla XVII, adquiridas a New England Biolabs Inc (Ipswich, MA, EEUU).

**Tabla XVIII.** Enzimas de restricción utilizadas, sitios de corte y respectivo gene donde actúan

ENZIMA	ORIGEN BACTERIANO	RECONOCIMIENTO	GEN
Nla III	<i>Neisseria lactamica</i>	5' CATG_ 3' 3' _GTAC 5'	<i>COMT</i>
Sph I	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	5' GCATG_C 3' 3' C _GTACG 5'	<i>MMP 9</i>
Hinf I	<i>Haemophilus influenza</i>	5' G _ANTC 3' 3' CTNA_G 5'	<i>MTHFR</i>

## **6. Método de genotipado: SNP**

### **6.1. Amplificación de los productos purificados mediante PCR- RFLP**

Los polimorfismos de los cuatro genes se realizaron por PCR-RFLP. Las condiciones generales de las PCR y termociclación se describen a continuación.

En primer lugar se preparó una mezcla de los componentes necesarios para que tengas lugar una PCR. Se la denomina mezcla maestra para PCR (en inglés *PCR Master Mix*, PCR-MM). Una PCR-MM contiene: (i) Tampón de PCR 5X; (ii) MgCl<sub>2</sub>; (iii) dNTPs; (iv) los cebadores (tanto *forward* como *reverse* de cada fragmento a amplificar); (v) Taq- polimerasa y (vi) H<sub>2</sub>O estéril.

La PCR se lleva a cabo en unj volumen pequeño (10-200 µl) en un aparato denominado termociclador (96-well GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EEUU).

Se realizaron los cálculos respectivos para cada amplificación con el fin de alcanzar un volumen total de 25 µl de esta reacción para la PCR. A continuación se procedió a preparar un gel de agarosa al 2%. Luego con el volumen restante se continuó con la digestión usando las respectivas enzimas de restricción. La condiciones generales para la digestión requirió para un volumen final de 20 µl: producto de PCR 10 µl, tampón de PCR 10X 2 µl, BSA acetilada (10 µg/µl) 0.2 µl, H<sub>2</sub>O 7,3 µl, enzima de restricción 0,5 µl. Se incubaron a 37°C toda la noche y luego se procedió a la realización de los respectivos geles de agarosa a porcentajes de acuerdo a los tamaños de bandas esperados (2-3%).

El genotipado para *COMT* empezó con la amplificación del segmento génico en estudio por PCR utilizando los cebadores específicos para este gen (tabla XVII), y las condiciones puestas a punto en el que en el Servicio de Inmunología del HUMV. Se utilizaron los siguientes reactivos: 5 ng/ml de DNA, 2,5 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub> y las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (5 min, 94°C) y 35 ciclos de una extensión inicial (30 s a 94°C, 30 s a 52°C y 30 s a 72°C), seguido de una extensión final (5 min a 72°C). Se obtuvo un amplificado de 109bp y la restricción para su digestión realizada con la enzima de restricción Nla III generó bandas de 86/23bp

(homocigotos *Val/Val*), bandas de 68/18bp (homocigotos *Met/Met*) y bandas de 86/68/23/18bp (heterocigotos *Val/Met*).

Para la genotipificación de *MMP-9* se realizó la misma técnica, utilizando los cebadores propios de amplificación para este gen descritos en la tabla XVII. La mezcla contenía: 5 ng/ml de DNA, 2,5 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub> y las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (1 min 95°C), 30 ciclos constituidos en la fase de extensión inicial (30 s a 94°C, 30 s a 58°C y 30 s a 72°C) seguido de una extensión final (10 min a 72°C), obteniéndose un amplificado de 460bp y la digestión realizada con la enzima de restricción Sph I generó unas bandas de 258bp y 202bp en caso de la variante polimórfica alelo *T*, mientras que para el alelo *C*, corresponde la banda no digerida.

Igualmente, el genotipo para el gen *MTHFR* se realizó utilizando los cebadores propios de amplificación para este gen (tabla XVII). La mezcla fue de 5 ng/ml de DNA, 2.5 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub> y las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (5 min a 94°C), 35 ciclos constituidos por una fase de extensión inicial (30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C), seguido de una fase de extensión final (10 min a 72°C) obteniéndose un amplificado de 198bp. El alelo silvestre *677C* y el alelo mutado *677T* originan fragmentos de 198 y 175 pares de bases respectivamente, cuando los productos de la PCR son digeridos con la enzima Hinf I. Se procedió al genotipado de acuerdo al tamaño de banda: *CC* 198bp, *TT* 175bp + 23bp y *CT* 198 +175bp.

El polimorfismo *14bp* del exón 8 del gen *HLA-G* fue detectado a través de un análisis de PCR que contenía: 200 ng de DNA añadidos a un volumen final de 25 µl que contenían: 10 mol/l de Tris-HCl (pH 8.8), 50 mol/l KCl, 1.5 mol/l MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mol/l de cada dNTPs; 10 pmol de cada primer y 0.75 IU de *Taq*-polimerasa. Las condiciones de termociclación fueron las siguientes: 35 ciclos (30 s a 94°C, 60 s, a 64°C y 2 min a 72°C) precedidos de una desnaturalización inicial (2 min a 94°C) y luego seguida de una extensión final (10 min a 72°C). El producto de PCR del exón 8 fue analizado en un gel de agarosa al 3%. El tamaño de los amplicones para el polimorfismo de *14bp* en el exón 8 región UTR del *HLA-G* fue de 224bp para el alelo *+14bp* y 210bp para el alelo *-14bp*.

## **7. Análisis estadístico de los datos**

### **7.1. Estadística descriptiva**

Una vez que se han recogido los valores que toman las variables de nuestro estudio, se procede al análisis descriptivo de los mismos. Para variables categóricas, como el sexo o el estadiaje, se quiere conocer el número de casos en cada una de las categorías, reflejando habitualmente el porcentaje que representan del total, y expresándolo en una tabla de frecuencias. Para variables numéricas, en las que puede haber un gran número de valores observados distintos, se ha de optar por un método de análisis distinto, ya sea medidas de tendencia central o medidas de dispersión<sup>378, 379</sup>.

### **7.2. Análisis estadísticos**

Los métodos estadísticos inferenciales no paramétricos son procedimientos matemáticos para probar la hipótesis estadística que, al contrario de la estadística paramétrica, no hacen ninguna asunción sobre las distribuciones de frecuencia de las variables que son determinadas<sup>383</sup>. Por otra parte, los métodos estadísticos deductivos paramétricos son los procedimientos matemáticos para probar la hipótesis estadística que asumen que las distribuciones de las variables determinadas tienen ciertas características<sup>383</sup>.

En la tabla XIX, se resumen cada uno de los test utilizados según la variable a tener en cuenta.

**Tabla XIX.** Análisis estadístico según tipo de variable

FACTOR DE ESTUDIO	CUALITATIVO NOMINAL			CUANTITATIVO
	2 categorías	>2 categorías	ordinal	
<b>Cualitativo (2 grupos)</b>				
Independientes	Z de comparación de proporciones	$\chi^2$	U de Mann-Whitney	t de Student-Fisher
Apareados	$\chi^2$ Prueba de McNemar	- Q de Cochran	- Prueba de los signos	Preueba de Welch t de Student-Fisher
	Prueba exacta de Fisher		Prueba de los Rangos asignados Wilcoxon	
<b>Cuantitativo (&gt;2 grupos)</b>				
Independientes	$\chi^2$	$\chi^2$	Prueba de Kuskal-Wallis	Análisis de la varianza
Apareados	Q de Cochran	Análisis de la Varianza	Correlación de Spearman	Correlación de Pearson
<b>Cuantitativo</b>	t de Student-Fisher	Análisis de la Varianmza	Correlación de Spearman	Regresión lineal

\*Copiado y modificado de:

<http://scientific-european-federation-osteopaths.org/es/metodologiadelainvestigacióncientifica>

El tamaño de la muestra (índice o ratio paciente/control fue 1/2) y se calculó teniendo en cuenta las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos seleccionados para el estudio, teniendo en cuenta a la información existente para la población española o la de otras poblaciones similares a esta<sup>361</sup>.

Para los fines estadísticos se ha considerado la pre-eclampsia como una variable dependiente. Las variables independientes con la que se ha comparado la variable dependiente han sido: (i) los polimorfismos genéticos de los genes *COMT*, *MMP 9*, *MTHFR* y *HLA-G*; (ii) las variables clínicas de la madre (edades cronológica y gestacional, gestaciones previas, grupo sanguíneo, paridad (definiéndola como primípara o múltipara), abortos, tipos de parto (refiriéndose a parto espontáneo, inducido o cesárea), presentación de la pre-eclampsia (es decir, si esta era leve, moderada o severa según criterios clínicos), otros antecedentes personales (menarquía, tabaquismo, anticonceptivos orales, transfusiones, cirugía, alergias, infecciones graves sistémicas y presencia de *Streptococcus agalactiae*) y familiares; (iii) las variables relacionadas con el bienestar fetal (sexo, peso, grupo sanguíneo, índice Apgar y pH arteria umbilical) y (iv) puerperio y su evolución (normal, complicado o grave).

Una información más detallada de los análisis estadísticos utilizados se recogen en el ANEXO 2.

## **V. RESULTADOS**

### **1. Descripción de las poblaciones consideradas**

Se estudiaron un total de 330 pacientes, distribuidas en 110 casos y 220 controles. El 74,8% de las participantes del estudio tenían 35 años o menos y solo un 19,6% eran mayores de 35 años. La edad media del grupo en general fue de 31,9 años ( $31,7 \pm 4,4$  años las controles y  $32,1 \pm 4,8$ , las pacientes con pre-eclampsia). No hubo diferencia significativa por edad, observando que el grupo de casos presentó una edad promedio de  $32 \pm 4,8$  años, frente al grupo control que osciló en  $31 \pm 4,4$  años.

La tabla XX muestra la distribución por rangos de edad que es muy semejante entre grupos, siendo más frecuente en ambos grupos el rango comprendido entre los 31 a 35 años, con un proporción de 35.4% en los casos, y un 40.5% en los controles.

**Tabla XX.** Distribución por edades del grupo control y de las pacientes con pre-eclampsia

RANGO DE EDAD	CONTROLES (n= 220)	PRE-ECLAMPSIA (n= 110)
15-20	2	1
21-25	10	6
26-30	70	37
31-35	82	39
36-40	32	23
41-45	6	4

n= número de casos

No se tuvo en cuenta el índice de masa corporal como variable a recoger durante la revisión de las historias clínicas.

Al considerar el tabaquismo se dividió a las dos poblaciones en tres grupos: no fumadoras, fumadoras y ex fumadoras.

Refiriéndonos al número de gestaciones anteriores, definimos como primigestantes aquellas pacientes que nunca habían presentado otro embarazo.

La edad de la menarquía varió entre 12,2 y 12,3 años, en los casos y en los controles, respectivamente.

De las variables referentes al producto de la gestación y al bienestar del mismo, observamos que de los 319 recién nacidos de los cuales se obtuvieron datos clínicos, 51,4% fueron varones y 48,5% fueron hembras mostrando una discreta tendencia entre las mujeres con pre-eclampsia a alumbrar varones aunque esto no fue estadísticamente significativo.

Entre las variables de bienestar fetal que se revisaron en este estudio, se consideró principalmente el peso del recién nacido, la puntuación obtenida tras realizar el test de Apgar y el pH en la arteria umbilical al nacimiento. También se registró el peso medio de los recién nacidos de mujeres con pre-eclampsia y controles (ver en el apartado 2).

Por otra parte, solo en el grupo de pacientes con pre-eclampsia, se tuvo en cuenta la edad gestacional media de comienzo de la pre-eclampsia, que resultó ser de

34,6 ± 3,8 semanas en nuestro grupo de estudio. La tabla XXI muestra el número de casos en cada uno de los rangos de edad gestacional considerados.

**Tabla XXI.** Rango de edad gestacional de comienzo de la pre-eclampsia en el grupo de estudio

EDAD GESTACIONAL (semanas)	PRE-ECLAMPSIA (n=110)
20-25	7
26-30	15
31-35	41
36-40	47

n= número de casos

## **2. Variables clínicas y factores de riesgo**

Analizando las variables clínicas y los factores de riesgo para pre-eclampsia se estudió el comportamiento de los algunos de los factores de riesgo asociados a esta, tales como, edad, nuliparidad, historia personal o familiar de pre-eclampsia, antecedentes de infecciones sistémicas maternas, utilización de anticonceptivos orales, grupo sanguíneo materno, abortos previos, hábito tabáquico, edad de menarquía y variables de bienestar fetal relacionadas a esta.

Como factores de riesgo para los estados hipertensivos del embarazo (específicamente para pre-eclampsia), los antecedentes personales son muy importantes a la hora de ayudar a determinar qué población podría ser susceptible de evolucionar a uno de estos estados. Dentro de estos antecedentes personales maternos pueden incluirse:

(i) Los antecedentes de infecciones sistémicas (como meningitis, tuberculosis o infecciones urinarias en la madre antes del embarazo) con el fin de observar si los casos pudiesen tener alguna susceptibilidad para la adquisición de algunas de estas donde el sistema inmunitario juega un papel principal como sistema encargado de combatir las mismas y a su vez relacionarlo con pre-eclampsia. Sin embargo no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa entre pacientes y controles (Tabla XXII).

(ii) Otras variables dentro del grupo de antecedentes personales (grupo sanguíneo materno, hábito tabáquico, antecedente de haber recibido transfusiones sanguíneas, antecedentes de alergias y otras enfermedades diferentes a las mencionadas en los criterios de exclusión, enfermedades autoinmunitarias, HTA y diabetes mellitus y antecedentes quirúrgicos). Desde el punto de vista del hábito tabáquico, la distribución general de los porcentajes en ambos grupos mostró que un 70,66% eran no fumadoras, un 25,8% fumadoras y un 3,4% ex fumadoras. En lo que respecta a los casos, el 74,54% pertenecieron al primer grupo frente a un 64,25% de los controles; el grupo de fumadoras presenta una distribución de un 18,18% de casos mientras que de controles fue de un 28,05%; y respecto al tercer grupo, el 2,72% de los casos fueron ex fumadoras frente a un 3,61% de los controles, hecho no estadísticamente significativo (Tabla XXII). Del total de mujeres que participaron en el estudio un 11,71% y un 11,76% de las pacientes con pre-eclampsia y las controles, respectivamente presentaron antecedentes de alguna enfermedad de base diferente a las referenciadas en los criterios de exclusión, pero no fue estadísticamente significativo (Tabla XXII). Treinta y cuatro presentaban antecedente de alergias (ya sea a medicamentos, a alimentos o de carácter

estacional) lo que representa que el 9,9% de los casos tenía antecedentes de alergias frente al 10,40% en el grupo control, sin significancia estadística (ver en la Tabla XXII). Por otra parte, un 21,62% de las pacientes tenía antecedentes quirúrgicos destacables (apendicetomías y amigdalectomías principalmente) mientras que solo un 10,40% de las mujeres control relataban dichos antecedentes; es decir, unas 2,5 veces más en las pacientes que en las mujeres sanas ( $p < 0,0036$ ) (Tabla XXII).

**Tabla XXII.** Distribución de los antecedentes personales en el grupo de estudio

CRITERIO	CON-TROLES (n)	PRE-ECLAPSIA (n)	OR (95% CI)	p
<b>Infección sistémica</b>				
No	203	87	1	-
Si	10	9	2,1 (0,82-5,37)	0,1136
<b>Tabaquismo</b>				
No	142	82	1	-
Si	6	20	0,57 (0,32-1,02)	0,0595
Ex fumadora	8	3	0,64 (0,16-2,52)	0,5302
<b>Transfusiones</b>				
No	204	109	1	-
Si	5	1	0,37 (0,04-3,26)	0,3547
<b>Alergias</b>				
No	189	98	1	-
Si	23	11	0,92 (0,43-1,97)	0,8349
<b>Antecedente quirúrgico</b>				
No	187	78	1	-
Si	23	24	2,50 (1,31-4,74)	<0,0036
<b>Enfermedad de base</b>				
No	183	75	1	-
Si	26	13	1,22 (0,59-2,50)	0,5874

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. OR=coeficiente de probabilidad; CI=intervalo de confianza.

Los antecedentes obstétricos que se definen como factores de riesgo para pre-eclampsia son varios. Se han incluido como variables a estudiar dentro de este grupo la historia personal de abortos, infecciones durante los embarazos positivos para estreptococos del grupo B y uso de anticonceptivos orales. Las diferencias entre pacientes y controles de estas variables consideradas no fueron estadísticamente significativas: (i) Primigravidez (aunque se ha encontrado un porcentaje mayor de pacientes primigestantes dentro del grupo de pacientes con pre-eclampsia, 64 con pre-eclampsia, 58,18%, que en el grupo control, 107 en el grupo control, 49,32%, esta diferencia no fue una variable estadísticamente significativa; (ii) historia de abortos (el 22,7% de las participantes habían tenido al menos un aborto en de sus antecedentes obstétricos; mostrando una distribución parecida entre ellos, en los casos el 23,63% de estos habían tenido dicho antecedente obstétrico positivo frente a un 21,71% de las controles); (iii) el antecedente en el uso de anticonceptivos, presento una distribución en la cual el 21,71% y el 22,52% de las mujeres sanas y de las pacientes, respectivamente, habían hecho uso de ellos y (iv) respecto a las infecciones por *Streptococcus agalactiae*

del grupo B, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, a pesar de que se presentaba más en las mujeres con pre-eclampsia (ver en la tabla XXIII).

**Tabla XXIII.** Distribución de los antecedentes obstétricos en el grupo de estudio

CRITERIO	CON-TROLES (n)	PRE-ECLAPSIA (n)	OR (95% CI)	<i>p</i>
<b>Primigravidez</b>				
No	107	46	1	-
Si	107	64	1,39(0,872-2,217)	0,16
<b>Abortos</b>				
No	165	84	1	-
Si	48	26	1,06(0,616-1,836)	0,82
<b>Anticonceptivos orales</b>				
No	161	72	1	-
Si	48	25	1,16(0,666-2,036)	0,59
<b>Infecciones por <i>S. agalactiae</i></b>				
No	184	84	1	-
Si	26	16	1,34(0,685-2,650)	0,38

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. OR=coeficiente de probabilidad; CI=intervalo de confianza.

Otras variables que fueron estudiadas durante el embarazo de cada gestante que participaron en el estudio fueron: el tipo de embarazo (es decir, si fue un embarazo único o múltiple), el sexo y grupo sanguíneo del feto, tipo de parto y evolución del puerperio. En este caso, el análisis estadístico sí ofreció diferencias significativas. Las pacientes que desarrollaron pre-eclampsia, tuvieron 9,2 veces más embarazos múltiples que las controles ( $p < 0,0008$ ). Igualmente la cesárea y la inducción del parto fue 15,7 y 19,2 veces mayor en las pacientes con pre-eclampsia, lo que fue estadísticamente significativo ( $p = 0,0000$ ). La evolución del puerperio de las mujeres con pre-eclampsia tendió de forma estadísticamente significativa hacia su complicación y gravedad (aproximadamente dos veces más que en circunstancias normales), a la diferencia de lo que ocurrió en el grupo control que tendió a la normalidad. El comportamiento de las otras variables mencionadas tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos.

La tabla XXIV muestra la distribución, tanto en casos como en controles, de estas variables.

**Tabla XXIV.** Distribución de las variables relacionadas con las características del embarazo y el parto.

CRITERIO	CON-TROLES* (n)	PRE-ECLAMPSIA (n)	OR (95% CI)	<i>p</i>
<b>Embarazo múltiple</b>				
No	207	101	1	-
Si	2	9	9,22(1,89-44,8)	0,0008
<b>Sexo del feto</b>				
Masculino	106	56	1	-
Femenino	103	52	0,95 (0,599-1,522)	0,8484
<b>Tipo de parto</b>				
Espontáneo	144	13	1	-
Cesárea	45	64	15,75 (6,95-35,70)	0,0000
Inducción	19	33	19,23 (7,21-51,33)	0,0000
<b>Puerperio</b>				
Tendente a la normalidad	142	55	1	-
Complicado	50	38	1,96 (1,153-3,337)	0,0113
Grave	16	13	2,09 (0,939-4,683)	0,0644

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. OR=coeficiente de probabilidad; CI=intervalo de confianza.

Respecto al peso, se observa que los recién nacidos de madres normales presentan un peso medio aproximado de 3129 g mientras que los recién nacidos de madres con diagnóstico de pre-eclampsia presentaron un peso medio al nacer de 2619 g ( $p=0.000$ ) (ver tabla XXV) lo que indica que es una variable a tener en consideración. (es importante recordar que el peso del recién nacido es el resultado de un proceso de la gestación y por tanto se ve afectado por cualquier desequilibrio que durante el mismo pueda ocurrir).

Por otra parte la puntuación obtenida, mediante la prueba de Apgar, tras el primer minuto en los recién nacidos controles e hijos de madres con pre-eclampsia fue de  $8,69 \pm 1,07$  y  $8,49 \pm 1,05$ , respectivamente, diferencia que no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, el resultado de la prueba de Apgar a los 5 minutos, es de  $9,24 \pm 0,76$  y  $8,84 \pm 0,49$  en los controles y en los nacidos de madres con pre-eclampsia, lo que si fue significativo ( $p=0,0000$ ) (ver Tabla XXV).

Estas variables, peso y prueba de Apgar, representan muestras del bienestar fetal que no solo indican el estado inmediato del recién nacido, sino también una los efectos de un hipotética noxa crónica que actuó en el medio en el que se encontraba.

Otra de las variables que nos muestra el bienestar fetal es el pH de la arteria umbilical, que en nuestro estudio resultó ser similar en ambos grupos de mujeres (en torno a 7,2). También en la tabla XXV se resumen estas observaciones.

**Tabla XXV.** Variables de bienestar fetal en mujeres con pre-eclampsia y en controles

CRITERIO	n= 330	MEDIA ± SD	95%CI
<b>Peso del recién nacido (g)*</b>			
Controles	189	3129 ± 471,12	3125-3260
Pre-eclampsia	106	2619 ± 663,27	2491-2746
<b>Apgar (1min)</b>			
Controles	189	8,69 ± 1,07	8,53-8,84
Pre-eclampsia	104	8,49 ± 1,05	8,28-8,69
<b>Apgar (5 min)*</b>			
Controles	189	9,24 ± 0,76	9,13-9,35
Pre-eclampsia	104	8,84 ± 0,49	8,74-8,94
<b>pH arteria umbilical</b>			
Controles	146	7,275 ± 0,08	7,26-7,28
Pre-eclampsia	65	7,276 ± 0,06	7,25-7,29

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. SD=desviación estándar, CI=intervalo de confianza, \* $p=0.0000$ .

### **3. Polimorfismos genéticos en pre-eclampsia**

Se ha estudiado la distribución de los genotipos y alelos de los genes considerados en mujeres con pre-eclampsia y en controles.

Se consideró igualmente la distribución de cada uno de los cuatro genes estudiados y sus respectivos genotipos y la relación con las variables clínicas. Este tipo de análisis solo se presenta en la población control a manera de reajuste, para determinar el comportamiento de dichas variables y así catalogarlas como variables de confusión, o poder determinar si son un factor de riesgo para la entidad en estudio. Por otra parte permite plantear si dicha variable se asocia o no al SNP o si por el contrario es una posible consecuencia de este; estableciendo de forma general su asociación o no con el SNP o realizando una descripción general de la misma respecto al genotipo evaluado.

#### **3.1. Metaloproteinasa 9 de la matriz extracelular (MMP-9)**

El polimorfismo referente al gen *MMP9*, mostró un significado estadístico claro ( $p=0.0004$ ) entre casos y controles respecto a la distribución entre grupos del mismo.

En la Tabla XXVI, una tabla de 2x2, se observa que los genotipos homocigotos salvaje *CC* fueron más frecuentes en la población sana que en la población de las pacientes con diagnóstico de pre-eclampsia. Por su parte el genotipo mutante *TT* fue más frecuente (más de 3,5 veces) en las pacientes con pre-eclampsia, que en las controles ( $p<0,0001$ ), lo que indicaría que el genotipo mutante para este polimorfismo está asociado a pre-eclampsia en nuestra muestra. Esta tabla muestra la distribución y frecuencia genotípica del polimorfismo *-1562C/T* en ambos grupos de estudio. En ella analizamos las frecuencias genotípicas tanto en casos como en controles, es decir, la proporción de individuos pertenecientes a cada genotipo en la población considerada, observándose que la frecuencia genotípica de homocigotos salvajes *CC* en el grupo de casos fue de 0,69 (69% de la muestra) frente a un 0,80 (80%) del mismo genotipo en los controles. La proporción de homocigotos mutados *TT* fue de 0,12 (12%) en los casos mientras que en los controles fue de 0,01 (1%); por su parte, la proporción de

heterocigotos para este genotipo en casos fue de 0,18 (18%) frente a un 0,17 (17%) en los controles.

**Tabla XXVI.** Distribución de los genotipos y alelos de *MMP9* en mujeres con pre-eclampsia y en controles.

GENOTIPO <i>MMP9</i> Y ALELOS	CON- TROLES n=204	PRE- ECLAMPSIA n=110	OR (95% CI)	<i>p</i>
<i>CC</i>	164 (0,80)	76 (0,69)	1, 00	-
<i>TT</i>	4 (0,01)	14 (0,12)	7,55 (2,31-24,64)	<0,0001
<i>CT</i>	36 (0,17)	20 (0,18)	1,19 (0,65-2,21)	0,5608
Alelo <i>C</i>	0,885	0,78*		
Alelo <i>T</i>	0,095	0,21*		

n= número de sujetos del estudio (frecuencia genotípica), OR=coeficiente de probabilidad; CI=intervalo de confianza, *CC*= homocigoto salvaje, *TT*= homocigoto mutado, *CT*=heterocigoto.  
\* Número de casos: alelo *C*: 96; alelo *T*: 34.

El cociente de probabilidad que se muestra en la tabla anterior indica que el comportamiento de este genotipo en la población estudiada es propio de un patrón recesivo. Igualmente, se observa el cálculo de las frecuencias alelicas (proporción de los diferentes alelos de cada locus en la población) que indica, que la proporción del alelo *C* en el grupo de casos fue de 0,78 frente a un 0,885 en los controles, mientras que el alelo *T* mostró una proporción de 0,21 en los casos frente a un 0,095 en los controles, ambos resultados dejan claro el comportamiento polimórfico de ambos loci. (Tabla XXVI).

En este contexto, ninguna de las variables (continuas) estudiadas, ya sean las relacionadas con la madre (edad materna, edad en que se presentó la menarquía) o las relacionadas con el bienestar fetal (peso al nacer, valor de las pruebas de Apgar y pH arterial), resultó estar estadísticamente ligada a un genotipo en particular; es decir, no están asociadas al SNP *-1562C/T* de *MMP9*. Permittiéndonos establecer que no fueron un factor de riesgo para el desarrollo de pre-eclampsia en nuestra muestra (Tabla XXVII).

**Tabla XXVII.** Variables continuas y genotipo *MMP9* en la población estudiada.

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>MMP9</i>	CONTROLES	
		n	media ± SD
Edad (años)	<i>CC</i>	161	31,50 ± 4,36
	<i>TT</i>	4	29,75 ± 7,13
	<i>CT</i>	35	32,85 ± 4,35
Menarquía (años)	<i>CC</i>	141	12,26 ± 0,95
	<i>TT</i>	4	13,00 ± 0,00
	<i>CT</i>	33	12,09 ± 1,18
Peso del recién nacido (g)	<i>CC</i>	149	3179,4 ± 489,79
	<i>TT</i>	4	3107,5 ± 228,67
	<i>CT</i>	36	3256,9 ± 409,24
Apgar del recién nacido	<i>CC</i>	150	8,60 ± 1,10
	<i>TT</i>	4	9,00 ± 0,00
	<i>CT</i>	35	8,70 ± 0,73
pH arteria umbilical	<i>CC</i>	117	7,27 ± 0,08
	<i>TT</i>	1	7,26 ± 0,00
	<i>CT</i>	18	7,28 ± 0,09

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. SD=desviación estándar.

Igualmente se analizaron otras variables clínicas (categóricas) y su relación con el polimorfismo *-1562C/T* del gen *MMP9*, en donde cabe notar el comportamiento del valor de *p* en la tabla 2x2 de dos de las variables, infecciones estreptocócicas del grupo B y el antecedente en la historia de tratamiento con anticonceptivos orales, en las que *p* es 0,05 y 0,016, respectivamente. Esto podría indicar que la presencia del alelo *T* estuviese relacionada a una mayor susceptibilidad a dichas infecciones; aunque no podemos atribuir este resultado como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Tabla XXVIII).

**Tabla XXVIII.** Frecuencias genotípicas de *MMP9* en función de las variables clínicas categóricas en la población control

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>MMP9</i>		
	<i>CC</i>	<i>TT</i>	<i>CT</i>
<b>Infección por <i>S. agalactiae</i>*</b>			
No (n=172)	142	2	28
Si (n=26)	18	2	6
<b>Anticonceptivos orales**</b>			
Si (n=152)	127	1	24
No (n=40)	31	3	6
<b>Primigravidez</b>			
No (n=102)	78	2	22
Si (n=100)	84	2	14
<b>Aborto</b>			
No (n=156)	126	3	27
Si (n=45)	35	1	9
<b>Infecciones sistémicas</b>			
No (n=191)	152	4	35
Si (n=10)	9	0	1
<b>Tabaquismo</b>			
No (n=134)	103	3	28
Si (n=56)	48	1	7
Ex fumadora (n=8)	7	0	1
<b>Transfusiones</b>			
No (n=193)	153	4	36
Si (n=5)	5	0	0
<b>Puerperio</b>			
Tendencia a la normalidad (n=136)	108	3	25
Complicado (n=46)	40	1	5
Grave (n=15)	11	0	4
<b>Alergias</b>			
No (n=177)	140	4	33
Si (n=23)	20	0	3
<b>Antecedentes quirúrgicos</b>			
No (n=176)	139	4	33
Si (n=22)	19	0	3
<b>Tipo de parto</b>			
Espontáneo (n=138)	108	4	26
Cesárea (n=41)	34	0	7
Inducción (n=18)	16	0	2
<b>Enfermedad de base</b>			
No (n=174)	139	3	32
Si (n=23)	18	1	4

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. \*p = 0,05; \*\*p= 0,016

### 3.2. Catecolmetiltransferasa (COMT)

La comparación de la distribución de los genotipos asociados al gen *COMT* entre mujeres con pre-eclampsia y sus controles correspondientes fue estadísticamente significativa (valor de  $p=0,0056$ ). Sin embargo se observa el comportamiento de la distribución de estos genotipos en la tabla XXVIII, donde el genotipo homocigoto mutante asociado a baja actividad de la enzima, *Met/Met*, se presenta en un 18% de los casos frente a un 16% de los controles aunque presenta un valor de  $p=0,1952$ ; el genotipo heterocigoto *Val/Met* muestra una  $p=0,0014$ . Estos datos no se analizan dado el desequilibrio de ligamiento en que se encuentra dicho gen en esta población de estudio.

**Tabla XXIX.** Distribución de los genotipos *COMT* y de los alelos en mujeres con pre-eclampsia y en controles.

GENOTIPO <i>COMT</i> Y ALELOS	CON- TROLES n=204	PRE- ECLAMPSIA n=110	OR (95% CI)	<i>p</i>
<i>Val/Val</i>	38 (0,18)	37 (0,33)	1,00	-
<i>Met/Met</i>	33 (0,16)	20 (0,18)	0,622 (0,30-1,28)	0,1952
<i>Val/Met</i>	133 (0,65)	53 (0,48)	0,409 (0,23-0,72)	0,0014
Alelo <i>Val</i>	0,57	0,505*		
Alelo <i>Met</i>	0,42	0,485*		

n=número de personas estudiadas (frecuencia genotípica), OR=coeficiente de probabilidad; CI=intervalo de confianza, *Val/Val*=homocigoto salvaje, *Met/Met*=homocigoto mutado, *Val/Met*=heterocigoto, *p* general del genotipo *COMT*=0,0056. \* Número de casos: alelo *Val*: 90; alelo *Met*:73.

Se calcularon las proporciones de los diferentes alelos de cada locus en las poblaciones estudiadas. La frecuencia alélica del alelo *Val* en el grupo de mujeres con pre-eclampsia fue de 0,57 y de un 0,505 en los controles. Por otra parte, la frecuencia alélica del alelo *Met* fue 0,42 en los casos frente a un 0,485 en los controles (Tabla XXIX) ambos resultados dejan claro el comportamiento polimórfico de ambos loci.

El análisis de las variables continuas y su relación con el genotipo *COMT* muestra que ninguna de las variables analizadas tiene un valor estadísticamente significativo para ser considerada como factor de riesgo o que muestre algún tipo de asociación con dicho genotipo (tablas XXX y XXXI).

**Tabla XXX.** Correlación entre las variables clínicas continuas y el genotipo *COMT* en la población estudiada.

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>COMT</i>	CONTROLES	
		n	media ± SD
Edad (años)	<i>Val/Val</i>	36	31,75 ± 3,85
	<i>Met/Met</i>	33	30,78 ± 4,58
	<i>Val/Met</i>	131	31,96 ± 4,53
Menarquia (años)	<i>Val/Val</i>	31	12,29 ± 1,03
	<i>Met/Met</i>	27	12,03 ± 0,85
	<i>Val/Met</i>	120	12,29 ± 1,01
Peso del recién nacido (g)	<i>Val/Val</i>	34	3194,4 ± 384,10
	<i>Met/Met</i>	29	3121,3 ± 456,45
	<i>Val/Met</i>	126	3164,5 ± 494,05
Apgar del recién nacido	<i>Val/Val</i>	33	8,81 ± 0,40
	<i>Met/Met</i>	29	8,82 ± 0,50
	<i>Val/Met</i>	127	8,62 ± 1,25
pH arteria umbilical	<i>Val/Val</i>	23	7,27 ± 0,06
	<i>Met/Met</i>	24	7,28 ± 0,1
	<i>Val/Met</i>	99	7,27 ± 0,08

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas, SD=desviación estándar

**Tabla XXXI.** Frecuencias genotípicas de *COMT* en función de variables clínicas categóricas

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>COMT</i>		
	<i>Val/Val</i>	<i>Met/Met</i>	<i>Val/Met</i>
<b>Primigravidez</b>			
No (n=102)	16	20	66
Si (n=100)	21	13	66
<b>Aborto*</b>			
No (n=156)	31	21	104
Si (n=45)	6	12	27
<b>Infecciones sistémicas</b>			
No (n=191)	35	30	126
Si (n=10)	2	3	5
<b>Infección por <i>Streptococcus agalactiae</i></b>			
No (n=172)	32	31	109
Si (n=26)	4	2	20
<b>Tabaquismo</b>			
No (n=134)	26	21	87
Si (n=56)	10	10	36
Ex fumadora (n=8)	1	1	6
<b>Transfusiones</b>			
No (n=193)	36	31	126
Si (n=5)	0	1	4
<b>Anticonceptivos orales</b>			
No (n=152)	25	27	100
Si (n=45)	10	5	30
<b>Puerperio</b>			
Tendencia a la normalidad (n=136)	28	22	86
Complicado (n=46)	7	5	34
Grave (n=15)	1	5	9
<b>Alergias</b>			
No (n=177)	34	29	114
Si (n=23)	3	3	17
<b>Antecedentes quirúrgicos</b>			
No (n=176)	33	28	115
Si (n=22)	4	4	14
<b>Tipo de parto</b>			
Espontáneo (n=138)	26	21	91
Cesárea (n=41)	10	6	25
Inducción (n=18)	1	5	12
<b>Enfermedad de base</b>			
No (n=174)	35	28	111
Si (n=23)	2	4	17

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. \* $p=0,096$ , según las prueba exacta de Fisher.

### 3.3. Antígeno de histocompatibilidad humana G (HLA-G)

Puesto que algunas investigaciones<sup>309-311</sup> han comunicado la presencia del alelo +14bp del gen *HLA-G* asociado a pre-eclampsia, esto fue también considerado en nuestra población. La tabla XXXII muestra la distribución de los genotipos del *HLA-G* y las frecuencias genotípicas y alélicas. Los valores de *p* no fueron significativos en ningún caso. Los genotipos +14bp/+14bp y +14bp/-14bp, representan el 66% de los casos.

**Tabla XXXII.** Distribución de los genotipos *HLA-G* y de los alelos en mujeres con pre-eclampsia y en controles.

GENOTIPO <i>HLA-G</i> Y ALELOS	CON- TROLES n=204	PRE- ECLAMPSIA n=110	OR (95% CI)	<i>p</i>
+14bp/+14bp	38 (0,18)	18(0,16)	1,00	-
-14bp/-14bp	66 (0,32)	37(0,33)	1,18 (0,59-2,36)	0,6333
+14bp/-14bp	100 (0,49)	55(0,50)	1,16 (0,60-2,28)	0,6531
Alelo +14bp	0,425	0,41*		
Alelo -14bp	0,565	0,58*		

n=número de sujetos estudiados (frecuencia genotípica), OR=coeficiente de probabilidad; CI=intervalo de confianza. \* Número de casos: alelo +14 bp: 93; alelo -14bp: 92.

Al calcular las frecuencias del alelo +14bp y del alelo -14bp, se observa que las frecuencias son muy similares en mujeres con pre-eclampsia y en controles: el primero de ellos se presenta en el 41% de las mujeres con pre-eclampsia y en los controles se encuentra en un 42%; por otra parte, la proporción del alelo -14bp en los casos es de 58% frente a un 56% de los controles; es decir ambos menores de la unidad, datos que dejan claro el comportamiento polimórfico de ambos loci (Tabla XXXII).

El análisis de las variables continuas al relacionarlas con los genotipos del polimorfismo 14pb del gen *HLA-G* muestra que ninguna de las variables (con excepción tal vez del peso del recién nacido) tiene un valor estadísticamente significativo para ser considerada factor de riesgo para padecer la pre-eclampsia o muestren algún tipo de asociación con el genotipo del *HLA-G* (Tabla XXXIII). En lo que respecta a esta significancia estadística del mayor peso del recién nacido con el genotipo homocigoto -14pb/-14pb del *HLA-G* estudiado ( $p=0,01$ ), podemos tal vez atribuir dicho comportamiento al hecho que la pre-eclampsia ejerce efectos sobre el bienestar fetal, infiriendo tal vez que las mujeres sanas que no poseen el alelo de riesgo descrito como asociado a la entidad, tendrían un efecto protector sobre el bienestar fetal, especialmente en lo que respecta al peso del producto.

**Tabla XXXIII.** Variables continuas y su relación con los genotipos de *HLA-G*

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>HLA-G</i>	CONTROLES	
		n	media ± SD
Edad (años)	+14bp/+14bp	37	31,59 ± 3,53
	-14bp/-14bp	66	31,46 ± 4,59
	+14bp/-14bp	97	31,95 ± 4,64
Menarquia (años)	+14bp/+14bp	32	12,43 ± 1,04
	-14bp/-14bp	27	12,18 ± 0,99
	+14bp/-14bp	120	12,22 ± 0,98
Peso del recién nacido (g)*	+14bp/+14bp	36	3136,8 ± 543,67
	-14bp/-14bp	63	3330,3 ± 362,45
	+14bp/-14bp	90	3118,6 ± 490,77
Apgar del recién nacido	+14bp/+14bp	36	8,66 ± 0,90
	-14bp/-14bp	64	8,82 ± 0,40
	+14bp/-14bp	89	8,60 ± 1,38
pH arteria umbilical	+14bp/+14bp	27	7,28 ± 0,10
	-14bp/-14bp	47	7,27 ± 0,08
	+14bp/-14bp	72	7,27 ± 0,08

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. SD=desviación estándar.

\* $p=0.01$

La tabla XXXIV muestra las frecuencias genotípicas +14/+14bp, -14/-14bp y +14/-14bp del gen *HLA-G* en la población control en función de las variables categóricas o criterios clínicos considerados.

**Tabla XXXIV.** Frecuencias genotípicas en *HLA-G* en función de las variables categóricas

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>HLA-G</i>		
	+14/+14bp	-14/-14bp	+14/-14bp
<b>Primigravidez</b>			
No (n=102)	15	36	51
Si (n=100)	22	30	48
<b>Aborto</b>			
No (n=156)	30	51	75
Si (n=45)	7	15	23
<b>Infecciones sistémicas</b>			
No (n=191)	34	64	93
Si (n=10)	2	2	6
<b>Infección por <i>Streptococcus agalactiae</i></b>			
No (n=172)	30	58	84
Si (n=26)	6	7	13
<b>Tabaquismo*</b>			
No (n=134)	27	46	61
Si (n=56)	5	18	33
Ex fumadora (n=8)	4	0	4
<b>Transfusiones</b>			
No (n=193)	37	62	94
Si (n=5)	0	2	3
<b>Anticonceptivos orales</b>			
No (n=152)	27	47	78
Si (n=45)	9	17	19
<b>Puerperio</b>			
Tendencia a la normalidad (n=136)	23	47	66
Complicado (n=46)	11	13	22
Grave (n=15)	3	5	7
<b>Alergias</b>			
No (n=177)	34	55	88
Si (n=23)	3	10	10
<b>Antecedentes quirúrgicos</b>			
No (n=176)	32	58	86
Si (n=22)	4	6	12
<b>Tipo de parto</b>			
Espontáneo (n=138)	25	44	69
Cesárea (n=41)	11	10	20
Inducción (n=18)	1	11	6
<b>Enfermedad de base</b>			
No (n=174)	33	58	83
Si (n=23)	3	6	14

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. \* $p=0,018$  según la prueba exacta de Fisher.

### 3.4. Metil-tetra-hidrofolato-reductasa (MTHFR)

Cuando se consideran los genotipos de *MTHFR* en relación con la pre-eclampsia (Tabla XXXV), si se observan diferencias significativas. La frecuencia genotípica de homocigotas salvajes *CC* en el grupo de casos fue de un 52 % de la muestra frente a un 45% del mismo genotipo en las controles. Sin embargo, la proporción de homocigotos mutados *TT* fue 23% y 11% en los casos y en las controles, respectivamente ( $p=0.0717$ ) y las proporciones de las heterocigotas en los casos y en los controles fue de 23% y 42%, respectivamente ( $p=0.008$ ). El comportamiento del cociente de probabilidad que se observa en la tabla XXXV de este genotipo muestra un tipo de patrón recesivo para el mismo.

**Tabla XXXV.** Distribución de los genotipos y alelos de *MTHFR* en mujeres con pre-eclampsia y en controles.

GENOTIPO <i>MTHFR</i> Y ALELOS	CON- TROLES n=204	PRE- ECLAMPSIA n=110	OR (95% CI)	<i>p</i>
<i>CC</i>	93 (0,45)	58 (0,52)	1,00	-
<i>TT</i>	23 (0,11)	26 (0,23)	1,812 (0,93-3,49)	0,0717
<i>CT</i>	87 (0,42)	26 (0,23)	0,479 (0,27-0,835)	0,0080
Alelo <i>C</i>	0,66	0,635*		
Alelo <i>T</i>	0,32	0,345*		

n=número de sujetos observados (frecuencia genotípica), OR=coeficiente de probabilidad, CI=intervalo de confianza, *CC*=homocigoto salvaje; *TT*=homocigoto mutado; *CT*=heterocigoto.  
\* Número de casos: alelo *C*: 74; alelo *T*: 22.

Se calcularon también las frecuencias alélicas (ver tabla XXXV) o proporción de los diferentes alelos de cada locus en las poblaciones estudiadas; encontrando que la proporción del alelo *C* en las mujeres con pre-eclampsia y en las controles fue 0,635 y 0,66 respectivamente, mientras que las del alelo *T* fueron 0,345 y 0,32 respectivamente; datos que dejan claro el comportamiento polimórfico de ambos locs.

El análisis de las variables continuas relacionadas con la madre (edad, menarquía) y las relacionadas con el feto (peso al nacer y pH de la arteria umbilical) no se asocian al polimorfismo *677C/T* en el gen *MTHFR*, por lo que no pueden ser consideradas factores de riesgo para la pre-eclampsia (ver tabla XXXVI).

**Tabla XXXVI.** Distribución de los genotipos de *MTHFR* en función de las variables continuas en pre-eclampsia y en el grupo control

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CONTROLES	
		n	media ± SD
Edad (años)	<i>CC</i>	91	31,14 ± 4,64
	<i>TT</i>	21	32,52 ± 3,69
	<i>CT</i>	87	32,14 ± 4,35
Menarquia (años)	<i>CC</i>	81	12,29 ± 0,92
	<i>TT</i>	18	12,27 ± 1,17
	<i>CT</i>	78	12,20 ± 1,03
Peso del recién nacido (g)	<i>CC</i>	86	3201,8 ± 456,34
	<i>TT</i>	22	3314,5 ± 479,99
	<i>CT</i>	80	3144,5 ± 84,26
Apgar del recién nacido	<i>CC</i>	85	8,7 ± 1,10
	<i>TT</i>	22	8,5 ± 1,00
	<i>CT</i>	81	8,6 ± 0,98
pH arteria umbilical	<i>CC</i>	71	7,26 ± 0,07
	<i>TT</i>	14	7,28 ± 0,07
	<i>CT</i>	61	7,28 ± 0,10

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas, SD=desviación estándar.

A continuación se muestra en la tabla XXXVII el análisis de las variables clínicas (categóricas) y su relación con cada uno de los genotipos del gen *MTHFR*.

**Tabla XXXVII.** Frecuencias genotípicas en el gen *MTHFR* en función de variables categóricas

CRITERIO CLÍNICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>		
	<i>CC</i>	<i>TT</i>	<i>CT</i>
<b>Primigravidez</b>			
No (n=101)	50	8	43
Si (n=100)	42	14	44
<b>Aborto</b>			
No (n=156)	71	18	67
Si (n=44)	21	3	20
<b>Infecciones sistémicas</b>			
No (n=190)	85	21	84
Si (n=10)	6	1	3
<b>Infección por <i>Streptococcus agalactiae</i></b>			
No (n=171)	79	15	77
Si (n=26)	11	6	9
<b>Tabaquismo</b>			
No (n=134)	58	15	61
Si (n=56)	26	6	24
Ex fumadora (n=7)	6	1	0
<b>Transfusiones</b>			
No (n=192)	88	21	83
Si (n=5)	3	0	2
<b>Anticonceptivos orales</b>			
No (n=151)	72	16	63
Si (n=45)	17	6	22
<b>Puerperio</b>			
Tendencia a la normalidad (n=135)	63	13	59
Complicado (n=46)	22	5	19
Grave (n=15)	6	3	6
<b>Alergias*</b>			
No (n=176)	77	18	81
Si (n=23)	14	4	5
<b>Antecedentes quirúrgicos</b>			
No (n=175)	77	21	77
Si (n=22)	13	1	8
<b>Tipo de parto</b>			
Espontáneo (n=137)	65	15	57
Cesárea (n=41)	16	5	20
Inducción (n=18)	10	1	7
<b>Enfermedad de base</b>			
No (n=173)	81	19	73
Si (n=23)	10	2	11

El número total de casos (n) en cada criterio considerado es diferente pues no todos los datos estaban disponibles en las historias clínicas. \* $p=0,058$  según la prueba exacta de Fisher.

## VI. DISCUSIÓN

Muchas enfermedades muestran agrupación por familias, sin que conformen ningún patrón reconocido de herencia mendeliana. Los ejemplos incluyen varias de las más comunes malformaciones congénitas y muchas de las enfermedades más frecuentes del adulto. Estos procesos muestran una tendencia familiar muy clara, pero la incidencia en familiares cercanos de los individuos afectados suele rondar el 2-4%, en lugar de las cifras mucho más altas que podríamos observar si estos procesos estuviesen causados por mutaciones de un único gen.<sup>349</sup>

Es probable que varios factores, tanto genéticos como ambientales, estén implicados en la aparición de estas enfermedades, conocidas como enfermedades de herencia poligénica o multifactorial. La herencia poligénica por tanto es el conjunto responsable de muchos caracteres aparentemente sencillos pero que en realidad no lo son tanto. La mayoría de las enfermedades comunes tiene un origen multifactorial, razón por la cual no siguen patrones hereditarios mendelianos y se les denomina enfermedades “complejas”. Entre estas enfermedades complejas se encuentran, por ejemplo, la diabetes, la HTA y las enfermedades cardiovasculares. La pre-eclampsia puede considerarse también como una de estas enfermedades complejas<sup>353</sup>.

Cuando se plantean estudios genéticos de una determinada entidad clínica hay un factor asociado que no suele tenerse en cuenta y que en el caso concreto de la pre-eclampsia no está suficientemente estudiado; el carácter antropológico o etnicidad de la población considerada. El origen étnico podría desempeñar un papel en la expresión de la pre-eclampsia y merecería tenerlo en cuenta en la vigilancia prenatal de las embarazadas<sup>433</sup>.

Un planteamiento que parecía adecuado para este estudio ha sido la búsqueda de genes y alteración en los mismos y/o en su expresión como elementos causales de enfermedad. Considerando a la pre-eclampsia una afección del embarazo de origen multifactorial<sup>65</sup>, el propósito de este trabajo ha sido la identificación de SNP en diferentes genes que directa o indirectamente estén relacionados con el embarazo, y asociarlo a un efecto fisiopatológico consecutivo a la sobreexpresión, subexpresión o expresión aberrante del gen implicado.

La pre-eclampsia es una entidad sobre la cual se está realizando una exhaustiva investigación debido a la importante morbi-mortalidad materno-fetal<sup>255,259</sup>. Sin embargo, aunque no se dispone de un buen método de cribado que ayude a predecirla, si se conocen ciertos aspectos de la misma que ayudan a su diagnóstico relativamente precoz. Desde ese punto de vista se decidió realizar un estudio buscando un componente genético que ayudase a definir el riesgo o susceptibilidad a desarrollar un cuadro de pre-eclampsia durante el embarazo.

La pre-eclampsia es una enfermedad de prevalencia considerable (1-3%)<sup>62</sup> y de una morbilidad grave dependiendo de la edad gestacional a que se presenta y de la precocidad del diagnóstico.

Aunque es de destacar la baja incidencia observada en España en relación con los países anglosajones, se observó que la frecuencia de los estados hipertensivos durante el embarazo era del 2,59%, de los cuales el 1,1% correspondían a pre-eclampsia, el 0,4% a HTA crónica, el 0,3% a HTA crónica mas pre-eclampsia sobre añadida y el 0,5% a HTA transitoria<sup>360,361</sup>.

Hay una serie de factores cuya presencia se relaciona en mayor o menor grado con el posterior diagnóstico de una pre-eclampsia (V.g.: antecedentes familiares y personales de la paciente y la historia de la actual gestación). En un estudio realizado sobre un total de 30.784 gestantes, se estableció una tasa de detección de un 33% de los

casos de pre-eclampsia que requirieron la finalización de la gestación antes de las 34 semanas, exclusivamente con la utilización de los datos de la historia clínica<sup>341</sup>. Según la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia<sup>357</sup>, entre los factores que aumentan el riesgo de sufrir pre-eclampsia están: nuliparidad (triplica el riesgo de pre-eclampsia), obesidad, antecedentes familiares de pre-eclampsia (se triplica el riesgo), pre-eclampsia en una gestación previa, HTA crónica, enfermedades previas (enfermedad renal crónica, diabetes mellitus gestacional, embarazo múltiple e historia de trombofilia). También se ha señalado al tabaco como otro factor de riesgo<sup>62,66</sup>. La edad materna (pertenecer a los extremos de la vida reproductiva, la adolescencia y el tener > 40 años, el principal grupo de riesgo) y el sobrepeso en los primeros meses del embarazo (IMC>35), son otros factores de riesgo. Por otra parte numerosos estudios han considerado la pertenencia a determinadas agrupaciones étnicas (afro-americanas e hispanas; aunque desde luego estas características no son muy antropológicas sino más bien sociales) y el nivel socioeconómico (déficit nutricionales alcanzan mayor incidencia en algunos países en vía de desarrollo) como factores de riesgo<sup>82, 256, 257,259</sup>. Sin embargo, otros estudios han que en las más jóvenes es frecuente la aparición de HTA proteinúrica gestacional y de eclampsia, no habiéndose encontrado que las edades extremas fuesen un factor de riesgo significativo para la presentación de pre-eclampsia grave.<sup>255</sup>

En este estudio se ha encontrado que la edad materna promedio de presentación de pre-eclampsia es de 32,19 años no siendo realmente una edad que la podamos considerar de riesgo teniendo en cuenta que la población de mujeres en este medio tiende a iniciar su maternidad alrededor de esos años. Por otra parte tampoco se puede relacionar con pre-eclampsia en nuestra población las edades extremas de la vida ya que la tendencia entre grupos fue bastante similar. Por tanto, la edad no puede ser considerado como un factor de riesgo para la evolución hacia pre-eclampsia. Se acepta que la pre-eclampsia-eclampsia es casi privativa de la primigrávida de cualquier edad y que si la edad es de >35 años el riesgo de presentar la enfermedad es muy alto<sup>254</sup>. Este estudio también confirma la asociación de pre-eclampsia y primigravidez. Otro antecedente asociado a pre-eclampsia es la primipaternidad<sup>103</sup>. Se ha observado en otros estudios que las múltiparas con pre-eclampsia y síndrome de HELLP tenían un nuevo compañero en 20-25% de los casos y solo del 3,4% entre las controles. Sin embargo este criterio no se tuvo en cuenta en el presente estudio ya que ninguna de las pacientes que participaron en él no habían cambiado de compañero sexual<sup>231</sup>.

El antecedente de haber sufrido pre-eclampsia, especialmente temprana o en las formas graves del síndrome, aumenta significativamente el riesgo de desarrollar el síndrome en los embarazos siguientes<sup>129</sup>. En nuestra población de estudio realmente solo el 8% tuvo antecedentes de la entidad en algún embarazo anterior, la mayoría de las participantes eran primigestantes (58,1% vs 41,8%).

La incidencia de pre-eclampsia en madres, hijas, hermanas y abuelas es 2-5 veces mayor que en hijas y hermanas políticas. Un estudio noruego, encontró que la relación fue más alta en hermanas completas (OR=2,2; IC95%=1,9-2,5), no siendo significativo para las hermanas medias (OR=1,6; IC95%=0,9-2,6)<sup>129</sup>. Aunque el comportamiento de la historia familiar en un estudio genético es importante, la búsqueda de asociación entre polimorfismos genéticos y una noxa no parece fundamental la búsqueda de dicho criterio en una población a estudiar ya que la presentación que lo describe como tal (es decir, en el 1% de la población) obliga a buscarlo haya o no antecedentes en la familia. Por este motivo este factor fue tenido en cuenta al recoger la información pero sin conocer su relevancia en la misma.

En nuestra serie, la incidencia de pre-eclampsia es mayor en aquellas pacientes con embarazos múltiples que en las gestaciones únicas, comportamiento que es similar a los descritos en la literatura<sup>3</sup>.

Un estudio indicó que la incidencia de pre-eclampsia en 125 primíparas que recibieron transfusiones sanguíneas antes del embarazo fue significativamente menor que en las controles; hecho que fue interpretado como debido a un posible factor inmunológico en la etiología de la pre-eclampsia<sup>261</sup>. Por otra parte, la mayoría de mujeres con grupo sanguíneo AB tuvieron dos veces más probabilidades de desarrollar una pre-eclampsia durante su embarazo (OR=2,1) y cerca de cuatro veces más probabilidades de desarrollar una pre-eclampsia temprana (OR=3,8) que las mujeres con grupos sanguíneos O, A o B<sup>263</sup>. En nuestra población el comportamiento de los grupos sanguíneos es diferente a lo anteriormente mencionado, ya que la distribución del grupo AB no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, la distribución de otros grupos sanguíneos fue diferente entre casos y controles, resultado que el porcentaje de mujeres del grupo O fue mayor entre las diagnosticadas de pre-eclampsia que entre las controles, donde el principal grupo sanguíneo encontrado fue el grupo A.

Respecto al antecedente obstétrico de abortos, se ha encontrado que las mujeres que han tenido tres o más abortos tienen un 50% más riesgo de desarrollar una pre-eclampsia comparado con mujeres que nunca han tendido abortos. Igualmente no se consideran de alto riesgo aquellas mujeres que han tenido solo uno o dos abortos. Además el riesgo se incrementa en un 13% si además de abortos hay antecedente de tratamientos para la infertilidad<sup>248</sup>. Otros estudios acerca de esta variable asociada a pre-eclampsia, han establecido que no hay diferencias significativas en el riesgo de desarrollar pre-eclampsia en mujeres con abortos espontáneos al compararlas con mujeres sin abortos espontáneos y que, además, existe una sutil reducción del riesgo de pre-eclampsia cuando se observaron mujeres con un aborto inducido comparadas con mujeres sin abortos inducidos (OR=0,84%; IC95%=0,69-1,02, para mujeres con dos o más abortos inducidos y OR=0,36; IC95%=0,18-0,73, para mujeres sin abortos inducidos)<sup>264,265</sup>. El antecedente de abortos en la serie presentada en esta tesis, sin embargo, no puede ser considerada como variable que indique una asociación de riesgo para el desarrollo de pre-eclampsia.

Otras variables que se estudian son la asociación de infecciones maternas, hábito tabáquico y anticonceptivos orales y pre-eclampsia. Al revisar la literatura, se describen hasta 49 estudios que incluyen estos criterios, encontrando que el riesgo de pre-eclampsia se incrementa en mujeres embarazadas con infecciones urinarias e infecciones peridontales o antecedentes de las mismas<sup>259</sup>. Estas observaciones son de interés ya que el polimorfismo en el gen *MMP-9* se ha asociado con estas últimas. Respecto a la tabaquismo se establece un bajo riesgo de pre-eclampsia asociado a fumar durante el embarazo. Al incluir el antecedente de tratamiento con anticonceptivos orales como variable se observó que las mujeres que usaban anticonceptivos orales al inicio del estudio tenían un menor riesgo de pre-eclampsia en comparación con quienes nunca los usaron o con las consideradas como ex-usuarias<sup>250</sup>. En el análisis de los datos de la presente serie, esta variable tampoco ofreció datos de asociación con la entidad. Si mostró, aunque sin significación estadística, que las mujeres sanas han tenido un menos contacto con anticonceptivos orales en comparación con las pacientes de pre-eclampsia.

Las pacientes con pre-eclampsia parece que han experimentado más intervenciones quirúrgicas que las controles. Es importante subrayar que las dos intervenciones quirúrgicas más frecuentes en mujeres con pre-eclampsia consistían en la extirpación de estructuras anatómicas linfoides (amígdalas, apéndice).

La COMT es una enzima involucrada en la degradación de la catecolamina y el estrógeno y podría desempeñar un papel en el desarrollo de la pre-eclampsia. El gen *COMT*, tiene un polimorfismo funcional *Val108/158Met* que da lugar a variantes de la enzima COMT que cataliza la *O*-metilación de las catecolaminas activas, participando en el metabolismo de fármacos y neurotransmisores, como la *L*-dopa, noradrenalina, adrenalina y dopamina. Por consiguiente, puede asociarse a diferentes condiciones clínicas<sup>195</sup>.

En un extenso estudio de genotipado del polimorfismo *Val108/158Met* en mujeres noruegas con pre-eclampsia y en embarazadas normales se ha encontrado que un haplotipo de actividad baja se asocia con pre-eclampsia<sup>434</sup>. En otro estudio similar realizado con mujeres coreanas<sup>168</sup>, el mayor riesgo para padecer pre-eclampsia se asoció con mujeres homocigotas para dicha variante alélica. En el presente estudio la diferente distribución de los genotipos asociados al gen *COMT* entre mujeres con pre-eclampsia y las controles fue significativa. Sin embargo, aunque se encontró en desequilibrio de ligamiento, y aunque esto muestra una asociación con pre-eclampsia, donde el genotipo homocigoto mutante asociado a baja actividad de la enzima se presentó en un 18% de los casos frente a un 16% de los controles de los controles. Indicaría por tanto que una actividad enzimática baja de la enzima COMT está relacionada con concentraciones elevadas de ciertas sustancias del metabolismo donde ejerce función y si este balance se perdiese por alteraciones en la expresión causadas por cambios en el genoma, tendría repercusiones clínicas en situaciones donde tanto los catecol-estrogenos como sus metabolitos son importantes (V.g.: la pre-eclampsia). En este estudio las pacientes con pre-eclampsia poseen un genotipo de riesgo para esta, la homocigocidad para el alelo *Met*, el cual se relaciona con tasas de actividad baja de la enzima COMT y por consiguiente con baja concentración de 2-metoxiestradiol, uno de los principales productos en la función de esta enzima.

Se podría decir respecto al genotipo *COMT Val108/158Met* que en la población estudiada existe una asociación entre el genotipo *Met/Met (Low)* con pre-eclampsia, pero al encontrarse en desequilibrio de ligamiento y no poder explicar este comportamiento en nuestra muestra para este SNP, no resulta oportuno tener en cuenta este genotipo para obtener conclusiones. Por otra parte, cuando se analizó estadísticamente si existía alguna relación entre un genotipo y las variables clínicas, se evidenció que ninguna de las variables continuas analizadas en relación con el genotipo *Val108/158Met* del gen *COMT* fue estadísticamente significativa, pudiendo concluir que no son un factor de riesgo para el desarrollo de la pre-eclampsia, ni se encuentran relacionadas a este genotipo.

Otro de los polimorfismos estudiados fue la variante *C677T* descrita en el gen *MTHFR*, que tiene varias implicaciones con diversas enfermedades donde la hiperhomocisteinemia es importante, ya que dicha variante en su genotipo homocigoto para el alelo *T* (alelo mutante), genera una variante termolábil de la enzima que se relaciona con una disminución de su actividad en un 50% de la misma, lo que se traduce en una alta concentración de homocisteína en sangre.

En la presente serie se encontró asociación entre el genotipo de riesgo (homocigotos para el alelo *T*) y las pacientes con diagnóstico de pre-eclampsia (23%) en comparación con las embarazadas normales (11%)(OR=1,812; 95%CI= 0,93-3,49; p=0,0717).

Este polimorfismo en el gen *MTHFR* se ha estudiado en diversas poblaciones de mujeres con pre-eclampsia:

(i) El 4% de las mujeres con pre-eclampsia del Norte de la India, presentan la mutación *G/A* del *FVL* y el riesgo de la enfermedad es doble (OR=2.08, p=0.03). En

cambio, el alelo mutante *CT* del *MTHFR* es protector (OR=0.59, p=0.01). Estos polimorfismos están asociados con pre-eclampsia leve (OR=2.149, p=0.038 y OR=0.565, p=0.222, respectivamente) pero no con la pre-eclampsia grave<sup>435</sup>.

(ii) En un estudio del polimorfismo *C677T* en el gen *MTHFR* realizado en Hungría en mujeres con pre-eclampsia grave, síndrome HELLP y controles, se encontró que se presentaba en un número significativamente mayor de mujeres con el síndrome HELLP (25,4%) que en las controles (8,2%) y en las mujeres con pre-eclampsia grave (8,9%)(p=0.03). La frecuencia del alelo mutante *T* fue del 45,2% en el síndrome HELLP mientras que en las controles fue del 32,2% (p=0.03) y del 30,2% en las mujeres con pre-eclampsia (p=0.008)<sup>436</sup>.

(iii) En cambio, en una población fina donde se estudió el polimorfismo *C677T* en el gen *MTHFR* en 133 mujeres con pre-eclampsia y 112 controles, la distribución de las frecuencias de los homocigotos *CC* (58,6% y 57,1% respectivamente) y de los homocigotos mutantes *TT* (9,0% y 5,4%, respectivamente) fue similar. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias del alelo *T* (25,2% y 24,1%, respectivamente). Esto indicaría que el polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* no desempeña un papel significativo en el desarrollo de pre-eclampsia en las mujeres de Finlandia<sup>437</sup>.

(iv) Aunque en pacientes italianas con pre-eclampsia la frecuencia de homocigotas de la mutación *C677T* en el gen *MTHFR* fue mayor que en el grupo control (21,7% y 10,3%, respectivamente), esta diferencia no fue significativa<sup>438</sup>.

(v) Tampoco se encontró asociación de esta mutación *C677T* en el gen *MTHFR* en mujeres mejicanas con pre-eclampsia<sup>439</sup>.

(vi) No se encontraron diferencias significativas en las proporciones de los alelos polimórficos *C677T* y *A1298T* en el gen *MTHFR* entre una población de mujeres negroides sudafricanas con o sin pre-eclampsia<sup>440</sup>.

(vii) Aunque no se pudo excluir un sesgo, un meta-análisis realizado en Grecia para estudiar la asociación de un polimorfismo *C677T* en el gen *MTHFR*, sugirió que el alelo *T* podría aumentar el riesgo de hipertensión diastólica grave durante el embarazo<sup>441</sup>.

COMT interacciona con *MTHFR*, que modula la disponibilidad de SAM, un cofactor de COMT. Se han asociado variaciones en el gen *MTHFR* con pre-eclampsia. La variación alélica del gen *COMT* está ligada a la actividad de la enzima y cuatro SNP (rs6269, rs4633, rs4680 y rs4818) forman haplotipos que caracterizan la actividad de COMT. En un estudio realizado en paralelo en madres y sus fetos en Chile se encontró que el haplotipo *ACCG* (Val) del gen *COMT* se asociaba con un riesgo reducido para padecer pre-eclampsia (p=0.004). En las muestras fetales el haplotipo fetal *ATCA* (Met) del gen *COMT* y el alelo menor *T* del *MTHFR* interaccionaban aumentando el riesgo de pre-eclampsia (p=0.022)<sup>442</sup>.

Son interesantes los resultados obtenidos durante el genotipado de *COMT* y *MTHFR* en las variantes polimórficas estudiadas. Muestran una asociación con pre-eclampsia, pudiéndose considerar de riesgo para la entidad: Existe cierto grado de susceptibilidad a evolucionar durante un embarazo a pre-eclampsia si junto con otros factores clínicos descritos en la misma, las pacientes presentasen un genotipo como el descrito para los genes mencionados anteriormente.

Es importante resaltar que varios estudios describen muchos factores genéticos que juegan un papel en el metabolismo del folato y la homocisteína<sup>182,331,332</sup>, como es el caso de la mencionada *MTHFR*, la cistationina-β-sintetasa y otros no menos importantes, como es el caso del polimorfismo funcional *Val108Met* en el gen *COMT*<sup>195</sup>. La COMT es una enzima que cataliza la *O*-metilación de varios

componentes, tales como los catecol-estrogenos y los polifenoles de la dieta, usando SAM como donante de grupos metilos e igualmente tiene un papel importante en la inactivación de dopamina. Se han asociado ciertos efectos patogénicos de la hiperhomocisteinemia resultante tal vez de un genotipo de riesgo para esta en el gen *MTHFR*, donde esta genera acumulación de *S*-adenosil-*L*-homocisteína (del inglés, *S*-adenosyl-*L*-homocysteine, SAH), un potente inhibidor no competitivo de COMT<sup>186,195,332</sup>. Es biológicamente plausible que las variantes genóticas en *COMT*, modifiquen directamente la asociación entre concentraciones elevadas de homocisteína y el riesgo de sucesos cardiovasculares donde existe un papel importante para los efectos propios de un cuadro inflamatorio y muchos de los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en el mismo, ya que existen evidencias que sugieren que COMT es una de las enzimas claves en el metabolismo de la metionina-homocisteína<sup>147</sup>. La homocisteína es un aminoácido sulfurado, el cual es convertido a SAM, formado solo del aminoácido esencial proveniente de la dieta, metionina. Por acción de la *S*-adenosil-metiltransferasa, la metionina es convertida a SAM, el cual es uno de los principales donadores biológico de grupos metilo requeridos para numerosos procesos celulares, incluido la formación de creatinina y la metilación de fosfolípidos (otra de las estructuras involucradas en la entidad). Estas reacciones son catalizadas por varias metiltransferasas, tales como, COMT, la cual demetila la SAM a SAH, el precursor inmediato de la homocisteína<sup>147,273</sup>. La hiperhomocisteinemia podría ejercer su efecto patogénico a través de una acumulación metabólica de SAH, la cual es un potente inhibidor no competitivo de COMT, el cual, a su vez, media la metilación de varios catecol-sustratos (catecolaminas y catecol-estrógenos). En este caso los efectos endógenos de ambos en tejidos periféricos (es decir, el existir una inhibición de su metilación por SAH) podría entonces resultar teóricamente en una elevación en sangre o en tejidos de los mismos y consecuentemente una mayor estimulación sobre los diversos sistemas donde estos actúan (V.g.: el sistema cardiovascular). Las catecolaminas endógenas son también moléculas potencialmente reactivas<sup>116,141</sup>. Los resultados del presente estudio están en concordancia con recientes estudios<sup>48</sup>. Sin embargo, puesto que el presente estudio se enfocó en la perspectiva genómica y no en la bioquímica, no se pudo correlacionar los hallazgos genéticos con las concentraciones y comportamientos bioquímicos de los productos genéticos. Por tanto. El que las pacientes con un genotipo que compromete la actividad enzimática de COMT y que a la vez presentan un genotipo que genera la variante termolábil de la enzima MTHFR, y por consiguiente hiperhomocisteinemia, tendrían mayor susceptibilidad a desarrollar pre-eclampsia o incrementar el riesgo de otros eventos donde las implicaciones bioquímicas y fisiológicas mencionadas referente a sus consecuencias patogénicas tendría lugar.

Por otra parte y en lo que concierne a este polimorfismo, el genotipo heterocigoto *Val/Met* del gen dopaminérgico *COMT* fue el más frecuente en la población estudiada en esta tesis. Este resultado no se tendrá en cuenta pero sería interesante analizar en profundidad en un futuro este SNP puesto que factores genéticos que afecten la función de COMT podrían afectar también la función dopaminérgica y tener la repercusiones clínicas donde estas ejerzan función. Además, otros estudios que relacionen el genotipo con la bioquímica de los catecol-estrógenos y estradiol, sería de gran importancia para contribuir a entender la etiología de esta entidad.

La expresión de moléculas HLA no clásicas<sup>111</sup>, tales como las HLA-G, se considera esencial para la tolerancia inmunitaria materno-fetal<sup>427</sup> y para una placentación correcta durante el embarazo<sup>309,310</sup>. Las moléculas HLA-G se expresan en ciertas células inmunitarias y en los trofoblastos de la interfase materno-fetal desempeñando un papel inmunoregulator. Se han llevado a cabo diversos estudios para

conocer si existe alguna asociación entre polimorfismos en el gen *HLA-G* y el desarrollo de pre-eclampsia. Algunos de ellos han sido:

(i) En un estudio realizado en Brasil, tanto las mujeres controles como las que tenían pre-eclampsia tenían similares frecuencias genotípicas para el polimorfismo de una eliminación de 14bp en la 3'-region no traducida del exón 8 del gen *HLA-G*. No obstante, cuando se consideraron las mujeres primíparas las mujeres con pre-eclampsia si mostraban una mayor frecuencia del alelo que las mujeres controles<sup>313</sup>.

(ii) El genotipo *14bp*, ya sea materno o fetal, de la region 3'-UTR del gen *HLA-G* no se encuentra asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar pre-eclampsia en mujeres noruegas<sup>432</sup>. Este grupo también estudio dicho polimorfismo con otras implicaciones fetales. En contraste con hallazgos anteriores, no encontraron correlación entre el polimorfismo *HLA-G 14bp* y el crecimiento fetal.

(iii) Otro estudio, también realizado en Brasil, tampoco ha encontrado asociación entre la existencia de un genotipo 14bp en el gen *HLA-G* y el desarrollo de pre-eclampsia en mujeres gestantes de Brasil<sup>443</sup>.

(iv) Tampoco se observó esta asociación en un estudio de China<sup>416</sup>.

(v) Si parece que el alelo *+14bp* del gen *HLA-G* puede definir un haplotipo único en el exon 8 y los fetos que son homocigotos para este haplotipo [SNP 2995(C)/SNP 3127(G)/SNP 3172(A)/SNP 3181(G)/+14bp] están asociados con el desarrollo de pre-eclampsia grave en primíparas danesas<sup>444</sup>.

Finalmente, el polimorfismo *HLA-G 14bp* en la región 3'-UTR se ha asociado con el desarrollo de la pre-eclampsia en muchos otros estudios<sup>302, 308-310,312,321,415</sup>. Sin embargo, en la serie estudiada en esta tesis, no se ha identificado ninguna asociación con el riesgo de pre-eclampsia y polimorfismo en el gen *HLA-G*. Sería interesante en estudios futuros considerar la distribución del mismo en el feto y correlacionar tanto el genotipo materno como el fetal con las concentraciones séricas del HLA-G soluble.

La MMP o gelatinasa B tiene actividad proteolítica contra proteínas del tejido conectivo y se ha sugerido su importancia en procesos de remodelación tisular asociada con la aterogenesis<sup>275,277,369</sup>. Las MMP son una familia de enzimas dependientes de zinc cuya actividad proteolítica contra las proteínas del tejido conectivo (colágeno, proteoglicanos y elastina) tiene un papel importante en el desarrollo y progresión de las lesiones ateroscleróticas. Se las ha involucrado con la migración celular en la vascularización del músculo liso y su proliferación en este por una actividad de degradación de la matriz cicundante<sup>276</sup>, e igualmente se ha establecido que el principal lugar donde esto ocurre está íntimamente relacionado con la acumulación de macrófagos y otros elementos involucrados<sup>278,279</sup>. La MMP-9 es una de las MMP presentes en los lugares donde la gelatina y la colegenasa IV se encuentran principalmente (V.g.: membrana basal del endotelio y sus zonas circundantes de las células de músculo liso de los vasos)<sup>282</sup>. La expresión de la MMP-9 esta principalmente regulada en su transcripción, donde el promotor del gen responde a diferentes reguladores tales como la IL-1, el PDF, el TNF- $\alpha$  y el EGF<sup>283,284</sup>.

Variaciones de secuencias en la región del promotor del gen *MMP-9* alteraría por tanto su actividad en las funciones antes indicadas pudiéndolas por tanto relacionar con noxas donde estas están involucradas. Se ha descrito un sitio polimórfico<sup>285,286</sup> en el *MMP-9*, el -1562, del cual resulta una sustitución de C por T, lo cual genera un aumento en la actividad del promotor relacionada con el alelo *T*, generado un efecto funcional del polimorfismo *C-1562T* sobre la actividad del promotor del *MMP-9*. Sabiendo que la MMP-9 posee una actividad proteolítica frente al principal componente de la membrana basal, se consideró su posible papel durante la placentación en el curso

de un embarazo y su posible implicación en las anomalías de la misma que podrían progresar al desarrollo de una pre-eclampsia.

La etiología de la pre-eclampsia es desconocida. Sin embargo se ha acumulado una ingente cantidad de evidencias que indican que la raíz de la misma está ligada a una placentación anormal. La patogénesis de la pre-eclampsia involucra una serie de factores genéticos e inmunológicos materno-fetales. Por una parte, la mala adaptación inmunológica de la pre-eclampsia predice que el sistema inmunitario materno no tolera un feto semi-alogénico. Desde otro punto de vista, se requiere una correcta placentación para lo que se requiere la invasión del trofoblasto, la degradación y remodelación de la matriz extracelular decidual uterina y la apoptosis sin trombosis. La placentación es esencial para un correcto embarazo. Tempranamente, en un embarazo normal, las células del citotrofoblasto de la placenta en desarrollo invaden los tejidos uterinos y distorsionan las arterias espirales de la decidua y el miometrio. Sin embargo, la invasión del citotrofoblasto, en las mujeres con pre-eclampsia, está afectada y la arteria espiral permanece estrechada con lo que la placenta resulta pobremente profundida e induciendo el aumento de vasopresores y otros factores dentro de la circulación materna. Se han descrito alteraciones del balance entre la actividad de las MMP en varias condiciones clínicas que afectan al sistema cardiovascular, incluyendo los estados hipertensivos del embarazo. Además las concentraciones alteradas de MMP reflejan una habilidad invasiva anormal de las células trofoblasticas y una hiperregulación de estas que podría interaccionar con un incremento del estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios produciendo una disfunción endotelial que se presenta en la pre-eclampsia<sup>289</sup>. Estas alteraciones resultan de un polimorfismo funcional en la región del promotor del gen de la MMP-9, el cual como hemos comentado anteriormente cambia la expresión de esta. Interesó, por tanto, considerar si este polimorfismo estaba asociado a pre-eclampsia. La revisión de la literatura ofrece observaciones contradictorias. En un estudio el alelo *T* es menos frecuente en pre-eclampsia comparado con embarazos sanos<sup>285</sup>, mientras que en otro se sugiere la pérdida de asociación entre este polimorfismo y pre-eclampsia<sup>286</sup>.

En esta serie, se han analizado las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo funcional *-1562C/T* en el gen *MMP9* en mujeres con pre-eclampsia y en sus controles normales. El principal hallazgo ha sido que el riesgo a padecer pre-eclampsia se asocia con un genotipo homocigoto mutado *TT* en el gen *MMP9* (OR=7,55; 95%CI=2,31-24,64;  $p<0,0001$ ). Los genotipos homocigotos salvajes *CC* fueron más frecuentes, sin ser estadísticamente significativa esta diferencia, en la población sana que en los casos de pacientes con pre-eclampsia.

Sin embargo, en mujeres brasileñas, el polimorfismo *-1562C/T* en el gen *MMP9* se asocia con hipertensión gestacional pero no con pre-eclampsia<sup>285</sup>. Otros autores<sup>286</sup> encuentran, por otra parte, que en mujeres con pre-eclampsia existe una menor prevalencia del raro alelo *T* en el polimorfismo *-1562C/T* en el gen *MMP9* (OR=0,48, 95%CI=0,25-0,90). La concentración elevada de MMP9 asociada con el alelo *-1562C/T* podría ser esencial en el desarrollo de una adecuada interfase materno-fetal facilitando la apoptosis y degradación del trofoblasto. Es difícil de explicar la disparidad de resultados entre los reportados en la presente serie y los encontrados por otros. Diferencias étnicas podrían explicar, al menos parcialmente<sup>433</sup>, este hecho, ya que la población de este estudio estaba formada por mujeres caucásicas y en el estudio brasileño no se indica la etnicidad de las pacientes y de las utilizadas como controles. Merece ser recordado que es conocida la coexistencia en Brasil de numerosos y diferentes grupos étnicos a diferencia de las relativamente homogéneas poblaciones del norte de la Península Ibérica.

Por lo tanto en este estudio se observa una asociación entre el polimorfismo C-1562 T en el promotor del gen de la MMP-9 y pre-eclampsia, el cual parece regular la expresión génica de una manera alelo-específica en la población estudiada. Podría argumentarse que la expresión elevada de MMP-9 asociada con el alelo T potenciaría la migración de las células del músculo liso durante todo el proceso vascular que tiene lugar durante el desarrollo de la placenta, estructura principalmente involucrada en la etiología de la pre-eclampsia. Las mujeres que posean el alelo T podrían igualmente estar predispuestas a otros procesos vasculares relacionados con alteraciones de la angiogénesis, aspecto que deja una puerta abierta a otras hipótesis prospectivas para investigaciones futuras donde se considere si las pacientes que desarrollan pre-eclampsia y las que presentan un genotipo de riesgo para MMP-9, desarrollan con el tiempo otras alteraciones vasculares (Vg.: aterogénesis).

Al realizar este estudio se ha considerado como factor fundamental en la patogénesis de la pre-eclampsia la invasión trofoblástica y el proceso de remodelación vascular que generan una placentación y decidualización anómala que resultan en la evolución al cuadro clínico. Dejando establecido que el genotipo de riesgos maternos que aumenten su susceptibilidad para el desarrollo de dicha placentación anormal la cual altera el flujo y permite el establecimiento de un cuadro hipertensivo del embarazo. Para el gen *COMT*, un genotipo de riesgo *Met/Met*, generaría un aumento en las concentraciones del HIF-1 que a su vez altera la angiogénesis produciendo una insuficiencia placentaria que afectando la invasión trofoblástica alteraría los vasos sanguíneos, se generaría hipoxia, la cual desencadenaría un cuadro inflamatorio y activación de elementos inmunológicos que se perpetuarían en un círculo vicioso. También es conocida la correlación entre la concentración aumentada de homocisteína en sangre y la actividad enzimática de *COMT* y se reconoce como genotipo de riesgo para *MTHFR* la homocigocidad para el alelo T, el cual se expresa en una enzima termolábil que provoca la hiperhomocisteinemia, asociada a todo este proceso vascular patogénico de la placenta y que de cierta manera se encuentra interrelacionado con las enzimas metil-transferasas.

Estas enzimas encargadas de la metilación de los catecol-estrógenos en el proceso de eliminación en una de las vías de los estrógenos, deja expuesto otro componente importante para una adecuada placentación: El papel del estríol en todo este proceso, cuya concentración constituye un índice informativo del desarrollo de la placenta y el feto durante el embarazo, y además es un importante inhibidor de la MMP-9 durante el mismo. Hay otros productos de la vía degradativa que igualmente se ven afectados de estar alterada la actividad de una de estas enzimas que actúan en el metabolismo de los mismos. Todo ello indicaría la posibilidad de que coexistan diferentes genotipos de riesgo para el desarrollo de una pre-eclampsia.

Los estrógenos, principalmente el estradiol, juegan un papel fundamental en el endometrio lúteo, junto con la progesterona, lo que crea un microambiente apropiado que facilitaría la presencia de células NK deciduales, necesarias para la secreción de citocinas que, a su vez, promueven la infiltración de las arterias espirales por el trofoblasto. Una serie de factores patogénicos que en una paciente genéticamente susceptible, con genotipos de riesgo, desencadenarían un cuadro perpetuando el círculo vicioso y generando un microambiente propicio para la expresión de distintas moléculas y funciones celulares, donde la hipoxia es clave en dicho proceso. Los estrógenos reprimen la producción por células del sistema inmunitario de MMP, específicamente la MMP-9. Sin embargo, en pacientes con pre-eclampsia la concentración de MMP-9 está incrementada, reforzando su contexto inflamatorio. Esto permitiría una alteración en las concentraciones de los distintos productos del metabolismo estrogénico que alterarían

las concentraciones de esta, creando un microambiente hipóxico el cual genera otras alteraciones (V.g.: disminución de la concentraciones de IL-10, que a su vez actúa sobre la regulación de la MMP-9, pero al estar disminuida no tiene la capacidad de actuar adecuadamente, permitiendo el incremento de su concentración). Si a este proceso bioquímico le agregamos un genotipo de riesgo para el polimorfismo *-1562C>T* del gen *MMP-9*, caracterizado por la presencia del alelo *T* en el promotor que va ligado a un aumento en la actividad transcripcional de la enzima, y por consiguiente con una concentración plasmática elevada de esta, aumenta el riesgo de una placentación inadecuada, una insuficiencia placentaria y, finalmente, la presentación clínica de la pre-eclampsia.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, planteamos un modelo que trataría de explicar las conclusiones de los resultados obtenidos en este estudio. En una mujer embarazada se debería: (i) Confeccionar de una cuidadosa historia clínica obstétrica y ginecológica: La entidad clínica conocida como pre-eclampsia se presentaría, preferentemente, en una mujer de  $\geq 32$  años, con antecedentes familiares y antecedente personal de enfermedad periodontal,  $\geq 3$  abortos espontáneos, del grupo sanguíneo O, obesa, sin antecedentes de tabaquismo y con una enfermedad crónica de base (HTA, enfermedades autoinmunitarias, dislipemia, trastornos neuropsiquiátricos); (ii) realizar en el grupo de embarazadas con las anteriores características un cribado para pre-eclampsia [incluiría el genotipado para los polimorfismos genéticos de *COMT* (*Val108/158Met*), *MTHFR* (*C677T*) y *MMP-9* (*-1562C>T*)]; (iii) solicitar a las mujeres del grupo de pacientes con genotipos de riesgo las siguientes determinaciones bioquímicas: concentración sérica de MMP-9, de homocisteína, de estríol y de catecol-estrógenos en orina.

Es decir si una embarazada cumpliera los criterios (i) y (ii) se debería realizar un control y vigilancia estricta del embarazo, controlando la presión arterial, las concentraciones de proteína en orina y realizando una vigilancia ante la aparición de edemas. Si fuese posible, se les realizaría las determinaciones mencionadas en el apartado (iii).

Para finalizar sugerimos el siguiente modelo en el desarrollo etiopatogénico de la pre-eclampsia teniendo en cuenta aspectos inmunológicos, vasculares, metabólicos y hormonales de la entidad.

Al iniciar el embarazo, durante el desarrollo placentario se promueve la angiogénesis y aumenta el VEGF, igualmente hay una hipoxia relativa que con el progreso del embarazo debería disminuir. No ocurre así por el fallo de diferentes factores. Factores tales como: (i) la concentración de homocisteína, donde la hiperhomocisteinemia genera un acúmulo metabólico de SAH con la consecuente inhibición no competitiva de COMT; (ii) la actividad COMT, si esta disminuye, baja la concentración de 2-ME y aumentan catecol-estrógenos; (iii) aumenta el HIF-1, el cual modula negativamente la expresión de HLA-G. Si aumenta el grado de hipoxia: disminuye la proliferación endotelial, disminuye IL-10, cuyo efecto anti-inflamatorio, actúa como factor protector de PE. Sin embargo, la IL-10 inhibe la hiper-regulación de MMP-9, que al estar disminuida por la hipoxia no realiza su función, aumentando la expresión de MMP-9. Se genera, por consiguiente, un perfil inflamatorio. Por otra parte, al existir un polimorfismo en el promotor del gen *MMP-9* que genera un aumento de la actividad trascricional del mismo aumenta la concentración de esta, que aumentaría el riesgo para la enfermedad.

La hipoxia también disminuye la capacidad de adhesión de las células NK. Se activan genes inducidos por hipoxia, entre ellos el del VEGF que se expresa en las células NK y que igualmente inducen sFLT-1 en mayor medida y al no haber suficiente 2-ME para contrarrestarlo, empeora el daño endotelial. Esto hace que se genera más hipoxia, creando un círculo vicioso que induce una invasión trofoblástica anómala y un fallo en la remodelación de la arteria espiral. Esto genera también un flujo alterado que disminuye aportes de determinadas hormonas, que alteran el aposentamiento de las células NK. Además hay un aumento de fibrinoide y detritus generalizado que también contribuye al daño oxidativo afectando el cociente Th1/Th2 y aumentando la concentración circulante de IFN- $\gamma$ .

La principal consecuencia de todo este proceso es, por tanto una invasión trofoblástica y una remodelación vascular anormal que termina provocando el cuadro clínico de pre-eclampsia.

## **VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

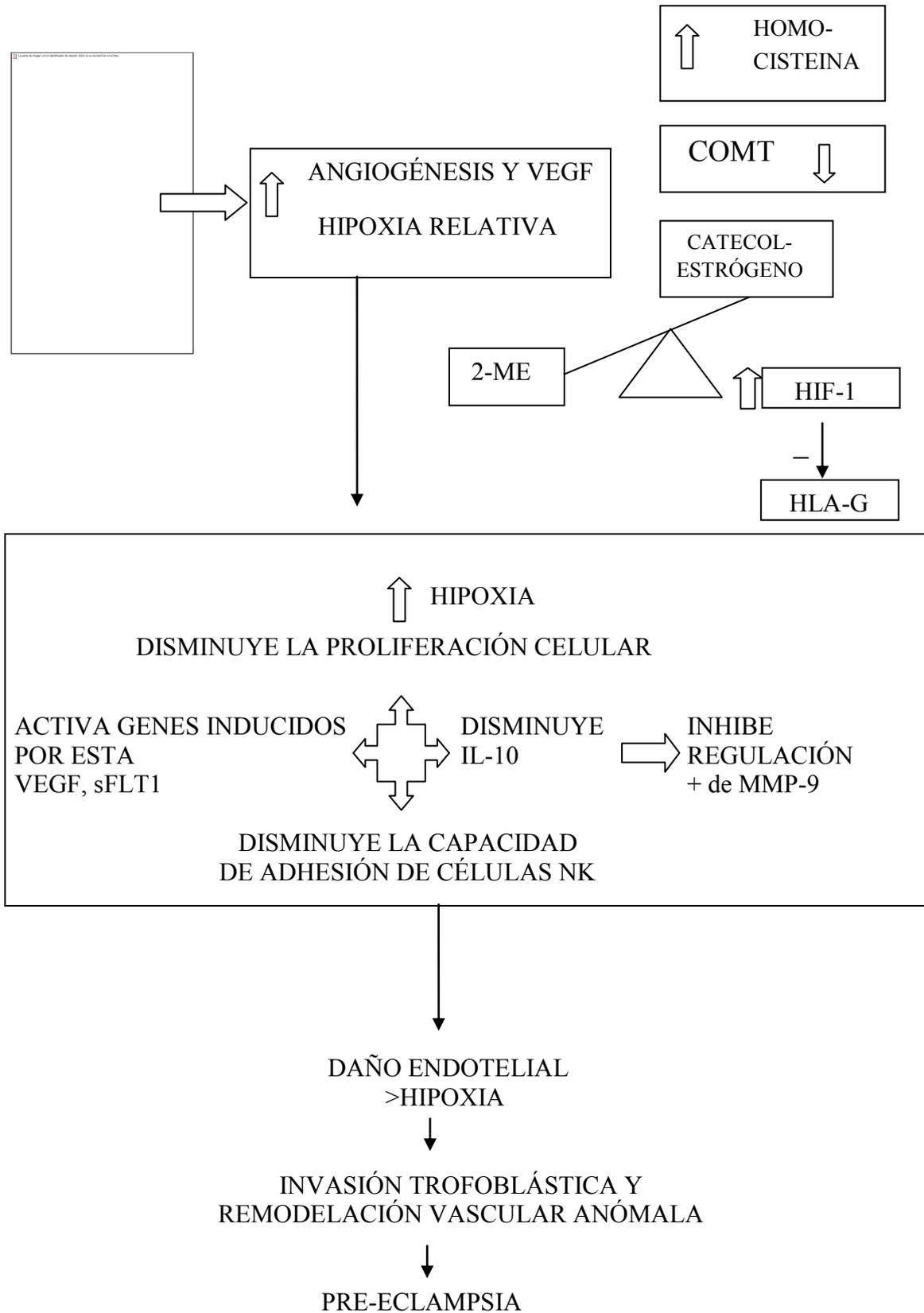
Las conclusiones básicas del presente estudio han sido:

1. El diagnóstico clínico de pre-eclampsia en esta serie se realiza principalmente en el tercer trimestre del embarazo.
2. La edad promedio de diagnóstico de pre-eclampsia en este estudio fue 32,19 años.
3. El control prenatal determinan el diagnóstico precoz del cuadro, siendo por tanto la pre-eclampsia leve el principal tipo de la entidad que se presenta en este trabajo.
4. El polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* y el SNP *-1562C<T* del gen *MMP-9* se asociaron a pre-eclampsia.
5. El estudio en el genotipado del polimorfismo descrito en la región 3'UTR del gen *HLA -G* en este trabajo no encontró asociación con pre-eclampsia.

Desafortunadamente, las presentes conclusiones ni son definitivas ni completan la compleja biología del desarrollo de la pre-eclampsia. Sin embargo si podrían representar lo que en el futuro podría ser recomendado, debería ser abordado o tenido en consideración:

1. Crear un perfil de riesgo genético en pre-eclampsia donde se estudie el riesgo para la presentación del cuadro y que, como mínimo, podría incluir los genes *MTHFR* y *MMP-9*.
2. Completar el perfil genético de riesgo o susceptibilidad, con estudios bioquímicos pertinentes. Ello podría aumentar el valor predictivo del mismo.
3. Incluir en los futuros estudios genéticos realizados a las futuras madres a los compañeros sexuales de las mismas y –en su momento y si ha lugar- correlacionarlos con estudios genéticos, bioquímicos y celulares en la placenta y en el feto.
4. Continuar con las investigaciones orientadas al diagnóstico precoz de la pre-eclampsia y de otras complicaciones gestacionales, hasta conseguir una prueba de cribado poblacional que nos permita hacer una correcta prevención de esta enfermedad. Redundaría en la mejora de los índices de morbilidad y mortalidad.
5. Un estudio adecuado previo debería consistir en realizar un amplio cribado del genoma comparando familias de embarazadas normales, mujeres con pre-eclampsia y diagnosticadas con síndrome HELLP. Este esfuerzo aconsejaría un enfoque multicéntrico.

## MODELO PROPUESTO



## **VIII. ANEXOS**

### **ANEXO 1. Revisión metodológica suplementaria**

#### **1.1. Técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos**

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante la PCR se fundamentan en el mismo principio general común a todas: la amplificación de genes o secuencias de DNA polimórficas y la separación electroforética de los productos amplificados.<sup>350</sup>

Aunque con la PCR-RFLP se estudia una región muy limitada del genoma, presenta algunas características que nos han hecho elegirla como método a utilizar en nuestro estudio: (i) es sencilla de realizar; (ii) es fácil de interpretar; (iii) es muy reproducible y (iv) no es costosa<sup>60, 61</sup>. El RFLP fue una de las primeras técnicas que se usó para detectar variaciones a nivel de la secuencia del DNA. Esta tecnología se basa en el principio de que es posible comparar patrones de bandas generados a partir de moléculas de DNA de diferentes individuos que han sido sometidas a digestión con enzimas de restricción.<sup>60</sup> Las diversas mutaciones que afectan a las moléculas de DNA de muchas maneras, producen fragmentos de longitud variable. Estas diferencias de longitud de los fragmentos pueden observarse una vez realizadas la electroforesis, la hibridación y la visualización.

La digestión con enzimas de restricción de genes amplificados mediante PCR constituye la base de la PCR-RFLP, que es igualmente sencilla y reproducible<sup>351</sup>.

#### **1.2. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

##### **1.2.1. Introducción**

En 1983, Kary Mullis dio a conocer la técnica de la PCR que es una permite estudiar la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de DNA con la cual la insuficiente cantidad de DNA ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA. La técnica se basa en la replicación del DNA realizada por la DNA-polimerasa<sup>60, 61</sup>. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5'-3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores o cebadores (en inglés *primers*). Estos se definen como una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar. Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas<sup>60,61</sup>: (i) desnaturalización del DNA doble cadena; (ii) hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras y (iii) elongación o extensión del cebador por actuación de la DNA-polimerasa.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de DNA se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Ocurre por la bajada de la temperatura (50-65° C).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'-3' mediante la enzima DNA-polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador. Dicho aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.

La detección del de PCR se realiza normalmente mediante electroforesis dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que deseemos utilizaremos diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones.

La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio (mediante la lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia o radioactividad.

### **1.2.2. Componentes y optimización de la PCR**

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción: (i) integridad del DNA (no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que queremos amplificar); (ii) origen de la muestra y proceso de extracción (la muestra no debe llevar agentes quelantes, EDTA, que reducen la concentración de iones de Mg en la disolución) ni tampoco debe haber determinados factores (fenol, detergentes) que inhiban la actividad de la polimerasa; (iii) cantidad de la muestra (si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de DNA genómico de copia única se usan cantidades de 100-500 ng).

Para la elección de los iniciadores, existen una serie de normas que podemos utilizar: (i) el contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50% (la relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%); (ii) deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base; (iii) no seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria; (iv) se recomienda que los extremos las últimas bases sean G o C; v) se debe evitar la complementariedad entre iniciadores (si esta existe entre los extremos 3' pueden formarse dímeros de iniciadores); (v) normalmente deben tener un tamaño de 18-30 bp; (vi) la temperatura de hibridación de los cebadores debe ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 45-60°C y (vii) si el primer es menor de 20 bp, la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), se calcula en base a formulas ya conocidas.

Existen diferentes tipos de DNA-polimerasa que llevan a cabo la replicación del DNA, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en: termolábiles (temperatura óptima de 37-42°C), que se desnaturalizan con el calor y termoestables (temperatura óptima de 74°C) que resisten durante 40-50 min a 96°C.

Inicialmente se usó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* la cual posee actividad 3'-5'-exonucleasa que le proporciona la capacidad de cambiar el nucleótido que ha sido erróneamente incorporado.

La importancia de esta actividad radica en que aumenta la fidelidad de la replicación del DNA original. Sin embargo, se trata de una enzima termolábil por lo que no soporta los ciclos y temperaturas utilizados en una PCR.

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq-polimerasa. Es una enzima termoestable aislada de la *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. La Taq-polimerasa ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización .

Existen algunas recomendaciones a tener en cuenta durante la realización de una PCR: (i) no usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de estos (normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-30); (ii) la concentración de los trifosfatos de deoxinucleótidos (del inglés *deoxyribonucleotide triphosphate*, dNTP) debe ser igual para los 4 y debe ser la más baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de DNA necesaria; (iii) disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa y (iv) la concentración de Mg<sup>++</sup> en la reacción oscila entre 0,50 y 2,5 mM (se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad de la PCR).

Hay cuatro dNTPs: desoxiadenosina trifosfato (en inglés, *deoxyadenosine triphosphate*, dATP), desoxitimidina trifosfato (en inglés, *deoxythymidine triphosphate*,

dTTP), desoxicitidina trifosfato (en inglés, *deoxycytidine triphosphate*, dCTP) y desoxiguanosina trifosfato (en inglés, *deoxyguanosine triphosphate*, dGTP).

Se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 mM. Los dNTPs pueden captar  $Mg^{++}$ , por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente. Aproximadamente la concentración de  $Mg^{++}$  debe oscilar entre 0.5-1.0 mM veces superior a la concentración de dNTPs.

El amortiguador de la reacción por lo general está formado por: 10 mM tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% w/v gelatina y 1,5 mM  $MgCl_2$ . Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción en cadena de la polimerasa. También se pueden usar detergentes como el Tween-20, SDS-12 (0,1%) o Tritón X10, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol, glicerol, formamida o BSA, aunque no son en ningún caso imprescindibles.

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales: (i) KCl (influye en la desnaturalización del DNA); (ii) elevadas concentraciones de  $K^+$  favorece la desnaturalización de secuencias cortas de DNA mientras que bajas concentraciones de  $K^+$  ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de DNA; (iii)  $MgCl_2$  (aumenta la temperatura de hibridación del DNA) lo que resulta fundamental para la optimización de la reacción.

El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos se puede optimizar la reacción. A continuación se describen cada una de las etapas de un ciclo referente a tiempo y temperatura.

1. Desnaturalización: Se trata de una etapa crítica ya que es muy importante que el DNA molde se desnaturalice completamente.

Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto. Cuando existe un alto contenido de G + C puede aumentar el tiempo o la temperatura. Sin embargo hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurarnos que se produce a lo largo de toda la muestra de DNA. Esta etapa suele ser de 5' a 94-95°C como en el caso de los protocolos utilizados en el Servicio de Inmunología.

2. Hibridación: En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración. En la mayoría de los protocolos, la temperatura de hibridación oscila entre 45-65°C, durante un tiempo de entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde.

3. Elongación: En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70-72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1 minuto para elongar 1 Kb. En la práctica es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5 min a 72°C o como en los protocolos utilizados en esta tesis donde ha sido de 7 min aproximadamente.

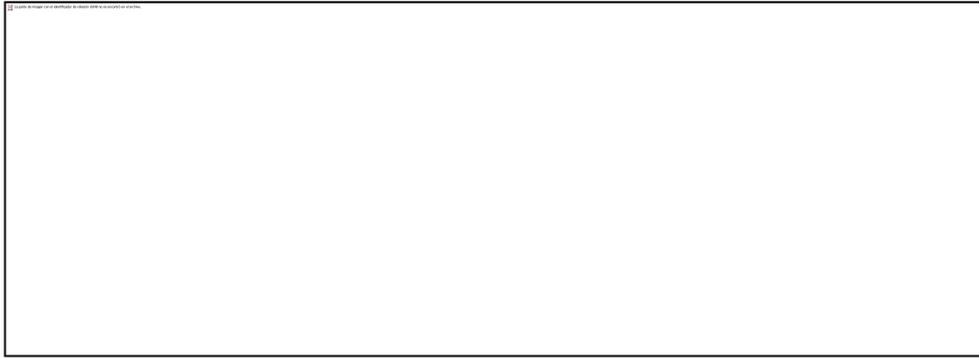
También adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR el número de ciclos que se utilizan. Este número depende de la cantidad de DNA que existe en la

muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados. Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas. Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto. Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria. Generalmente cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de DNA sintetizado es suficiente para su posterior utilización.

### **1.2.3. Electroforesis**

La electroforesis fue empleada por primera vez en 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta Durrum y Tiselius, la comienzan a utilizar para el análisis de coloides y partículas microscópicas. La definimos como un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Su fundamento se explica como la mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta las cuales cuando son colocadas en un campo eléctrico experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta. Dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo). El movimiento de estas moléculas está influenciado por dos fuerzas adicionales, la fricción con el solvente dificultará el movimiento y origina una fuerza que se opone, y por el otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria. La suma de estas dos fuerzas genera una migración no homogénea. Una manera de reducir esta forma de movimiento consiste en emplear un medio que oponga más resistencia. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel definido como un polímero soluble de muy alto peso molecular, atrapa las moléculas de agua y forma un tapiz, que dificulta el movimiento de los solutos, logrando pues que la migración electroforética de dichas moléculas sea más lenta, y por tanto homogeniza la migración. Respecto a la electroforesis es básico saber que a mayor temperatura mayor difusión habrá siendo esto debido a la energía cinética propia de las moléculas implicadas.

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0,5-2%) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C y formar un gel semisólido al enfriarse. La figura 1 muestra su estructura química y la tabla I las concentraciones que se necesitan de esta para la separación electroforética de fragmentos de DNA.



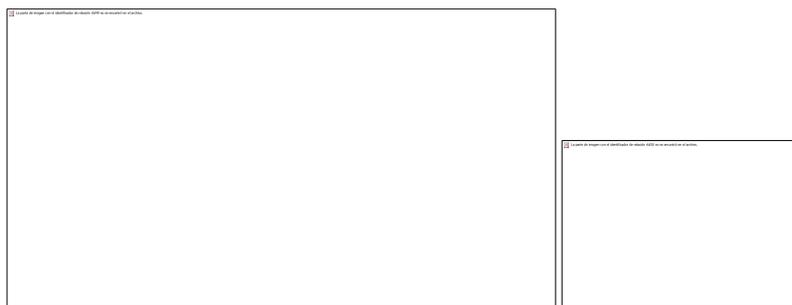
**Figura 1.** Estructura química de la agarosa

Este gel está constituido por una matriz tridimensional de fibras poliméricas inmersa en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se usa usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20.000 nucleótidos.

Esta técnica es muy sensible y puede ser afectada por muchos errores durante el proceso, como la temperatura usada durante la polimerización, la corrida del gel, la velocidad de polimerización, el nivel del catalizador, la pureza de los reactivos, tiempo de corrida y la preparación de las muestras.

La temperatura no afecta la movilidad electroforética entre 4°C-30°C, por ello la electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente. Por otra parte, los voltajes habituales a los que se realizan las electroforesis y los cambios pequeños de temperatura que ocurre durante el proceso no afecta ni al DNA ni al gel.

Para llevar a cabo una separación electroforética, se necesita: (i) una fuente de alimentación que proporciona el campo eléctrico mediante dos electrodos, uno positivo (ánodo) y otro negativo (cátodo) entre los que se establece una diferencia de potencial; (ii) una cubeta, recipiente en cuyos extremos se sitúan los electrodos y (iii) un soporte electroforético (Figura 2).



**Figura 2.** Equipo para hacer una electroforesis

**Tabla I.** Concentraciones de agarosa utilizadas para la separación electroforética de fragmentos lineales de DNA de diferentes tamaños

Agarosa (%)	Tamaños separable (Kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

#### 1.2.4. Detección del DNA

El bromuro de etidio (del inglés *ethidium bromide*, EtBr), se utiliza para la tinción del DNA, se puede realizar antes añadiéndolo al gel o después sumergiendo el gel en una disolución con EtBr.

Es un agente intercalante, que se ubica entre pares de bases contiguas del DNA, aumentando la longitud de éste, lo que reduce la movilidad electroforética del fragmento considerado en un 15%. Esto se debe a que al introducirse entre las bandas, la doble hélice de DNA se abre y queda menos girada, aumentando su longitud y haciéndose menos flexible.

Existen dos formas fundamentales de visualizar DNA una vez finalizada la electroforesis: a) mediante compuestos fluorescentes que se unen específicamente a los ácidos nucleicos y b) con tinción de plata, esto último usado normalmente en geles de poliacrilamida.

La detección con EtBr es el método más habitual para detectar DNA en los geles de agarosa. Este compuesto tiene un rendimiento cuántico bastante bajo en medio acuoso-polares, pero se incrementa cuando pasa a un entorno hidrofóbico y cuando se ilumina con luz UV pues las bandas solo se visualizan bajo este tipo de luz por lo que el gel debe ser fotografiado durante la exposición a la luz UV.

## **ANEXO 2. Análisis estadístico de los datos**

### **2.1. Tests no paramétricos utilizados en el estudio**

La estadística no paramétrica estudia las pruebas y modelos estadísticos cuya distribución subyacente no se ajusta a los llamados criterios paramétricos. Su utilización es recomendable cuando no se puede asumir que los datos se ajusten a una distribución conocida, cuando el nivel de medida empleado no sea, como mínimo, de intervalo<sup>380</sup>.

En este trabajo se ha utilizado: el test de  $\chi^2$  y el test de Fisher<sup>380</sup>.

#### **2.1.1. Test del *chi* cuadrado ( $\chi^2$ )**

La prueba del  $\chi^2$  para una muestra permite averiguar si la distribución empírica de una variable categórica se ajusta o no a una determinada distribución teórica. Esta hipótesis de ajuste o de bondad de ajuste se pone a prueba utilizando un estadístico originalmente propuesto por Pearson; para comparar las frecuencias observadas o empíricas con las esperadas o teóricas de cada categoría, es decir, un estadístico diseñado para comparar las frecuencias de hecho obtenidas en una muestra concreta (frecuencia observada,  $n_i$ ) con las frecuencias que deberíamos encontrar si la variable realmente siguiera la distribución teórica propuesta en la hipótesis nula (frecuencia esperada,  $m_i$ )<sup>397</sup>:

$$X^2 = \sum (n_i - m_i)^2 / m_i$$

Las frecuencias esperadas  $m_i$  se obtienen multiplicando la probabilidad teórica de cada categoría  $\pi_i$  (la que corresponde a cada categoría de acuerdo a la hipótesis nula) por el número de casos válidos,  $n\pi_i$ . Si no existen casillas vacías y el número de frecuencias esperadas menores de 5 no superan el 20% total de frecuencias esperadas, el estadístico  $\chi^2$  se distribuirá según el modelo de probabilidad  $\chi^2$  con  $k-1$  grados de libertad (donde  $k$  se refiere al número de categorías de la variable cuyo ajuste se está intentando evaluar)<sup>397</sup>. Igualmente, es cualquier prueba estadística de la hipótesis, si la hipótesis nula es verdad. Determina si existe asociación entre variables cualitativas. Si el valor de  $p$  asociado al estadístico de contraste es menor se rechazará la hipótesis nula. Se utiliza para analizar tablas de contingencia y comparación de proporciones en datos independientes.

#### **2.1.2. Test de Fisher**

La prueba exacta de Fisher permite valorar el efecto del azar. Es una prueba estadística de significación usada en el análisis de los tamaños pequeños categóricos de muestra de datos. La necesidad de la prueba de Fisher se presenta cuando tenemos datos que se dividan en dos categorías de dos maneras separadas. Esta prueba de significación estadística es utilizada para comparar proporciones en tablas de contingencia. Es preferible a la prueba de  $\chi^2$  cuando el tamaño de la muestra es reducido (de menos de 30 efectivos). Es la prueba estadística de elección cuando la prueba de  $\chi^2$  no puede ser empleada por tratarse de un tamaño muestral insuficiente.<sup>383, 384</sup>.

#### **2.1.3. Frecuencias fenotípicas, genotípicas y alelicas. Fórmulas para su cálculo**

Tengamos en cuenta un ejemplo para entender las formulas<sup>431</sup> que se describen a continuación: Describimos como locus A: alelos ( $A_1$  y  $A_2$ ) y como genotipos:  $A_1A_1$ ;  $A_1A_2$ ;  $A_2A_2$ .

Las **frecuencias fenotípicas** de una población son las proporciones o porcentajes de individuos de cada fenotipo que están presentes en la población.

$$\frac{\text{Número de individuos de un fenotipo}}{\text{Número total de individuos}}$$

Las **frecuencias genotípicas** de una población son las proporciones o porcentajes de individuos de cada genotipo que están presentes en la población

$$\frac{\text{Número de individuos de un genotipo}}{\text{Número total de individuos}}$$

La suma de las frecuencias genotípicas será 1. Por ejemplo:

Genotipos	Núm. de individuos	Frecuencias genotípicas
A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	15	15/50 = 0,3 => 30%
A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	30	30/50 = 0,6 => 60 %
A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	5	5/50 = 0,1 => 10 %
Total	50	1 → 100%

Las **frecuencias génicas** son las proporciones de los diferentes alelos en cada locus, presentes en la población.

La suma de las frecuencias génicas será 1.

Genotipos	Núm. de individuos	Núm. de genes	
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	30	60	0
A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	60	60	60
A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	10	0	10
Total	100	120	80

Frecuencias del alelo A<sub>1</sub> => 120/200 = 0,6

Frecuencias del alelo A<sub>2</sub> => 80 / 200 = 0,4

De forma más general:

Genotipos	Núm. de individuos	Frecuencias genotípicas
A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	n <sub>1</sub>	n <sub>1</sub> /N = D
A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>2</sub> /N = H
A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>3</sub> /N = R
Total	N	1 => 100%

$$D + H + R = 1$$

Relación entre frecuencias génicas y frecuencias genotípicas:

Genes	Frecuencias
A <sub>1</sub>	$\frac{2n_1 + n_2}{2N} = \frac{2D + H}{2D+2H+2R} = D + 1/2H = p$
A <sub>2</sub>	$\frac{2n_3 + n_2}{2N} = \frac{2R + H}{2D+2H+2R} = R + 1/2H = q$

La relación entre la frecuencia génica y la genotípica es por tanto:

$$p = D + 1/H \quad \text{y} \quad q = R + 1/2H$$

## 2.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general). En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. Otras posibilidades son que los individuos no sean independientes (V.g.: por consanguinidad) o que se dé una selección de un alelo (V.g.: por estar asociado con la longevidad). Tampoco debe olvidarse que si empleamos un grado de significación del 5%, por azar puede observarse falta de ajuste al esperado, aunque la condición de transmisión de alelos con independencia sea correcta en la población del estudio. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg; ello puede ser indicativo de que el polimorfismo pueda estar asociado con la enfermedad.

## 2.3. Estudios de asociación

Los estudios de asociación genética buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado (V.g.: rasgo, riesgo de enfermedad, etc.). Se trata generalmente de estudios de cohortes prospectivas o de tipo casos-controles en los cuales se establece el peso relativo del componente genómico con respecto a otros factores como el ambiente, en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Habitualmente, se utilizan como marcadores genéticos los SNPs.<sup>400</sup> Tienen como objetivo identificar factores de susceptibilidad a una determinada enfermedad y comparar la frecuencia de diferentes factores de riesgo en un grupo de individuos afectados por la enfermedad de interés y en un grupo control.<sup>354</sup>

El análisis estadístico en un estudio de asociación es sencillo y puede resumirse en una tabla de 2X2. El aspecto más difícil, como en la mayor parte de los estudios de casos y controles, consiste en la selección de los controles.

Las asociaciones pueden surgir por tres razones, una de las cuales es completamente artificial: i) el alelo en cuestión es realmente la causa del fenotipo; ii) el alelo no causa el fenotipo, pero está en desequilibrio de ligamiento con otro alelo que sí lo causa. El desequilibrio de ligamiento ocurre cuando el alelo causante del fenotipo está físicamente cercano al alelo en estudio. Suele observarse en poblaciones jóvenes típicamente aisladas; iii) existe una mezcla poblacional. En una población mezclada, cualquier fenotipo común a un grupo étnico resultará en una asociación positiva con cualquier alelo que también sea más fuerte en dicho grupo étnico.

Desde sus comienzos, el proyecto genoma humano ha reconocido que la identificación de genes tendría profundas consecuencias para el individuo, la familia y la sociedad.<sup>355</sup>

En ese momento surgen interrogantes relacionados a la manera de interpretación y utilización de dicha información, igualmente el hecho de que tipo de personas tendrían acceso a ella, de los perjuicios generados para el individuo entorno a esta y sobretodo la polémica acerca del beneficio de ofrecer un estudio genético cuando es poco lo que se podría recomendar en cuanto a cura o prevención.

Ya se han identificado genes que causan, al menos parcialmente, numerosas enfermedades. A pesar de que la detección y el diagnóstico de las mismas es cada vez más precoz y certero, el objetivo a largo plazo de este tipo de proyectos es mejorar su tratamiento, prevenirlas, o tal vez lograr su curación, sin embargo este período intermedio, donde la detección temprana es posible, pero aún el conocimiento es limitado, y el tratamiento no está disponible, es el que se caracteriza por los conflictos éticos, morales, legales y sociales que los rodean.

#### **2.4. Análisis de polimorfismos y haplotipos**

Los polimorfismos genéticos se definen como variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Se ha estimado que hay una variante en cada 1.000 pares de bases de los 3.000 millones que configuran el genoma humano. Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de «alta penetrancia», ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. Estas variantes suelen ser de baja frecuencia en la población general<sup>387</sup>.

El análisis descriptivo de un polimorfismo consiste, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible. Las frecuencias genotípicas, se estiman directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo<sup>389</sup>.

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente.

Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un test del  $\chi^2$ . También se pueden calcular las disparidades o razones de posibilidades (en inglés, *odd ratio*, OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación.

Además, permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores. El riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias del alelo variante, lo que permite definir varios modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos.

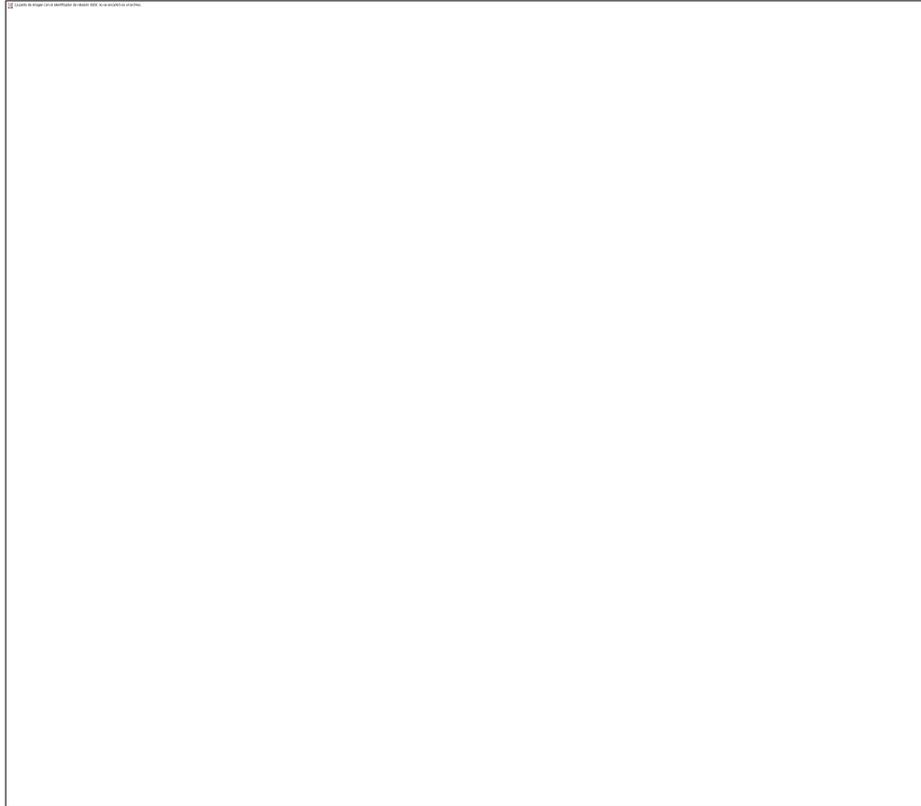
Los 4 modelos principales de herencia posibles, y que utilizamos en nuestro análisis son: (i) *Modelo dominante* (supone que una única copia del alelo variante es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos y homocigotos del alelo variante tienen el mismo riesgo y se puede comparar la combinación de estos dos genotipos respecto a los homocigotos del alelo frecuente); (ii) *Modelo recesivo* (supone que son necesarias dos copias del alelo variante para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más frecuente tienen el mismo riesgo y se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante); (iii) *Modelo aditivo* (supone que cada copia del alelo variante modifica el riesgo en una cantidad

aditiva; por tanto, los homocigotos del alelo variante tienen el doble de riesgo que los heterocigotos y se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos y peso 2 a los homocigotos del alelo variante) y (iv) *Modelo codominante* (es el más general, cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo y se comparan heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente<sup>389, 390</sup>).

El análisis descriptivo de haplotipos permite identificar o estimar, para cada individuo, la pareja de haplotipos que posee en función de los genotipos. Estos haplotipos pueden analizarse en relación con la enfermedad mediante modelos de regresión logística<sup>394, 395</sup>.

## **2.5. Desequilibrio de ligamiento y haplotipos**

El equilibrio Hardy-Weinberg hacía referencia a la independencia de alelos en un locus entre cromosomas homólogos, El desequilibrio de ligamiento (del inglés *linkage disequilibrium*, LD) se refiere a la asociación entre alelos de diferentes loci en uno de los cromosomas homólogos. El LD hace por lo tanto, referencia a la disposición no casual de alelos en dos loci, de modo que estos alelos serán heredados conjuntamente a lo largo de múltiples generaciones. En la figura 3 se ilustra este concepto. Consideremos un locus marcador (T). En un determinado momento ocurre una nueva mutación en el genoma. El cromosoma en el que se produce la mutación contiene el background genético de la mutación. Al transmitirse a la descendencia a lo largo de varias generaciones, el fenómeno de recombinación provocará que alelos en loci marcadores que están lejos de la mutación se intercambien. Como resultado el background genético asociado a una mutación será cada vez más pequeño. En general cuanto más cerca está el marcador de la nueva variante, más fuerte será el LD. Cuando el marcador y la nueva variante están muy juntos, la recombinación habrá ocurrido a una tasa tan baja que el alelo marcador y la nueva variante cosegregarán, incluso entre familias<sup>401</sup>. El concepto de LD es fundamental en los estudios de asociación genética, ya que implica que no tenemos que llegar a genotipar la variante causal para detectar asociación, simplemente tenemos que genotipar muy cerca de la verdadera variante.



**Figura 3.** Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Por lo tanto es de especial interés determinar si un grupo de alelos están en LD. Mediante la caracterización de regiones con alto LD (LD en una región con múltiples SNPs puede determinarse simplemente como la media de todas las medidas de LD dos a dos), el genoma puede dividirse en bloques de desequilibrio de ligamiento (bloques haplotípicos). El desequilibrio de ligamiento es por lo tanto una medida de la asociación entre dos loci que captura cómo de aleatoriamente se distribuyen los alelos.

En los estudios de desequilibrio de ligamiento se genotifican unos cientos o miles de marcadores espaciados en millones de bases, en familias con varios parientes afectados<sup>398, 399</sup>. Los marcadores que se segregan en los familiares que presentan la enfermedad, más frecuentemente de lo esperado, son utilizados para localizar el gen causante. Esta técnica ha sido útil para encontrar alelos relacionados en todo el genoma, particularmente en los desórdenes monogénicos o de transmisión mendeliana. Sin embargo, estos análisis de desequilibrio de ligamiento han sido menos afortunados en encontrar genes asociados a enfermedades poligénicas y rasgos complejos.

### **ANEXO 3. Base de datos del estudio**

1= Caso; 2= Edad; 3= Primigesta; 4= Otra gestación; 5= Aborto; 6= Edad gestacional; 7=Infecciones; 8= *S. agalactiae*; 9= Grupo sanguíneo materno; 10= Proteinuria; 11= Tabaco; 12= Menarquia; 13= Transfusiones; Síndrome HELLP; 15=ACO; 16= Preeclampsia Leve; 17= Moderada; 18=Grave; 19=Eclampsia; 20= Producto; 21= Sexo; 22= Peso del recién nacido; 23= APGAR 1'; 24= APGAR 5'; 25=Grupo sanguíneo del Feto; 26= Puerperio; 27=Alergias; 28= Antecedentes Qx; 29= Tipo de parto; 30=pH arteria umbilical; 31= Otras patologías; 32= Genotipo MMP 9; 33= Genotipo COMT; 34 =Genotipo HLA G; 35= Genotipo MTHFR.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	29	1	1	1	39.1		2	1		3	12	1	1	2	1			1	1	1	2690				1	2	2	2			1	3	3	1
1	27	2		1	40.4	2		5		2	12	1	1		1			1	1	1	3220	9	9					1			1	3	3	2
1	39	1	1	1	36.0		2	4		1	12	1		1	1			1	2	1	2670	5	8		1	1	1	2			2	3	3	2
1	28	2	1	1	33.0			3		2	11	1		1	1			1	1	1	2800	9	9		1	1	2	3	7,26	1	1	3	3	3
1	31	1	1	2	37.5			3		2	14	1			1			1	1	1	2970	9	9		1	1	1	2			1	1	2	3
1	37	1	1	2	30.2			1				1			1			1	1	1	2680	7	9		2	1	1	2	7,23		1	3	3	1
1	27	1	1	2	35.0		1	5	2	1	13	1		1	1			1	1	1	3500	9	9		1	1	1	2			1	1	3	2
1	29	2	1	1	38.0		2	3	2	1	12	1		2		2		1	1	2	2940	9	9		2	1	1	1	7,36		1	1	3	3
1	35	2	1	1	35.0		1	3	3	3	15	1		2		2		1	2	2	2140	9	9		3	1	2	1			1	3	2	2
1	34	1	1	2	30.3		1	3	3	1	13	1		1	1			1	2	1					2	1	1	2			1	1	3	1
1	34	1	2	2	39.5	1	1	1		1	12	1			1			1	1	1	3510	9	9	1	2	1		1	7,31		2	3	3	2
1	35	2	1	1	30.0	1		1		1	13	1		2	1			1	1	1		8	8		2	1	1	2			1	3	2	2
1	30	2	1	1	40.2	1		3		1	11	1			1			1	1	2	2915	9	9		2	1		2	7,09		1	1	3	1
1	24	2	1	1	38.0	1		4		1		1		1	1			1	1	2	3070	9	9	3	1	1		3	7,3		1	3	2	3
1	36	1	1	2	37.0	1	1	1		1	12	1		1		2		1	1	2	3580	9	9		3	1		2			1	3	1	1
1	28	2	1	1	39.0	1	1	3		3		1		2	1			1	1	1	3000	9	9		2	2	1	2	7,35		1	1	2	1
1	35	2	1	1	38.0	1	1	7		1	13	1		1	1			1	1	2	2975	9	9		3	1	2	2	7,3		1	1	3	1
1	34	2	1	1	37.6		1	1		1	15	1		1	1			1	1	1	2575	9	9		1	1		2			1	1	3	1
1	26	2	1	1	39.0		2	3		1	14	1		1	1			1	1	1	3820	9	9		2	1		3	7,27		1	3	1	1
1	36	1	2	1	32.0			3				1			1			1	1	1	2155	9	9		1	1		2	7,31		1	2	2	1
1	33	1	1	1	34.0			1		1	12	1			1			1	1	2	2410	9	9		2	1	2	3	7,30		1	1	3	1

1	30	2	1	1	32.4			1		1	11	1		1		2		1	2	2	2220	8	9		1	1	2	3			1	1	3	1		
1	39	2	1	1	38.5	1	2	3	2	1	12	1	1	1		2		1	1	1	2615	7	9		2	1	1	2			1	1	2	3	3	
1	37	2	1	1	32.4	1	1	2	2	1	11	1	1			3	1	1	1	1520	7	8	2	3	1	2	2	7,19		1	1	2	2	3		
1	39	1	1	1	37.4	1	1	4	1	1	13	1	1	1	1			1	1	1	3020	9	9	4	2	1	1	3			1	1	3	1	1	
1	34	1	1	2	33.5	1	1	1	3		13	1	1	1			3	1	1		1800	7	9			1	2	2			2	3	1	2	3	
1	28	1	1	1	27.0	1	1	6	3	2	14	1	1	1			3	1	1	2	1700	8	8	5	1	2	1	2			1	1	3	3	1	
1	32	1	1	1	37.6	1	1	2	3	2		1	1	1	1			1	1	1	3050	9	9	1	1	1	1	1	7,30		1	1	3	2	1	
1	31	2	1	1	39.6	1	2	3	1	1	16	1	1	2	1			1	1	1	3030	9	9		1	1	1	2	7,32		1	3	2	2	1	
1	29	2	1	1	39.4	1	1	1	3	1		1	1	2	1			1	1	2	3430	9	9		3	1	1	2	7,18		1	1	2	1	1	
1	35	1	1	1	40.1	1	1	3	1	1		1	1	1	1			1	1	2	2740	9	9		1	1	2	1			1	1	1	3	1	
1	33	2	1	1	34.6	1	2	1	1	1		1	1	2	1			1	1	1	3360	9	9		2	1	1	2	7,33		2	1	2	1	1	
1	37	1	2	2	32.3	1	1	2	2	1	14	1	1	1	1			1	1	2	2570	9	9	3	1	1	1	3	7,34		1	1	2	3	1	
1	34	2	1	1	36.4	1	1	3	3			1	1				2		1	1	1	2800	8	9		3	1	1	3	7,27		1	1	3	3	1
1	26	1	1	2	39.5	1	2	5	1	1	14	1	1		1			1	1	1	3850	9	9		1	1	1	3	7,18		1	1	1	1	1	
1	36	1	2	2	35.0	1	2	1	2	1	11	1	1	1			3	1	1	1	2190	7	9		2	1	1	2	7,26		1	1	3	3	3	
1	39	1	2	1	34.0	1	1	3	1	1		1	1	2	1			1	1	1	2650	7	8		1	1	1	3	7,23		1	3	1	3	1	
1	38	1	1	1		1	2	3	1	1		1	1	1	1			1	1	2	3930	9	9		1	1	1	1	7,23		1	2	3	2	1	
1	34	1	1	2	37.0	1	1	3	1	2		1	1	1	1			1	1	2	2880	7	8		1	2	1	2	7,26		1	3	1	3	1	
1	32	2	1	1	36.4	1	1	1	3	1	12	1	1	1			2		1	1	1	2900	9	9		1	1	1	3			1	2	3	3	3
1	32	2	1	1	34.4	1	1	3	2	1	12	1	1	1	1			1	1	2	1960	9	9		1	2	1	3			1	1	3	3	2	
1	37	2	1	1	33.4	1	1	3	1	1		1	1	1	1			1	2	2	2000	9	9		1	1	1	2	7,18		2	1	3	3	1	
1	36	2	1	1	37.2	1	1	3	3	1	13	1	1	1			2		1	1	2	2690	9	9		1	1	2	2	7,26		1	1	3	3	1
1	43	1	2	1	33.0	1	1	1	2	2	14	1	1	1	1			1	1	1	2235	9	9		1	1	1	2			2	1	3	2	1	
1	34	2	1	1	28.2	1	1	4	3	2	13	1	2	1			3	1	1	1	1890	9	9		2	1	2	2			1	1	1	3	2	
1	29	1	1	2	25.6	1	1	4	3	1	14	1	1	1			3	1	1	1	1600	9	9	4	2	1	1	2			1	1	3	1	1	
1	28	2	1	1	32.4	1	1	1	3	1	12	1	2	1			3	1	1	2	1740	9	9		1	2	1	2			1	1	1	2	3	
1	34	1	1	1	33.0	1	1	3	3	1	13	1	1	1			3	1	1	1	2280	8	9		2	1	2	2	7,18		1	1	2	2	2	

1	35	2	1	1	31.4	1	1	2	3	1	13	1	1	1		3	1	1	1	1540	9	9		1	1	1	2	7,30	1	2	1	3	1	
1	27	2	1	1	31.6	1	1	3	3	2	11	1	1	1		3	1	1	1	1490	4	8		2	1	1	2		1	3	3	3	1	
1	34	1	2	2	37.6	1	1	1	2	2	14	1	1	1		2		1	2	2350	9	9	3	1	1	1	2		1	3	2	3	2	
1	30	1	1	1	40.0	1	1	2	2	1	13	1	1	1		2		1	1	3920	8	9	2	1	1	1	3	7,20	1	1	1	3	2	
1	36	2	1	1	39.5	2	1	2	2	1	12	1	1	1		2		1	1	3615	9	9	2	2	1	1	2		1	3	2	2	2	
1	31	1	1	2	36.2	1	1	2	2	1	12	1	1	1		2		1	1	2955	9	9		1	1	2	2	7,30	2	3	3	3	2	
1	27	1	1	2	32.0	1	1	3	3	2	9	1	1	1		3	1	1	2	1330				1	1	1	3		1	3	1	2	2	
1	34	2	1	1	33.0	1	1	5	3	1	12	1	1	1		2		1	2	2200	9	9		2	1	2	2	7,32	1	1	1	3	1	
1	20	1	1	1	36.3	1	1	1	3	2	14	1	1	1		2		1	2	3050	9	9		1	1	1	3		1	3	3	3	1	
1	36	2	1	1	35.0	2	1	3	3	1	12	1	1	1		2		1	1	2130	9	9		1	2	1	2	7,30	2	1	3	2	1	
1	40	1	2	2	28.0	1	1	1	2	1	13	1	1	1		2		1	2	1270	9	9		2	1	1	2	7,30	1	1	1	2	1	
1	31	2	1	1	32.6	1	1	1	3	1	12	1	1	1		2		1	2	2200			1	3	1	1	2		1	1	3	2	3	
1	39	2	1	1	34.2	1	1	5	2	1	13	1	1	2		2		1	2	1960	9	9		1	1	1	3	7,24	2	1	3	2	1	
1	38	2	1	1	26.0	1	1	4	3	1	12	1	1	1		3	1	1	2	1860	9	9		1	1	2	2	7,37	1	1	3	2	1	
1	28	1	1	1	37.3	1	1	1	2	1	12	1	1	2		2		1	1	2810	9	9		2	1	1	3	7,17	2	1	3	2	2	
1	30	2	1	1	34.3	1	1	1	1	1	13	1	1	1	1			1	2	3105	9	9		1	1	1	2		1	2	3	2	2	
1	35	1	2	1	34.0	1	1	1	3	1	12	1	1	1		2		1	1	2305	9	9		1	1	1	2	7,28	1	1	2	3	2	
1	24	2	1	1	38.0	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1			1	2	2715	5	7		3	2	1	2	7,35	2	3	3	2	1	
1	27	1	1	2	37.6	1	1	5	2	1	12	1	1	1	1			1	2	2360	9	9		1	1	1	3	7,30	1	1	3	2	1	
1	38	1	1	2	36.0	2	1	3	3	1	11	1	1	1		2		1	2	1870	9	9		3	1	1	2		1	1	1	3	1	
1	33	2	1	1	36.5	1	1	1	3	1	11	1	2	2			3	1	1	2275	9	9		1	1	2	2	7,32	1	1	1	2	1	
1	25	2	1	1	34.2	2	1		2	1	11	1	1	1	1			1	1					1	1	1	3		1	1	3	2	3	
1	32	2	1	2	36.6	1	1	3	1	1	11	1	2	1			3	1	1	1	1900	5	6		3	1	1	2	7,09	1	3	1	2	1
1	29	2	1	1	24.0	1	2	3	2	1	11	1	1	1	1			1	1	1	1910	9	9		2	1	1	3	7,29	1	3	3	3	3
1	36	2	1	1	38.6	1	2	1	1	1	12	1	1	1	1			1	2	3000	9	9		2	1	1	3	7,32	1	1	2	3	2	
1	32	2	1	1	38.0	1	1	3	3	1	11	1	1	2		2		1	1	2850	9	9		1	2	1	2	7,36	1	1	3	3	1	
1	29	1	1	2	37.0	1	1	1	3	2	11	1	1	1		2		1	2	2440	6	8		1	1	1	3	7,27	1	1	1	3	1	

1	32	2	1	1	32.0	2	2	1	3	2	16	1	1	1		2		1	1	2	3455	8	9		1	1	1	2	7,28	1	3	2	3	3
1	44	1	1	1	33.6	1	1	3	3	1	11	1	1	1		3	1	1	2	1980	8	9		1	1	1	2		1	2	2	3	2	
1	29	2	1	1	39.3	1	1	3	1	1	11	1	1	2	1		1	1	1	2835	7	8		2	1	1	3	7,05	2	1	1	2	1	
1	30	2	1	1	26.0	1	1	1	1	2	12	1	1	2		2	1	1	2	1800	7	8		2	1	2	3	7,24	1	2	3	3	1	
1	28	2	1	1	37.6	1	1	2	3	1	14	1	1	1		2	1	1	1	2700	9	9	4	1	1	1	3		1	2	3	3	2	
1	28	2	1	1	38.1	1	1	1	1	1	13	1	1	2		2	1	1	2	3910	9	10		2	1	1	1	7,32	1	2	2	1	2	
1	33	1	1	2	39.4	1	1	1	1	1	12	1	1	1	1		1	1	2	3240	9	9		2	1	1	3	7,35	1	1	3	3	1	
1	41	1	1	2	36.0	1	1	2	3	1	13	1	1	1		2	1	1	1	2960	9	9		2	1	2	2	7,31	1	2	3	3	2	
1	30	2	1	1	38.4	1	1	1	3	2	12	1	1	1		2	1	1	2	2650	9	9		2	1	2	3	7,31	1	3	3	3	3	
1	35	2	1	1	33.0	1	1	1	3	1	13	1	1	1		3	1	1	2	2200	7	9		1	2	1	2	7,29	1	1	3	3	2	
1	34	2	1	1	34.0	1	2	1	2	1	12	1	1	1		3	1	1	2	2315	9	9		3	1	1	2	7,37	1	1	3	2	1	
1	31	2	1	1	35.0	1	1	3	2	1	12	1	1	1		3	1	1	2	2050	9	9		1	1	1	2	7,39	1	1	3	2	2	
1	38	1	1	1	32.0	1	1	1	1	1	13	1	1	1	1		1	1	2	2050	9	9		2	1	1	1		1	1	1	3	1	
1	45	2	1	1	32.0	1	1	3	3	1	11	1	2	1		3	1	2	1	2100	9	9		2	1	1	2	7,38	1	1	1	1	1	
1	29	2	1	1	30.0	1	1	1	2	1	11	1	1	1		3	1	1	1	2500	8	9		2	1	1	2	7,26	2	2	3	1	1	
1	28	2	1	1	38.6	1	1	1	2	1	11	1	1	2	1		1	1	1	3500	9	9		2	1	1	3	7,28	1	1	1	2	1	
1	32	1	1	2	30.0	1	1	1	3	1	12	1	1	1		2	1	2	2	1570	9	9		3	1	1	2	7,29	1	1	3	2	3	
1	33	1	1	1	35.1	1	1	6	1	2	12	2	2	1		3	1	1	2	2635	9	9	5	2	1	2	2	7,29	1	1	2	1	1	
1	35	2	1	1	33.2	2	1	3	3	1	12	1	1	2	1		1	1	1	3410	9	9		2	1	2	3	7,30	1	1	1	3	2	
1	27	2	1	1	39.4	1	1	1	1	2	12	1	1	2	1		1	1	2	3610	9	9		1	1	2	1	7,24	2	2	1	2	3	
1	32	2	1	1	37.6	1	1	3	3	1	12	1	1	2		3	1	1	1	3150	9	9		2	1	1	2	7,36	1	2	3	3	1	
1	37	2	1	1	27.0	1	1	1	2	1	13	1	1	1		2	1	2	2					1	1	2			1	1	2	3	1	
1	28	1	1	1	38.6	1	1	3	1	1	12	1	1	2	1		1	1	1	3590	8	9		1	1	1	1		1	3	3	1	3	
1	22	2	1	1	35.2	1	1	3	1	1	12	1	1	1	1		1	1	1	2660	9	9		1	1	1	2		1	3	2	1	3	
1	27	2	1	1	29.0	1	1	3	3	2	12	1	1	2		3	1	1	1	1760	6	7		1	2	1	2		2	1	1	1	3	
1	29	2	1	1	24.0	1	2	3	2	1	12	1	1	1	1		1	1	1	1910	9	9		2	1	1	3	7,29	1	1	1	2	1	
1	27	2	1	1	39.1	1	2	1	2	1	12	1	1	1		2	1	1	2	2880	9	9		1	1	2	2	7,24	1	1	1	1	3	

1	27	2	1	1	36.1	1	1	1	2	1	14	1	1	2	1			1	1	1	3485	9	9		1	1	2	2		1	1	3	3	3
1	33	2	1	1	38.4	2	1	4	2	2	13	1	2	1			3	1	1	2	2980	9	9	2	3	1	1	1			3	3	1	2
1	30	2	1	1	32.5	1	1	3	3	1		1	1	1	1			1	1	2	3840	9	9		1	1	1	1		1	1	3	2	3
1	35	2	1	1	37.0	1	1	5	2	1	13	1	1	2		2		1	1	2	2970	9	9		1	1	1	2		1	1	1	2	3
1	23	1	1	2	37.2	1	1	6	1	1		1	1		1			1	1	2	3020	9	9	5	1	1	1	3		1	1	2	1	1
1	25	1	1	1	33.0	1	1	3	3	1	12	1	1				3	1	1	1	1770	9	9		2	1	1	3		1	3	2	1	3
1	26	1	1	2	37.2	1	1	1	2	1		1	1	2	1			1	1	2	2970	9	9		1	1	1	3	7,24	1	3	1	3	1
1	39	1	1	2	33.0	2	1	5	3		12	1	1				3	1	1	2	1500	9	9			1	1	2		1	1	3	3	3

1= Control; 2= Edad; 3= Primigesta; 4= Aborto; 5= Infecciones; 6= *S. agalctiae*; 7= Grupo sanguíneo materno; 8= Tabaco; 9= Menarquia; 10= Transfusiones; 11= ACO; 12= Producto; 13= Sexo; 14= Peso del Recien nacido; 15= APGAR 1; 16= APGAR 5; 17= Grupo sanguíneo fetal; 18= Puerperio; 19= Alergias; 20= Antecedentes QX; 21= Tipo de parto; 22= pH arteria umbilical; 23= otras patologías; 24= Demograficos; 25= Genotipo MMP 9; 26 = Genotipo COMT; 27= Genotipo HLA G; 28= Genotipo MTHFR

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2	33	2	1	1	1		1	14		2								1	1			2	2	1	3	3	3
2	31	1	1	1	1	5	2	12	1	2	1	1	3800	9	9		1	1	1	1			1	1	3	2	1
2	35	2	1	2	1	3	1	13	1	2	1	1	3530	8	9		1	1	2	1	7,26	1	1	1	3	3	1
2	34	2	1	1	1	3	2	12	1	1	1	2	3160	7	9		2	2	1	1	7,23		1	1	3	1	2
2	36	1	2	1	1	1	2	14	1	1	1	2	3500	9	9		1	1	2	1	7,36	2	1	1	3	3	3
2	35	2	1	1	1	3	2	12	2	2	1	1	2990	4	6		2	1	1	1	7,27	1	2	1	3	3	1
2	30	1	1	1	1	1	1	12	1	1	1	1	3000	9	9		1	1	2	1	7,36	1	2	1	3	3	3
2	31	1	1	1	1	1	2	14	1	1	1	1	2520	9	9		2	1	2	1	7,19	1	1	1	3	3	1
2	27	2	1	1	1	3	1	13	1	1	1	1	2270	9	9		1	1	1	2	7,40	1	1	1	3	1	1
2	30	2	1	1	2	1	1		1	1	1	2	3160	9	10		2	1	1	1	7,34	1	2	1	3	3	3
2	30	1	1	1	1	1	1	15	1	2	1	1	2610	9	9		1	2	1	1	7,31	1	1	3	3	1	1
2	30	2	1	1	1	2	2	15	1	1	1	2	3420	9	9	3	3	1	2	1		1	1	1	1	3	3

2	30	1	2	1	1	3	1	11	1	2	1	2	4010	9	9		1	1	1	1			1	1	3	2	3
2	31	2	1	1	1	4	1	13	1	1	1	2	2240	9	10	1	1	1	1	2	7,33	1	1	1	1	3	3
2	34	1	1	1	1	3	1		1	1	1	1	2390	9	10		1	1	1	1	7,29	1	1	1	1	3	3
2	33	2	1	1	1	3	1		1	2	1	2	2960	9	10		1	1	1	1	7,35	1	2	3	3	3	3
2	33	2	1	1	1	1	1		1	1	1	1	3340	9	9		1	1	1	1	7,38	1	2	1	1	1	2
2	30	2	1	1	1	3	2	13	1	1	1	2	2820	9	10		1	1	1	1	7,20	2	2	1	3	3	3
2	40	2	1	1	1	3	1	14	1	2	1	1	3380	9	9	1	1	1	2	1		2	1	3	1	2	1
2	34	1	2	1	1	3	1	13	1	1	1	2	3380	9	9		2	1	1	1	7,25	1	1	1	3	3	1
2	29	2	1	1	2	5	1	13	1	2	1	2	3230	9	9		1	1	1	1		1	1	2	3	1	1
2	33	2	1	1	1	3	2	10	1	1		1	3740	9	10		2	2	1	3		1	1	1	3	2	3
2																							1	1	3	1	1
2	31	1	2	1	1	3	1	11	1	1	1	2	3520	8	8		1	1	1	1	7,26	1	1	1	2	2	1
2	25	1	1	1	1	1	2	11	1	2	1	2	3250	9	9		2	1	1	1		1	2	1	3	2	3
2	30	1	2	1	1	5	1	13	1	1	1	2	3620	7	9		1	1	1	2		1	1	1	3	2	2
2	32	1	2	1	1	2	1		1	1	1	2				3	2	1	1	2		1	1	1	2	3	3
2	35	2	1	1	1	4	1	13	1	1	1	2	3100	9	10		1	1	1	1	7,29	2	1	1	3	3	1
2																							1	1	1	3	2
2	22	1	1	1	1	3	2	15	1	1	1	1	3460	9	10	3	2	1	1	1	7,28	1	1	1	3	2	1
2	37	1	2	1	1	1	1	13	1	1	1	1	3020	9	10	3	1	2	1	1	7,17	2	2	1	2	2	2
2	34	2	1	2	1	3	1	13	1	2	1	1	2770	9	10		1	1	2	1		1	1	1	3	1	1
2	29	1	1	2	1	3	2	11	1	1	1	1	3500	9	9		1	1	1	1		2	1	1	2	3	1
2	28	2	1	1	1	1	2		1	1	1	1	2970	8	9		1	1	1	1		1	1	1	2	2	2
2	31	2	1	1	1	4	1	12	1	1	1	1	3260	9	10		1	1	2	2	7,25	1	2	1	3	2	3
2	28	1	2	1																		2	2	1	3	2	1
2																											
2																											
2	28	2	1	1	1	1	2	13	1	2	1	1	3405	9	9		3	1	1	2	7,28	1	2	3	3	2	3

2		1	1	1	1	1	2		1	1	1	1					3	1	1	2		1						
2	32	2	1	1	1	5	1	15	1	1	1	1	3710	9	9	1	1	1	1	3		1	1	1	3	2	3	
2	32	2	1	1	1	3	1	12	1	1	1	1	3050	8	9		1	1	1	1	7,30	1	2	1	1	3	1	
2	32	2	1	1	1	2	2	13	1	2	1	2	3010	9	9		1	1	1	3	7,26	1	2	1	3	3	1	
2	32	2	1	1	2	7	1	12	1	1	1	1	3760	9	9		3	1	1	1		1	1	1	3	2	2	
2	29	1	2						1		1	2					2	1	1	1		1	1	1	3	1	1	
2		1	2	1	1	1	2		1	1	1	2						1	2			2						
2	30	2	1	1	1	3	1	13	1	1	1	2	3230	8	10		1	1	1	1	7,36	1	1	1	3	2	3	
2		2	1	1	1	2	1		1	2	1	1					2	1	1	1		1						
2		2	1	1	1	3	2		2	2	1	1					2	1	1	1		1						
2	30	2	1	1	1	3	1	13	1	1	1	1	2920	9	10		3	1	2	2	7,27	2	1	1	3	1	1	
2	29	2	1	1	1	4	1			2	1	1	2930	9	10		1	1	1	3	7,44	1	1	1	1	2	2	
2	38	1	1	1	1	3	1		1	1	1	2	4000	9	10	4	1	1	1	1		1	2	1	3	1	1	
2	28	1	1	1	1	1	1		1	1	1	2	3270	10	10		1	1	1	2	7,24	1	2	1	3	1	1	
2		2	1	1	1	4	1		1	1	1	1					1	1	1	1		1						
2	26	2	1	1	1	3	2		1	1	1	1	3705	9	10		1	1	1	1	7,33	1	2	1	3	1	1	
2	35	2	1	1	2	3	2		1	1	1	1	3100	9	9		1	1	1	2	7,26	1	2	1	1	3	3	
2	37	1	1	2	1	1	1	13	1	1	1	2	4180	9	9		1	1	1	2	7,26	1	2	1	2	1	2	
2	30	2	1	1	2	3	2	13	1	1	1	2	3955	9	10		2	2	1	2	7,34	1	1	1	3	1	2	
2	32	2	1	1	1	4	1	12	1	1	1	1	3600	9	9	7	1	2	2	1	7,34	1	1	1	3	2	1	
2	25	1	1	1	1	6	1	12	1	1	1	1	3120	9	9		2	1	1	3	7,29	1	2	1	2	2	1	
2	31	1	1	1	1	4	1	12	1	2	1	2	3160	9	10		1	1	1	1	7,25	1	2	1	3	3	1	
2	33	1	1	1	1	1	1	13	1	1	1	1	3220	9	10		1	1	1	1	7,39	1	1	1	2	2	1	
2	35	1	2	1	1	7	1	13	1	1	1	2	3180	9	9		2	1	2	1	7,26	2	2	1	1	2	3	
2	37	1	1	1	1	4	1	12	1	1	1	2	2930	9	9		2	1	1	1	7,31	1	1	1	3	3	2	
2	29	1	1	1	1	3	1	13	1	1	1	2					1	1	1	2		1	2	1	1	3	1	
2	37	1	1	1	2	1	1	12	1	1	1	2	3550	9	9		2	1	1	3	7,20	1	1	1	3	2	3	

2	36	1	2	1	1	3	1	13	1	1	1	1	3580	9	9		1	1	1	1	7,29	1	1	3	2	3	3
2	28	2	1	1	1	3	1	11	1	1	1	1	3230	9	9		3	2	1	1	7,19	1	1	1	3	3	1
2	41	1	1	1	2	3	1	12	1	1	1	2	3490	9	9		2	1	1	1	7,41	2	1	1	3	2	3
2	39	2	1	1	1	3	1	12	1	1	1	1	3380	9	10		1	1	1	1	7,26	1	1	1	1	2	1
2	30	2	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1	3200	10	10		1	1	1	1	7,37	1	2	1	3	1	1
2	34	1	1	1	1	1	1	12	1	1	1	1	3250	9	10		1	1	2	1	7,17	1	1	1	3	3	1
2	33	1	1	1	2	1	1	10	1	1	1	2	3860	5	6		2	1	1	2	7,25	1	2	3	3	3	2
2	28	1	2	1	1	1	1	11	1	1	1	1	3100	9	9		1	2	1	1	7,2	1	2	1	1	2	1
2	27	1	2	1	2	1	1	13	1	1	1	1	3460	8	9		2	1	1	1	7,28	1	1	1	3	1	3
2	33	2	1	1	1	3	1	12	1	2	1	1	3410	9	10		1	1	1	1	7,34	1	2	1	3	1	2
2	33	2	1	1	1	3	1	12	1	1	1	1	3400	7	8		1	1	1	1	7,22	1	2	1	1	2	3
2	37	1	2	1	1	1	1	13	1	1	1	1	3610	9	10		1	1	1	1	7,20	1	1	1	3	2	1
2	28	1	1	1	1	1	1	12	1	1	1	1	2710	9	10		1	1	2	1	7,19	1	2	3	3	3	1
2	36	2	1	1	1	1	1	13	1	1	1	2	3300	9	9		1	1	1	1	7,20	1	1	1	3	3	3
2	21	2	1	1	1	1	2	11	1	1	1	1	3610	9	9	6	1	1	1	1	7,23	1	1	1	3	3	1
2	29	2	1	1	1	2	1	11	1	1	1	1	3350	9	9		1	1	1	1	7,15	1	2	1	2	1	3
2	32	1	1	1	1	1	1	13	1	1	1	2	2640	9	9		1	1	1	1	7,26	1	1	1	3	3	2
2	22	1	1	1	2	3	1	11	1	1	1	2	3200	9	9		2	1	1	1	7,37	1	1	1	3	3	1
2	30	1	2	2	1	3	2	12	1	1	1	1	2740	7	9		1	1	1	2	7,21	1	1	1	2	3	3
2	33	2	1	2	1	1	2	11	1	1	1	2	3280	9	9		2	1	1	1	7,24	1	2	1	3	2	3
2	27	2	1	1	1	1	2	12	1	2	1	1	2850	9	9		2	1	1	1	7,24	1	1	1	3	2	3
2	26	1	1	1	2	1	2	13	1	2	1	2	2790	9	10		1	1	1	1	7,26	1	2	2	1	3	3
2	29	2	1	1	1	1	2	11	1	1	1	1	3740	10	10		2	1	1	2	7,31	1	1	1	3	3	3
2	26	1	1	1	1	3	2	13	1	1	1	2	3490	9	10		1	1	2	3	7,15	1	1	1	2	2	1
2	27	2	1	1	1	3	2	11	1	1	1	2	3050	9	9		1	1	1	2	7,38	1	2	1	3	3	3
2	34	2	1	1	1	3	2	12	1	1	1	2	2770	9	10		2	1	1	1		1	2	1	3	3	1
2	34	2	1	1	1	2	1	12	1	1	1	2	3610	9	9		1	1	1	1	7,28	1	1	1	3	3	3

2	26	2	1	1	2	1	1	13	1	2	1	2	3340	9	9		1	2	1	1	7,22	2	2	1	3	3	2
2	38	2	1	1	1	8	1	11	1	1	1	1	2330	9	9		1	1	1	1	7,21	1	1	3	3	3	3
2	35	1	2	1	1	4	1	13	1	1	1	2	2930	9	10		1	2	1	1	7,28	1	1	1	3	3	1
2	27	1	2	1	1	1	1	11	1	1	1	1	3470	9	9		2	1	1	1	7,15	1	2	1	3	3	3
2	34	2	1	1	1	1	1	13	1	2	1	2	3500	9	10		1	2	1	1	7,34	1	1	1	3	2	1
2	28	2	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	3680	8	9		1	1	1	1	7,34	1	2	1	2	1	3
2	32	1	2	1	1	1	1	12	1	2	1	2	3505	10	10		3	1	2	1		1	2	1	2	1	2
2	32	1	2	1	1	3	1	12	1	2	1	2	3600	9	9		2	1	1	1	7,23	1	1	3	1	2	3
2	34	1	2	1	1	3	1	12	1	1	1	2	2890	9	10		1	1	1	1		1	1	1	3	3	1
2	34	1	2	1	1	3	2	13	1	1	1	2	2700	9	9		1	1	1	2		1	2	1	3	1	3
2	35	2	1	1	1	3	2	13	1	1	1	1	3280	9	10		2	2	1	3	7,25	1	1	1	3	3	1
2	31	1	1	1	1	3	1	12	1	1	1	2	3200	9	9		1	1	1	1	7,30	2	2	3	3	3	1
2	39	1	1	1	1	1	2	12	1	1	1	2	2980	9	10		1	2	1	2	7,19	2	2	1	3	3	3
2	40	2	1	1	1	1	2	13	1	1	1	2	2950	10	10		1	1	1	2		1	2	1	3	2	3
2	35	1	1	1	1	7	1	12	1	1	1	2	3280	9	9		1	1	1	1	7,17	1	2	3	3	2	3
2	30	1	2	1	1	3	1	13	1	1	1	2	2920	9	9		1	1	1	1	7,31	1	1	1	3	3	3
2	30	1	1	1	1	4	1	12	1	2	1	1	4200	9	10		1	1	1	1	7,22	1	2	1	2	3	3
2	27	2	1	1	1	3	2	13	1	1	1	1	3890	9	9		1	1	1	1		1	2	1	3	2	3
2	27	1	1	1	1	1	1	11	1	2	1	1	3550	9	9		1	1	1	1	7,27	1	1	1	1	2	3
2	32	1	2	1	1	1	1	13	1	1	1	2	2930	9	9		1	1	1	1	7,30	1	1	3	1	3	3
2	31	2	1	1	1	1	1	13	1	1	1	1	3910	9	9		1	1	1	1	7,26	1	1	1	3	2	3
2	34	1	2	1	2	1	1	12	1	1	1	2	3590	9	9		1	1	1	1	7,35	2	1	3	3	3	1
2	28	2	1	1	1	3	2	12	1	1	1	2	2400	9	9		3	1	1	1	7,28	1	2	1	2	2	2
2	28	2	1	1	2	3	1	11	1	1	1	2	3000	8	9		1	1	1	1	7,12	1	1	3	3	1	1
2	32	1	1	1	2	3	1	11	2	2	1	1	3260	9	9		1	1	1	1	7,21	1	2	1	3	2	3
2	32	1	1	1	1	4	1	14	1	1	1	1	2970	9	10	3	2	1	1	1	7,23	1	1	1	3	3	1
	39	2	1	1	1	1	2	13	1	1	1	1	3065	8	9		1	1	1	1	7,21	1	1	1	1	2	3

2	35	1	2	1	1	1	1	12	1	1	1	2	3720	9	9		1	1	1	2	7,25	1	1	3	3	2	1
2	38	1	1	1	2	1	2	11	1	1	1	2	3550	9	10		1	1	1	1	7,24	1	1	3	2	3	1
2	30	1	2	1	1	3	1	13	1	2	1	2	3225	9	10		1	1	1	2	7,18	1	1	1	3	1	1
2	26	2	1	1	2	3	2	11	1	1	1	2	3300	8	9		1	1	1	3	7,20	1	1	1	3	2	1
2	27	1	1	1	1	2	1	11	1	1	1	1	3360	9	9	4	3	1	1	1	7,30	1	2	3	3	1	1
2	39	1	2	1	1	1	2	11	1	1	1	1	3950	9	9		1	2	1	3	7,30	1	2	1	3	2	1
2	37	1	1	1	2	1	2	11	1	1	1	1	3150	8	9		2	1	1	1		1	1	1	3	1	3
2	40	1	2	1	1	1	1	13	1	2	1	2	3100	9	9		1	1	1	1		2	2	2	2	2	3
2	32	1	2	1	1	1	1	12	1	2	1	2	3450	9	9		1	1	1	1		1	1	1	3	3	3
2	30	1	2	1	1	1	2		1	1	1	1	3270	9	10		1	1	1	1	7,28	1	2	1	2	2	1
2	37	1	1	1	1	3	1		1	1	1	1	3720	9	9		3	1	2	3	7,63	2	2	3	2	3	3
2	36	1	1	2	1	3	1		1	1	1	2	3460	9	9		1	1	1	1	7,24	1	1	1	3	3	1
2	34	1	2	1	1	1	1	12	1	1	1	2	3400	9	10		1	1	1	1	7,34	1	2	1	2	3	1
2	29	1	1	1	2	5	2	13	1	1	2	1	1777	9	9		1	1	2	2		1	2	1	3	3	1
2	41	1	2	1	1	1	2	13	1	1	1	2	1900	5	6		3	1	1	2	7,18	2	1	1	3	3	3
2	30	2	1	1	1	6	1	12	1	1	1	1	2150	8	10	6	1	1	2	1	7,57	1	1	1	3	1	3
2	27	1	1	1	1	3	2	12	1	2	1	1	1760	6	7		2	2	1	2		2	1	1	3	3	3
2	32	1	2	1	1	1	3	12	1	1	1	2	3570	9	9		1	1	1	1		1	1	3	3	3	
2	40	1	2	1	1	1	3	13	1	1	1	1	3960	9	10		3	1	1	2	7,23	2	1	1	3	3	1
2	35	1	1	1	1	2	3	12	1	1	1	1	3280	0	10		2	2	2	3	7,25	1	1	1	3	3	1
2	41	1	2	1	1	1	3	13	1	1	1		1830	8	9		1	1	1	1	6,97	2	2	1	3	1	1
2	30	2	1	1	1	1	3	12	1	1	1	1	3960	9	9		1	1	1	2		1	1	1	3	1	2
2	36	1	1	1	1	1	3	13	1	1	1	2	3450	9	10		1	1	1	1	7,24	1	2	1	1	1	1
2	38	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	2620	9	9		2	1	1	1	7,13	1	1	1	3	3	1
2	33	1	1	1	2	1	1	13	1	2	1	2	3500	9	10		1	2	1	1	7,34	1	1	3	3	2	1
2	32	2	1	1	1	1	1	11	3	1	1	2	3470	9	10		1	2	1	1	7,18	1	1	1	3	3	1
2	31	2	1	1	1	1	1	12	1	1	1	1		8	9		1	1	1	1	7,03	1	1	1	3	2	3

2	29	2	1	1	1	3	2	12	1	1	1	2	3280	9	10		1	1	1	2	7,27	1	2	3	1	3	1
2	29	2	1	1	1	1	2	13	1	1	1	2	3340	9	10		1	1	1	1	7,30	1	1	1	3	3	1
2	28	1	1	1	1	4	1	11	1	1	1	2	2680	9	10		1	1	1	1	7,36	1	1	1	3	3	3
2	32	1	1	1	1	1	1	12	1	1	1	1	3090	8	9		1	1	1	1	7,38	1	1	3	3	2	3
2	33	1	1	1	1	5	1	13	1	1	1	1	3460	9	10		1	1	1	1	7,26	1	1	3	3	2	2
2	32	2	1	1	1	3	2	11	1	2	1	1	3560	9	9		1	1	1	1	7,19	1	1	1	1	3	1
2	37	1	2	1	1	1		12			2												1	1	2	3	3
2	19	2	1	1	1	3	1	12	1	1	1	1	3050	9	9		1	1	1	1	7,37	1	2	1	3	3	1
2	36	2	1	2	1	3	1	13	1	2	1	2	3500	8	9		1	1	1	1	7,52	1	1	1	3	2	3
2		2	1	1	1	1	1		1	1	1	1	4170				2	1	1	2	7,34	1	1	3	1	3	1
2	33	2	1	1	1	1	1	12	1	1	1	2	2310	9	9		1	1	1	3	7,47	1	1	1	3	3	3
2	33	2	1	1	1	5	1	13	1	1	1	1	3370	9	9		1	2	1	1	7,19	1	2	1	2	3	1
2	35	2	1	1	1	1	1	12	1	1	1	2	2855	9	9		1	1	1	2		1	1	1	3	2	3
2	38	2	1	1	1	1	1	13	1	1	1	1	3710	9	10		1	1	1	1	7,27	1	1	1	3	3	3
2	33	1	1	1	1	1	1	12	1	1	1	2	3040	9	10		1	1	1	1	7,20	1	2	1	3	2	3
2	33	2	1	1	1	4	3	13	1	1	1	2	2360	7	8		2	1	1	2	7,26	1	2	1	3	1	1
2	28	2	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1	3295	9	10		2	1	1	2	7,34	1	1	1	2	2	3
2	21	2	1	1	1	1	1	11	1	1	1	2	3520	8	89		1	1	1	1		1	2	1	3	3	3
2	18	2	1	1	1	1	1	12	1	1	1	2	2950	9	10		3	1	1	3		1	1	3	2	2	1
2	29	1	2	1	1	6	2		2	2	1	2	2810	9	9		1	1	1	3	7,17	2	2	1	3	3	3
2	34	1	1	1	1	3	1	11	1	1	1	1	3500	9	9		1	1	1	1		1	1	3	1	2	3
2	33	1	2	1	1	1	1	12	1	1	1	2	3020	9	9		1	1	1	1	7,26	1	1	3	3	1	1
2	28	1	2	1	1	1	1	13	2	1	1	1	3980	8	10		3	1	1	1	7,26	1	2	1	2	2	1
2	27	2	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1	3445	9	10		2	1	1	2	7,24	1	1	1	3	3	3
2	31	2	1	1	1	1	1		1	2	1	2	3735	9	10		1	1	1	2	7,31	1	2	1	2	2	3
2	38	2	1	1	1	3	1	13	1	1	1	2	2635	9	9		2	1	1	2	7,26	2	2	1	3	1	1
2	39	2	1	1	2	1	1	12	1	1	1	2	2570	9	9		1	1	1	2		1	2	1	3	3	1

2	33	1	2	1	1	8	1	12	1	2	1	2	3420	9	9		1	1	1	1	7,20	1	1	3	3	2	3
2	32	2	1	1	1	3	2	12	1	1	1	2	2860	8	9		2	1	1	2		1	2	1	1	3	1
2	26	2	1	1	1	1	1		1	2	1	1	3282	9	10		2	1	1	1	7,31	1	2	1	3	2	1
2	32	1	2	1	2	3	1	12	1	1	1	1	3150	9	9		1	1	1	1	7,31	1	2	1	1	3	1
2	38	1	2	1	1	2	2	13	1	1	1	2	3030	9	10		1	1	1	1	7,34	1	2	3	3	3	3
2	29	2	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1	2875	9	10		1	1	1	1	7,40	1	1	1	2	3	1
2	23	1	2	1	1	5	1	12	1	1	1	1	2350	4	6		3	1	1	1		1	1	1	3	3	3
2		2	1	1	1	1	1		1	1	1	1					2	1	1	2		1					
2	31	2	1	1	2	7	1	14	1	1	1	2	3740	9	9		2	1	1	1		1	2	1	3	1	2
2	45	1	1	1	1	5	1	14	1	1	1						1	1	1				1	1	3	3	3
2	30	1	1	1	1	3	1	13	1	1	1	2	3330	9	9		1	1	1	1		1	1	1	1	2	3
	34	2	1	2	1	3	2		1	1	1	1	3400	8	10		1	1	1	1	7,33	1	1	1	1	3	1
2	29	1	1	1	1	7	2	12	1	1	1	2	2700	9	10		1	2	1	3	7,29	1	1	1	2	2	1
2	35	1	1	2	1	5	1	11	1	1	1	1	3960	9	9		1	1	1	2		1	2	3	1	3	1
2		1	1	1	1	3	1		1	1	1	1					2	1	1	3		1					
2		1	1	1	1	5	1		1	1	1	2					1	1	1	1		2					
2	25	2	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1	3100	9	9		1	1	1	2		1	2	1	1	2	3
2		1	2	1	1	1	1		1	2	1	2					1	1	1	1		1					
2		2	1	1	1	1	1		1	1	1	1					1	1	1	2		1					
2	41	1	1	1	2	3	1	11	1	1	1	1	2270	9	9		1	1	1	1	7,24	1	2	1	3	2	3
2	24	2	1	1	1	1	1	13	1	1	1	1	3310	9	9		2	1	1	1		1	1	2	1	3	1
2		2	2	1	1	1	1	13	1	1	1	1					1	1	1	2		2					
2	28	2	2	1	2	3	1		1	1	1	2					2	1	1	1		1	2	1	2	3	1
2	24	2	1	1	1	3	2	12	1	2	1	1					1	1	2	1		1	2	1	2	3	1
2	31	2	1	1	1	4	1	13	1	1	1	2					3	1	1	1		1	1	1	3	3	3
2	29	1	1	1	1	1	2	12	1	2	1	2	4100	9	9		1	1	1	1	7,26	1	2	1	3	3	1
2	31	2	1	1	1	1	1		1	1	1	2					1	1	1	2		1	1	1	1	2	3

2		2	1	1	1	3	2		1	1	1	1				1	1	1	1		1					
2	30	1	2	1	1	1	1	12	1	2	1	2				1	1	1	1		1	2	1	1	3	1
2		2		1	1	1	2		1	1	1	1	2800	9	9		1	1	1	1		1	1	3	3	2
2	32	1	1	1	1	1	2	11	1			2	3100	9	10		1	2	2	1	7,26	1	1	1	2	1
2	36	2	1	1	1	1	1	11	1	2	1	1	2890	9	9		1	2	1	1	7,35	1	2	3	1	3
2	31	2	1	1	1	3	1	12	1	1	1	2	2550	9	9		2	1	1	1	7,33	1	1	1	3	1
2	41	2	1	1	2	1	2	13	1	2	1	2	3200	8	9		1	1	1	1	7,20	1	1	3	1	3
2	30	2	1	1	1	4	1	13	1	1		1	3000	9	10		2	1		3	7,28	1	1	1	3	1
2	37	2	1	1		1	1	9	1	2	1	1	2740	9	9			1	1			1	1	3	3	3
2	28	1	1	2	1	5	1	12	1	1	1	1	3300	9	9		1	1	1	1		1	1	1	1	3
2	29	2	1	1	1	3	2	12	1	1	1	1	2660	9	10		2	1	1	1	7,25	1	1	3	1	2
2	32	2	1	1	1	1	2	13	1	1	1	1	3282	9	9		1	1	1	2	7,36	1	1	1	2	3
2	32	2	1	1	1	3	1	14	1	2	1	2	3150	8	9		2	1	1	2		1	1	3	1	1
2	30	1	1	1	1	3		13	1	1	1	1	3030	9	9		1	2		3	7,30	1	1	1	3	2
2	30	2	1	1		1	2	13	1		1	2	2875	9	9			1	1	1		1	1	3	1	3
2	29	2	1	1	1	1	3	12	1	1	1	2	2350	9	9		2	1	1	1	7,19	1	1	1	2	3
2	35	2	1	1	1	5	2	13	1	1	1	2	3000	10	10		1	1	2	1	7,26	1	1	1	3	3
2	33	1	1	1	1	1	1	12	1	2	1	1	2980	9	9		1	1	1	1	7,36	1	1	1	3	1
2	31	2	1	1	1	1	1	12	1	2	1	1	2650	5	6		1	1	1	1	7,34	1	1	1	3	1

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Robert JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre eclampsia. *Lancet*. 2001; 357(9249):53-56.
2. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *Br Med J*. 2001; 323(7323): 1213-1217.
3. Dekker GA. Risk factors for pre eclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1999; 42(3): 422-435.
4. Page EW. The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1939; 37: 291-293.
5. Robert JM. Pre eclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol*. 2000; 24(1): 24-28.
6. Robert JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Pre eclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161(5): 1200-04.
7. Karumanchi SA, Lam C. Mécanismes impliqués dans la pré-éclampsie: progrès récents. *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker Jean Hamburger*. Flammarion Médecine Sciences. 2004; 167-176.
8. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986; 93(10): 1049-59.
9. Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br Obstet Gynaecol*. 1981; 88(9): 876-81.
10. Casper FW, Seufert RJ. Atrial natriuretic peptide (ANP) in pre eclampsia-like syndrome in a rat model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995; 103(5): 292-6.

11. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre eclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1972; 1: 177-91.
12. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277(5332): 1669-72.
13. Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol.* 1993; 4(3): 183-88.
14. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Wheelock M. Human cytotrophoblast adopts a vascular phenotype as they differentiate. ¿A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2139-151.
15. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun Sh. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre eclampsia. *Am J Pathol.* 1997; 151(6): 1809-18.
16. ZhouY, Genbacev O, Fisher SJ. The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that govern vasculogenesis or leukocyte extravasation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 995: 73-83.
17. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe pre eclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol.* 2002; 160(4): 1405-23.
18. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* 2003; 299(5605): 405-08.
19. Moffett-King A. Natural killer cell and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(9): 656-63.
20. De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975; 123(2): 164-74.

21. Roberts JM. Endothelial dysfunction in pre eclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998; 16(1): 5-15.
22. Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe pre eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172(1): 202-3.
23. Cokell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced en pre eclampsia. *Hypertension.* 1997; 30(2): 247-51.
24. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ, Clemens JD. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of pre eclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA.* 1999; 282(4): 356-62.
25. Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine.* 1981; 60(4): 267-76.
26. Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from pre eclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol.* 1992; 27(3-4): 101-8.
27. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentration of asymeric dimethylarginine in pregnant women who subsequently developed pre eclampsia. *Lancet.* 2003; 361: 1511-17.
28. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre eclampsia. *Nature.* 2000; 405(6788): 797-800.
29. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in pre eclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111(5): 649-58.

30. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20(21): 4368-80.
31. He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol.* 1999; 13(4): 537-45.
32. Kendal RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(22): 10705-9.
33. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in pre eclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111(5): 649-58.
34. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with pre eclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(5): 2348-51.
35. Polliotti BM, Fray AG, Saller DN, Mooney RA, Cox C, Miller RK. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset pre eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003; 101(6): 1266-74.
36. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188(1): 177-82.

37. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem.* 1999; 274(35): 25130-5.
38. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349(5): 427-34.
39. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A. Patients with pre eclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* 1999; 103(7): 945-52.
40. Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10(2): 82-93.
41. Dechend R, Viedt C, Muller DN. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulates NADPH oxidase. *Circulation.* 2003; 107(12): 1632-9.
42. Kang DH, Finch J, Nakawa T, Karumanchi SA, Kanellis J, Granger J, Johnson RJ. Uric acid, endothelial dysfunction, and pre eclampsia: searching for a pathogenetic link. *J Hypertens.* 2004; 22(2): 229-35.
43. Schaffer NK, Dill LV, Cadden JF. Uric acid clearance in normal pregnancy and pre eclampsia. *J Clin Invest.* 1943; 22(2): 201-6.
44. Many A, Hubel CA, Roberts JM. Hyperuricemia and xanthine oxidase in pre eclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174(1): 288-91.
45. Weerasekera DS, Peiris H. The significance of serum uric acid, creatinine and urinary microprotein levels in predicting pre eclampsia. *J Obstet Gynaecol.* 2003; 23(1): 17-19.

46. Redman CW, Bonnar J. Plasma urate changes in pre eclampsia. *Br Med J*. 1978; 1(6125): 1484-85.
47. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Kanellis J, Watanabe S, Sanchez-Lozada LG. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol*. 2003; 23(1): 2-7.
48. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, Ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for pre eclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002; 105(2): 94-113.
49. Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E. Low-dose aspirin to prevent pre eclampsia in womwn at high risk. *N Engl J Med*. 1998; 338(11): 701-5.
50. Levine RJ, Hauth JC, Curet LB, Sibai BM, Catalano PM, Morris CD. Trial of calcium to prevent pre eclampsia. *N Engl J Med*. 1997; 337(2): 69-76.
51. Rukavina D, Podak ER. Abundant perforin expression at the maternal-fetal Interface: Guarding the Semiallogenic Transplant? *Immunol Today*. 2000; 21(4): 160-163.
52. Raghupathy R. TH1-Type-immunity is incompatible with successfull pregnancy. *Immunol Today*. 1997; 18(10):478-482.
53. Rukavina D, Vince G. Roles of cytokines and Immune cells at the interfase a workshop report. *Placenta*. 2000; 21 Suppl A: S97-8.
54. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod*. 2000; 15(3): 713-8.
55. Harrison GA, Humphrey KE, Jones N, Badenhop R, Guo G, Elakis G. A genomewide linkage study of pre eclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *Am J Hum Genet*. 1997; 60(5):1158-67.

56. Sivigila. Panorama de la mortalidad materna en Colombia 1995-2000: logros, fracasos, compromisos y retos (parte II). Calendario epidemiológico. Informe Ejecutivo Semanal, Grupo de Vigilancia en Salud Pública. Semana Epidemiológica. 2001; 38.
57. Mogren I, Högberg U, Winkvist A, Stenlund H. Familial occurrence of pre eclampsia. *Epidemiology*. 1999; 10(5):518-22.
58. Oliveira KC, Bianco B, Verreshi IT, Guedes AD, Galera BB, Barbosa CP, Lipay MV. Prevalence of the Polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008; 52(8):1374-81.
59. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*, Second Edition. New York: Wiley-Liss; 1999.
60. Mc Pherson MJ, Moller SG. *PCR (The basics)*, Second editions. USA: Taylor and Francis; 2006.
61. Thornton JG, Onwude JL. Pre eclampsia: discordance among identical twins. *BMJ*. 1991; 303(6812):1241-2.
62. Walker JJ. Pre eclampsia. *Lancet*. 2000; 356(9237):1260-5.
63. Castillo González D. Síndrome HELLP. Actualización. *Rev Cubana Hematol Inmunol Med Transf*. 2006; 23(1):1-3
64. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of pre eclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 179(5):1359-75.
65. Wilson ML, Goodwin TM, Pan VL, Ingles SA. Molecular epidemiology of pre eclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2003; 58(1):39-66.
66. Abdalla S, Lothar H, El Massiery A, Qwitterer U. Increased AT (1) receptor heterodimers in pre eclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001; 7(9):1003-9.

67. Adair CD, Buckalew V, Taylor K, Ernest JM, Frye AH, Evans C, Veille JC. Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: treatment with digoxin-binding immunoglobulin. *Am J Nephrol.* 1996; 16(6): 529-31.
68. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in pre eclampsia. *Circ Res.* 2004; 95(9): 884-91.
69. Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, Smith D. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002; 359(9321): 1877-90.
70. Averina IV, Tapilskaya NI, Reznik VA, Frolova EV, Fedorova OV, Lakatta EG, Bagrov AY. Endogenous Na/K-ATPase inhibitors in patients with pre eclampsia. *Cell Mol Biol.* 2006; 52(8): 19-23.
71. Badria LF, Abu-Heija A, Zayed F, Ziadeh SM, Alchalabi H. Has consanguinity any impact on occurrence of pre eclampsia and eclampsia? *J Obstet Gynaecol.* 2001; 21(4): 358-360.
72. Barton JR, O'Brien JM, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184(5): 979-83.
73. Berends AL, Bertoli-Avella AM, de Groot CJ, van Duijn CM, Oostra BA, Steegers EA. STOX1 gene in pre eclampsia and intrauterine growth restriction. *BJOG.* 2007; 114(9): 1163-67.
74. Berends AL, De Groot CJ, Sijbrands EJ, Sie MP, Benneheij SH, Pal R, Heydanus R, Oostra BA, Van Duijn CM, Steegers EA. Shared constitutional risks for maternal vascular-related pregnancy complications and future cardiovascular disease. *Hypertension.* 2008; 51(4): 1034-41.

75. Briley AL, Poston L, Shennan AH. Vitamins C and E and the prevention of pre eclampsia. *N Engl J Med.* 2006; 355(10): 1065-66.
76. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest.* 1999; 103(12):1641-50.
77. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001; 7(5): 575-83.
78. Carr DB, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR, Critchlow CW. A sister's risk: family history as a predictor of pre eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(3): 965-72.
79. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Goncalves LF, Gomez R, Edwin S. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of pre eclampsia. Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190(6): 1541-7; discussion 1547-50.
80. Claesson-Welsh L. *Vascular endothelial growth factors*, First Edition. Berlin, Germany: Springer; 1999.
81. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod.* 1998; 59(6):1540-48.
82. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. World Health Organization systematic review of screening tests for pre eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2004; 104(6): 1367-91.

83. Craici I, Wagner S, Garovic VD. Pre eclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008; 2(4): 249-59.
84. St Jean PL, Zhang XC, Hart BK, Lamlum H, Webster MW, Steed DL, Heeney AM, Ferrell RE. Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease. *Ann Hum Genet.* 1995; 59(1): 17-24.
85. Rybakowski Janusz K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)-A mediating enzyme in cardiovascular disease, cancer and neuropsychiatric disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2009; 2009:904836.
86. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet.* 1999; 105(5):418-23.
87. Welsh P, Whincup PH, Papacosta O. Serum matrix metalloproteinase-9 and coronary heart disease: a prospective study in middle-aged men. *QJM.* 2008; 101(10):785-91.
88. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population. *PLoS ONE.* 2008; 3(3): e774.
89. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are independently associated with psychosocial factors in a middle-aged normal population. *Psychosom Med.* 2009; 71(3), 292-300.
90. Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta.* 2008; 394(1-2):72-76.

91. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; 107(12):1579-85.
92. Mizon-Gerard F, De Groote P, Lamblin N. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2004; 25(8): 688-93.
93. Konstantino Y, Nguyen TT, Wolk R, Aiello RR, Terra SG, Fryburg DA. Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease. *Biomarkers*. 2009; 14(2):118-29.
94. Söder PO, Meurman JH, Jøgerstrand T, Nowak J, Söder B. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in blood as markers for early atherosclerosis in subjects with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2009; 44(4):452-58.
95. Zhang B, Ye S, Herrmann SM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999; 99(14):1788-94.
96. Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in pre eclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem*. 2008; 41(10-11):875-80.
97. Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation*. 2007; 115(13): 1789-97.

98. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005; 330(7491): 565.
99. Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*. 2004; 2(6):315-26.
100. England LJ, Levine RJ, Qian C, Morris CD, Sibai BM, Catalano PM, Curet LB, Klebanoff MA. Smoking before pregnancy and risk of gestational hypertension and pre eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186(5): 1035-40.
101. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 358: 1129–1136, 2008.
102. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003; 111(5): 707-16.
103. Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, Varner MW. Paternal and maternal components of the predisposition to pre eclampsia. *N Engl J Med*. 2001; 344(12): 867-72.
104. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*. 1998; 140(4): 947-59.
105. Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine*. 1981; 60(4): 267-76.

106. Fu ML, Herlitz H, Schulze W, Wallukat G, Micke P, Eftekhari P, Sjogren KG, Hjalmarson A, Muller-Esterl W, Hoebeke J. Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J Hypertens.* 2000; 18(7): 945-53.
107. Gonen R, Shahar R, Grimpel YI, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, Gibor Y. Placental protein 13 as an early marker for pre eclampsia: a prospective longitudinal study. *BJOG.* 2008; 115(12): 1465-72.
108. Granger JP, LaMarca BB, Cockrell K, Sedeek M, Balzi C, Chandler D, Bennett W. Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. *Methods Mol Med.* 2006; 122: 383-392.
109. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal/maternal interface. *Nat Med.* 2006; 12(9): 1065-74.
110. Hertig A, Berkane N, Lefevre G, Toumi K, Marti HP, Capeau J, Uzan S, Rondeau E. Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of pre eclampsia. *Clin Chem.* 2004; 50(9):1702-03.
111. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of pre eclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 2004; 200(8): 957-65.
112. Hinchey J, Chaves C, Appignani B, Breen J, Pao L, Wang A, Pessin MS, Lamy C, Mas JL, Caplan LR. A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *N Engl J Med.* 1996; 334(8): 494-500.

113. Hirtenlehner K, Pollheimer J, Lichtenberger C, Wolschek MF, Zeisler H, Husslein P, Knöfler M. Elevated serum concentrations of the angiogenesis inhibitor endostatin in preeclamptic women. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10(7): 412-17.
114. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in pre eclampsia. *Circ Res.* 2002; 90(12): 1274-81.
115. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre eclampsia: population based cohort study. *BMJ.* 2001; 323(7323): 1213-17.
116. Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature.* 2008; 453(7198): 1117-21.
117. Karumanchi SA, Epstein FH. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of pre eclampsia? *Kidney Int.* 2007; 71(10): 959-961.
118. Karumanchi SA, Lindheimer MD. Pre eclampsia pathogenesis: "triple a rating"-autoantibodies and antiangiogenic factors. *Hypertension.* 2008; 51(4): 991-92.
119. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(22): 10705-9.
120. Khans F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom pre eclampsia develops. *Hypertension.* 2005; 46(5): 1123-28.

121. Kivinen K, Peterson H, Hiltunen L, Laivuori H, Heino S, Tiala I, Knuutila S, Rasi V, Kere J. Evaluation of STOX1 as a pre eclampsia candidate gene in a population-wide sample. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15(4): 494-97.
122. Klonooff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF. An epidemiologic study of contraception and pre eclampsia. *JAMA.* 1989; 262(22): 3143-47.
123. Lafayette RA, Druzin M, Sibley R, Derby G, Malik T, Huie P, Polhemus C, Deen WM, Myers BD. Nature of glomerular dysfunction in pre eclampsia. *Kidney Int.* 1998; 54(4): 1240-49.
124. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of pre eclampsia. *Hypertension.* 2005; 46(5): 1077-85.
125. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in pre eclampsia. *N Engl J Med.* 2006; 355(10): 992-1005.
126. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of pre eclampsia. *N Engl J Med.* 2004; 350(7): 672-83.
127. Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, Blink AL, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Urinary placental growth factor and risk of pre eclampsia. *JAMA.* 2005; 293(1):77-85.
128. Li Z, Zhang Y, Ying Ma J, Kapoun AM, Shao Q, Kerr I, Lam A, O'Young G, Sannajust F, Stathis P, Schreiner G, Karumanchi SA, Protter AA, Pollitt NS. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of pre eclampsia. *Hypertension.* 2007; 50(4): 686-92.

129. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM. Fetal and maternal contributions to risk of pre eclampsia: population based study. *BMJ*. 1998; 316(7141): 1343-47.
130. Lindheimer MD, Taler SJ, Cunningham FG. Hypertension in pregnancy. *J Am Soc Hypertens*. 2008; 2(6): 484-94.
131. Liston WA, Kilpatrick DC. Is genetic susceptibility to pre-eclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus? *Br J Obstet Gynaecol*. 1991; 98(11): 1079-86.
132. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compernelle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002; 8(8): 831-40.
133. Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol*. 2006; 168(2): 639-48.
134. Maharaj AS, Walshe TE, Saint-Geniez M, Venkatesha S, Maldonado AE, Himes NC, Matharu KS, Karumanchi SA, D'Amore PA. VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J Exp Med*. 2008; 205(2): 491-501.
135. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, Waugh R, McKenzie P, Kirwan P, Hennessy A. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int*. 2007; 71(10): 977-84.
136. Andersen S, Skorpen F. Variation in the COMT gene: implications for pain perception and pain treatment. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(4): 669-84.

137. Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Eriksson E. Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism*. 2008; 57(5):708-11.
138. Azzam A, Mathews CA. Meta-analysis of the association between the catecholamine-O-methyl-transferase gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003; 123B (1):64-69.
139. Banerjee S, Randeve H, Chambers AE. Mouse models for pre eclampsia: disruption of redox-regulated signaling. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7:4.
140. Barchiesi F, Jackson EK, Fingerle J, Gillespie DG, Odermatt B, Dubey RK. 2-Methoxyestradiol, an estradiol metabolite, inhibits neointima formation and smooth muscle cell growth via double blockade of the cell cycle. *Circ Res*. 2006; 99(3): 266-74.
141. Barnea ER, MacLusky NJ, DeCherney AH, Naftolin F. Catechol-O-methyltransferase activity in the human term placenta. *Am J Perinatol*. 1988; 5(2): 121-27.
142. Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ, O'Donovan MC. A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. *Am J Hum Genet*. 2003; 73(1):152-61.
143. Broughton Pipkin F. What is the place of genetics in the pathogenesis of pre eclampsia? *Biol Neonate*. 1999; 76(6):325-30.
144. Casey ML, MacDonald PC. Characterization of catechol-O-methyltransferase activity in human uterine decidua vera tissue. *Am J Obstet Gynecol*. 1983; 145(4): 453-57.
145. Chappell S, Morgan L. Searching for genetic clues to the causes of pre eclampsia. *Clin Sci*. 2006; 110(4): 443-58.

146. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet.* 2004; 75(5): 807-21.
147. Ciaccio M, Bellia C. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk: effect of vitamin supplementation in risk reduction. *Curr Clin Pharmacol.* 2010; 5(1): 30-36.
148. Consortium GOPEC. Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre eclampsia: a British multicenter candidate-gene study. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(1): 127-31.
149. Creveling CR. Reduced COMT activity as a possible environmental risk factor for breast cancer. *Neurotox Res.* 2003; 5(7): 473-74.
150. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(1): 135-43.
151. Dubey RK, Imthurn B, Jackson EK. 2-Methoxyestradiol: a potential treatment for multiple proliferative disorders. *Endocrinology.* 2007; 148(9): 4125-27.
152. Dubey RK, Jackson EK. Potential vascular actions of 2-methoxyestradiol. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(8): 374-79.
153. Eriksson AL, Skrtic S, Niklason A, Hulten LM, Wiklund O, Hedner T, Ohlsson C. Association between the low activity genotype of catechol-O-methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population. *Eur Heart J.* 2004; 25(5):386-91.

154. Fenstad MH, Johnson MP, Loset M, Mundal SB, Roten LT, Eide IP, Bjorge L, Sande RK, Johansson AK, Dyer TD. STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from preeclamptic women: data from the Second Nord-Trondelag Health Study. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16(12): 960-68.
155. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature.* 1994; 368(6468): 237-39.
156. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002; 296(5576):2225-29.
157. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels with the severity of pre eclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy.* 2009; 28(2): 190-200.
158. Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Holmen J, Zwart JA. High systolic blood pressure is associated with Val/Val genotype in the catechol-O-methyltransferase gene. The Nord-Trondelag Health Study (HUNT). *Am J Hypertens.* 2007; 20(1): 21-26.
159. Hagen K, Stovner LJ, Skorpen F, Pettersen E, Zwart JA. The impact of the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism on survival in the general population-the HUNT study. *BMC Med Genet.* 2007; 8:34.
160. Halleland H, Lundervold AJ, Halmoy A, Haavik J, Johansson S. Association between catechol-O-methyltransferase (COMT) haplotypes and severity of hyperactivity symptoms in adults. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009; 150B (3): 403-10.

161. Happonen P, Voutilainen S, Tuomainen TP, Salonen JT. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism modifies the effect of coffee intake on incidence of acute coronary events. *PLoS ONE*. 2006; 1:e117.
162. Harirah H, Thota C, Wentz MJ, Zaman W, Al-Hendy A. Elevated expression of catechol-O-methyltransferase is associated with labor and increased prostaglandin E(2) production by human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 201(5): 496.e1-7.
163. Hintsanen M, Elovainio M, Puttonen S, Kivimaki M, Lehtimaki T, Kahonen M, Juonala M, Rontu R, Viikari JS, Raitakari OT. Val/Met polymorphism of the COMT gene moderates the association between job strain and early atherosclerosis in young men. *J Occup Environ Med*. 2008; 50(6): 649-57.
164. Kanasaki K, Kalluri R. The biology of pre eclampsia. *Kidney Int*. 2009; 76(8): 831-37.
165. Lalouel JM, Rohrwasser A. Power and replication in case-control studies. *Am J Hypertens*. 2002; 15(2): 201-5.
166. LaVallee TM, Zhan XH, Johnson MS, Herbstritt CJ, Swartz G, Williams MS, Hembrough WA, Green SJ, Pribluda VS. 2-methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway. *Cancer Res*. 2003; 63(2): 468-75.
167. Lee SB, Wong AP, Kanasaki K, Xu Y, Shenoy VK, McElrath TF, Whitesides GM, Kalluri R. Pre eclampsia: 2-methoxyestradiol induces cytotrophoblast invasion and vascular development specifically under hypoxic conditions. *Am J Pathol*. 2010; 176(2): 710-20.
168. Lim JH, Kim SY, Kim DJ, Park SY, Han HW, Han JY, Lee SW, Yang JH, Ryu HM. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450c17 in pre eclampsia. *Pharmacogenet Genomics*. 2010; 20(10): 605-10.

169. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*. 1995; 34(13): 4202-10.
170. Magnussen EB, Vatten LJ, Smith GD, Romundstad PR. Hypertensive disorders in pregnancy and subsequently measured cardiovascular risk factors. *Obstet Gynecol*. 2009; 114(5): 961-70.
171. Mignini LE, Latthe PM, Villar J, Kilby MD, Carroli G, Khan KS. Mapping the theories of pre eclampsia: the role of homocysteine. *Obstet Gynecol*. 2005; 105(2): 411-25.
172. Moses EK, Fitzpatrick E, Freed KA, Dyer TD, Forrest S, Elliott K, Johnson MP, Blangero J, Brennecke SP. Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre eclampsia on 2q22. *Mol Hum Reprod*. 2006; 12(8): 505-12.
173. Moses EK, Johnson MP, Tommerdal L, Forsmo S, Curran JE, Abraham LJ, Charlesworth JC, Brennecke SP, Blangero J, Austgulen R. Genetic association of pre eclampsia to the inflammatory response gene SEPS1. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198(3):336.e1-5.
174. Mütze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and the pre eclampsia syndrome. *J Perinat Med*. 2008; 36(1): 38-58.
175. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 2006; 314(5807):1930-33.
176. Nackley AG, Shabalina SA, Lambert JE, Conrad MS, Gibson DG, Spiridonov AN, Satterfield SK, Diatchenko L. Low enzymatic activity haplotypes of the human catechol-O-methyltransferase gene: enrichment for marker SNPs. *PLoS ONE*. 2009; 4(4): e5237.

177. Nejatizadeh A, Stobdan T, Malhotra N, Pasha MA. The Genetic aspects of pre eclampsia: achievements and limitations. *Biochem Genet.* 2008; 46(7-8):451-79.
178. Ntaios G, Savopoulos C, Grekas D, Hatzitolios A. The controversial role of B- vitamins in cardiovascular risk: An update. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009; 102(12): 847-54.
179. Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Pre eclampsia and fetal growth. *Obstet Gynecol.* 2000; 96(6): 950-55.
180. Prasad SE, Howley S, Murphy KC. Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev.* 2008; 14(1): 26-34.
181. Rakvag TT, Ross JR, Sato H, Skorpen F, Kaasa S, Klepstad P. Genetic variation in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and morphine requirements in cancer patients with pain. *Mol Pain.* 2008; 4: 64.
182. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta.* 1999; 20(7): 519-29.
183. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre eclampsia. *Lancet.* 2001; 357(9249): 53-56.
184. Saftlas AF, Olson DR, Franks AL, Atrash HK, Pokras R. Epidemiology of pre eclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 163(2): 460-65.
185. Salonen Ros H, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S. Genetic effects on the liability of developing pre eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet.* 2000; 91(4): 256-60.
186. Sanchez SE, Zhang C, Rene Malinow M, Ware-Jauregui S, Larrabure G, Williams MA. Plasma folate, vitamin B (12), and homocyst(e)ine concentrations in preeclamptic and normotensive Peruvian women. *Am J Epidemiol.* 2001; 153(5): 474-80.

187. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8(5): 588-94.
188. Shenoy V, Kanasaki K, Kalluri R. Pre eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21(9): 529-36.
189. Shibata K, Diatchenko L, Zaykin DV. Haplotype associations with quantitative traits in the presence of complex multilocus and heterogeneous effects. *Genet Epidemiol.* 2009; 33(1): 63-78.
190. Sibai BM, Mercer B, Sarinoglu C. Severe pre eclampsia in the second trimester: recurrence risk and long-term prognosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165(5): 1408-12.
191. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(4): 978-89.
192. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(5): 1162-69.
193. Terwilliger JD, Goring HH. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol.* 2000; 72(1): 63-132.
194. Tunbridge EM, Lane TA, Harrison PJ. Expression of multiple catechol-o-methyltransferase (COMT) mRNA variants in human brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007; 144B (6): 834-39.
195. Voutilainen S, Tuomainen TP, Korhonen M, Mursu J, Virtanen JK, Happonen P, Alfthan G, Erlund I, North KE, Mosher MJ. Functional COMT Val158Met polymorphism, risk of acute coronary events and serum homocysteine: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *PLoS ONE.* 2007; 2(1): e181.
196. Woo JM, Yoon KS, Yu BH. Catechol-O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder. *Am J Psychiatry.* 2002; 159(10): 1785-87.

197. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, Koeppe RA, Stohler CS, Goldman D. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*. 2003; 299(5610) 1240-43.
198. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, Ishizaki M, Asano G, Sugisaki Y, Yamanaka N. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2001; 159(2): 599-608.
199. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA. Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol*. 2007; 24(4): 257-66.
200. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in pre eclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111(5): 649-58.
201. McKeeman GC, Ardill JE, Caldwell CM, Hunter AJ, McClure N. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have pre eclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191(14): 1240-46.
202. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, Van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994; 101(8): 669-74.
203. Muehlenbachs A, Fried M, Lachowitz J, Mutabingwa TK, Duffy PE. Natural selection of FLT1 alleles and their association with malaria resistance in utero. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(38): 14488-91.

204. Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of pre eclampsia. *Endocrinology*. 2004; 145(11): 4838-45.
205. Nisell H, Lintu H, Lunell NO, Mollerstrom G, Pettersson E. Blood pressure and renal function seven years after pregnancy complicated by hypertension. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995; 102(11): 876-81.
206. North RA, Ferrier C, Long D, Townend K, Kincaid-Smith P. Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of pre eclampsia and fetal growth retardation. *Obstet Gynecol*. 1994; 83(3): 378-86.
207. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, Henninger DD, Janjic N, Floege J. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest*. 1999; 104(7): 913-23.
208. Ozcan C, Wong SJ, Hari P. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and bevacizumab. *N Engl J Med*. 2006; 354(9): 980-82.
209. Palmer SK, Moore LG, Young D, Cregger B, Berman JC, Zamudio S. Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased pre eclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180(5): 1161-68.
210. Park CW, Park JS, Shim SS, Jun JK, Yoon BH, Romero R. An elevated maternal plasma, but not amniotic fluid, soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) at the time of mid-trimester genetic amniocentesis is a risk factor for pre eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193(3): 984-89.

211. Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre eclampsia (VIP trial): randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006; 367(9517): 1145-54.
212. Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*. 2004; 25(10): 763-69.
213. Ray JG, Vermeulen MJ, Schull MJ, Redelmeier DA. Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. *Lancet*. 2005; 366(9499): 1797-803.
214. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding pre eclampsia. *Science*. 2005; 308(5728): 1592-94.
215. Redman CW, Sargent IL. Pre eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response: a review. *Placenta*. 2003; 24 Suppl A: S21-27.
216. Roberts JM. Objective evidence of endothelial dysfunction in pre eclampsia. *Am J Kidney Dis*. 1999; 33(5): 992-97.
217. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Pre eclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161(5): 1200-04.
218. Rumbold AR, Crowther CA, Haslam RR, Dekker GA, Robinson JS. Vitamins C and E and the risks of pre eclampsia and perinatal complications. *N Engl J Med*. 2006; 354(17): 1796-806.
219. Salafia CM, Pezzullo JC, Ghidini A, Lopez-Zeno JA, Whittington SS. Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm pre eclampsia. *Placenta*. 1998; 19(1): 67-72.
220. Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre eclampsia. *J Reprod Immunol*. 2003; 59(2): 153-60.

221. Schwartz RB, Feske SK, Polak JF, DeGirolami U, Iaia A, Beckner KM, Bravo SM, Klufas RA, Chai RY, Repke JT. Pre eclampsia-eclampsia: clinical and neuroradiographic correlates and insights into the pathogenesis of hypertensive encephalopathy. *Radiology*. 2000; 217(2): 371-76.
222. Sela S, Itin A, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Yagel S, Keshet E. A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and pre eclampsia. *Circ Res*. 2008; 102(12): 1566-74.
223. Sharma JB, Kumar A, Kumar A, Malhotra M, Arora R, Prasad S, Batra S. Effect of lycopene on pre eclampsia and intra-uterine growth retardation in primigravidas. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003; 81(3): 257-62.
224. Shembrey MA, Noble AD. An instructive case of abdominal pregnancy. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*. 1995; 35(2): 220-21.
225. Sibai BM. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet Gynecol*. 2005; 105(2): 402-10.
226. Sikkema JM, Van Rijn BB, Franx A, Bruinse HW, De Roos R, Stroes ES, Van Faassen EE. Placental superoxide is increased in pre eclampsia. *Placenta*. 2001; 22(4): 304-08.
227. Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. The interval between pregnancies and the risk of pre eclampsia. *N Engl J Med*. 2002; 346(1): 33-38.
228. Smith GN, Walker MC, Liu A, Wen SW, Swansburg M, Ramshaw H, White RR, Roddy M, Hladunewich M. A history of pre eclampsia identifies women who have underlying cardiovascular risk factors. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 200(1): 58.e1-8.

229. Strevens H, Wide-Swensson D, Hansen A, Horn T, Ingemarsson I, Larsen S, Willner J, Olsen S. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre eclampsia. *BJOG*. 2003; 110(9): 831-36.
230. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem*. 2003; 278(15): 12605-08.
231. Tubbergen P, Lachmeijer AM, Althuisius SM, Vlak ME, Van Geijn HP, Dekker GA. Change in paternity: a risk factor for pre eclampsia in multiparous women? *J Reprod Immunol*. 1999; 45(1): 81-88.
232. Tuffnell DJ, Jankowicz D, Lindow SW, Lyons G, Mason GC, Russell IF, Walker JJ. Outcomes of severe pre eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG*. 2005; 112(7): 875-80.
233. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of pre eclampsia. *Nat Med*. 2006; 12(6): 642-49.
234. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Skjaerven R, Iversen BM. Pre eclampsia and the risk of endstage renal disease. *N Engl J Med*. 2008; 359(8): 800-09.
235. Von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of pre eclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003; 22(2): 143-48.
236. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with pre eclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*. 1999; 103(7): 945-52.

237. Walsh SW. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in pre eclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998; 16(1): 93-104.
238. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ 2nd. Placental isoprostane is significantly increased in pre eclampsia. *FASEB J.* 2000; 14(10): 1289-96.
239. Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, Norman RJ, Chan A, Dekker GA. Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre eclampsia. *Lancet.* 2002; 359(9307): 673-74.
240. Wang Y, Walsh SW. Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and preeclamptic placentas. *J Soc Gynecol Investig.* 1996; 3(4):179-184.
241. Wang Y, Walsh SW. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta.* 2001; 22(2-3): 206-12.
242. Wathen KA, Tuutti E, Stenman UH, Alfthan H, Halmesmaki E, Finne P, Ylikorkala O, Vuorela P. Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in pre eclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(1): 180-84.
243. Waugh J, Bell SC, Kilby MD, Lambert P, Shennan A, Halligan A. Urine protein estimation in hypertensive pregnancy: which thresholds and laboratory assay best predict clinical outcome? *Hypertens Pregnancy.* 2005; 24(3): 291-302.
244. Wilson ML, Goodwin TM, Pan VL, Ingles SA. Molecular epidemiology of pre eclampsia. *Obstet Gynecol Surv.* 2003; 58(1): 39-66.
245. Wimalasundera RC, Larbalestier N, Smith JH, de Ruiter A, Mc G TSA, Hughes AD, Poulter N, Regan L, Taylor GP. Pre eclampsia, antiretroviral therapy, and immune reconstitution. *Lancet.* 2002; 360(9340): 1152-54.

246. Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10(2): 82-93.
247. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of pre eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169(5): 1316-20.
248. Zhang J, Villar J, Sun W, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Mathai M, Ali M, Yu KF, Zavaleta N, Purwar M, Nguyen TN, Campodonico L, Landoulsi S, Lindheimer M, Carroli G. Blood pressure dynamics during pregnancy and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197(2): 162.e1-6.
249. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med.* 2008; 14(8): 855-62.
250. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Pre eclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2152-64.
251. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2139-51.
252. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe pre eclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol.* 2002; 160(4): 1405-23.

253. Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49(2): 186-193.
254. Stone JL, Lockwood CJ. Risk factor for severe pre eclampsia. *Obstet Gynecol.* 1994; 83(3): 357-61.
255. Gil E, Cataño LO, Ochoa G, Jubiz A, Torres Y. Mortalidad Materna y Factores de Riesgo; Estudio de Casos y Controles. Area Metropolitana de Medellín. Octubre 1 de 1988 a Septiembre 1.989. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 1992; 43(3):187-93.
256. Caritis S, Siabi B, Hauth J, Lindheimer M. Predictors of pre eclampsia in women at highrisk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-FetalMedicine Units. *Am J Obstet Gynecol.*1998; 179(4): 946-51.
257. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, Paul RH. Risk factors for pre eclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172(2): 642-48
258. National High Blood Pressure Education Program. Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. 2.000
259. Zhang J, Zeisler J, Hatch M, Berkowitz G. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev.* 1997; 19(2): 218-32
260. Lim KH, Friedman SA. Hypertension in pregnancy. *Curr Opin in Obstet Gynecol.* 1993; 5(1): 40-9.
261. Feeney JG, Tovey LA, Scott JS. Influence of previous blood-transfusionon incidence of pre eclampsia. *Lancet.* 1977; 1(8017): 874-75.

262. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*. 2003; 55(2):63-79.
263. Laivouri H. Italian study that found women with blood type AB were three times as likely to develop pre eclampsia as were women with other blood types. *J Hum Hypertens*. 1995; 9(2): 623-25.
264. Trogstad L, Magnus P, Moffett A, Stoltenberg C. The effect of recurrent miscarriage and infertility on the risk of pre eclampsia. *BJOG*. 2009; 116 (1): 108-13.
265. Trogstad L, Magnus P, Skjærven R, Stoltenberg C. Previous abortions and risk of pre eclampsia. *Int J Epidemiol*. 2008; 37(6):1333-40.
266. Magnussen EB, Vatten LJ, Lund-Nilsen TI, Salvesen KA, Davey Smith G, Romundstad PR. Prepregnancy cardiovascular risk factors as predictors of pre eclampsia: population based cohort study. *BMJ*. 2007; 335(7627):978.
267. Matsumoto M, Weickert CS, Beltaifa S, Kolachana B, Chen J, Hyde TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Catechol-O-methyltransferase (COMT) mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2003; 28(8) 1521-30.
268. Männistö P, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1999; 51(4):593-628.
269. Braver TS, Barch DM, Cohen JD. Cognition and control in schizophrenia: a computational model of dopamine and prefrontal function. *Biol Psychiatry*. 1999; 46(3):312-28.

270. Hviid TV Sorensen S, Morling N. Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol.* 1999; 60(12): 1237-44.
271. Voutilainen S, Virtanen J, Rissanen T, Alfthan G, Laukkanen J. Serum folate, plasma homocysteine and incidence of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(2): 317-23.
272. Voutilainen S, Tuomainen TP, Korhonen M, Mursu J, Virtanen JK. Functional COMT Val158Met Polymorphism, Risk of Acute Coronary Events and Serum Homocysteine: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *PLoS ONE.* 2007; 2(1):e181.
273. Zhu BT. On the mechanism of homocysteine pathophysiology and pathogenesis: a unifying hypothesis. *Histol Histopathol.* 2002; 17(4):1283-91.
274. Eriksson AL, Skrtic S, Niklason A, Mattsson Hulthe´n L, Wiklund O. Association between the low activity genotype of catechol-O-methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population. *Eur Heart J.* 2004; 25(5): 386-91.
275. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999; 99(14):1788-94.

276. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, Crow MT. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res.* 1994; 75(1):41-54.
277. Newby AC, Southgate KM, Davies M. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol.* 1994; 89 Suppl 1:59-70.
278. Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis.* 1991; 87(1):87-90.
279. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993; 69(5): 377-81.
280. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 94(6): 2493-503.
281. Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity. *Atherosclerosis.* 1997; 130(1-2):61-70.
282. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(2):197-250.

283. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase: divergent regulation of expression for the 92-and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem.* 1991; 266(25):16485-90.
284. Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 1997; 70(6):722-26.
285. Palei AC, Sandrim VC, Duarte G, Cavalli RC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 genotypes and haplotypes in pre eclampsia and gestational hypertension. *Clin Chim Acta.* 2010; 411(11-12):874-77.
286. Coolman M, De Maat M, Van Heerde WL, Felida L, Schoormans S, Steegers EA, Bertina RM, De Groot CJ. Matrix metalloproteinase-9 gene 1562C/T polymorphism mitigates pre eclampsia. *Placenta.* 2007; 28(7):709-13.
287. Fraser R, Walker JJ, Ekbote UV, Martin KL, McShane P, Orsi NM. Interleukin- 4-590 (C>T), toll-like receptor-2+2258 (G>A) and matrix metalloproteinase- 9-1562 (C>T) polymorphisms in pre eclampsia. *BJOG.* 2008; 115(8):1052-56.
288. Papageorghiou AT, Yu CH, Erasmus IE, Cuckle HS, Nicolaides KH. Assessment of risk for the development of pre eclampsia by maternal characteristics and uterine artery Doppler. *BJOG.* 2005; 112(6); 703-9.
289. Cooper GM, Sidow A. Genomic regulatory regions: insights from comparative sequence analysis. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13(6):604-10.
290. Drake JA, Bird C, Nemesh J, Thomas DJ, Newton-Cheh C, Reymond A. Conserved noncoding sequences are selectively constrained and not mutation cold spots. *Nat Genet.* 2006; 38(2):223-27.

291. King MC, Wilson AC. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science*. 1975; 188(4184):107-16.
292. Zusterzeel PL, Peters WH, De Bruyn MA, Knapen MF, Merkus HM, Steegers EA. Glutathione Stransferase isoenzymes in decidua and placenta of preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1999; 94(6): 1033-38.
293. Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis*. 1999; 17(2):177-81.
294. Pacheco J. Inmunología de la implantación. *Ginecol Obstet*. 1999; 45 (1):14-22.
295. Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Matos MC, Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens Pregnancy*. 2001; 20(3): 269-81.
296. Schneider S, Feerkesen N, Maul H, Roehring S, Fisher B, Hoeft B. Risk groups and maternal-neonatal complication of pre eclampsia. Current results from national German Perinatal Quality Registry. *J Perinat Med*. 2011; 39(3):257-65.
297. Lydakis C, Beevers M, Beevers DG, Lip GY. The prevalence of pre eclampsia and obstetric outcome in pregnancies of normotensive and hypertensive women attending a hospital specialist clinic. *Int J Clin Pract*. 2001; 55(6):361-67.
298. Mesa Restrepo C. Factores de riesgo para la Pre eclampsia Severa y Temprana en el Hospital General de Medellín 1999-2000. *Rev Ces Med*. 2001; 15(1):23-30.
299. Stone JL, Lockwood C, Berkowitz GS, Alvarez M, Lapinski R, Berkowitz RL. Risk factor for severe pre eclampsia. *Obst Gynecol*. 1994; 83(3): 357-61.
300. Zhang J, Zeisler J, Hatch MC, Berkowitz G. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev*. 1997; 19(2):218-32.

301. Caritis S, Siabi B, Hauth J, Lindheimer M. Predictors of pre eclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.*1998; 179(4): 946-51
302. Donadi EA. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association.*Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(3): 369-95.
303. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, De Albuquerque RS, Muniz YC, Simoes RT, Carosella ED, Moreau P, Donadi EA. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun.* 2010; 11(2):134-41.
304. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics.* 2003; 55(2):63-79.
305. Alvarez M, Piedade J, Balseiro S, Ribas G, Regateiro F. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. *Int J Immunogenet.* 2009; 36(6):361-66.
306. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2002; 250(2):358-73.
307. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta.* 2002; 23(1): 3-19.
308. Hiby SE, King A, Sharkey A, Loke YW. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in pre implantation embryo. *Tissue Antigens.* 1999; 53(1): 1-13.
309. Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14-bp deletion in HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens.* 2004; 64(6):706-10.

310. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: Aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(3):209-32.
311. Rebmann V, Van der Ven K, Pässler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*. 2001; 57(1):15-21.
312. Yie SM, Taylor RN, Librach C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicates the development of pre eclampsia later in pregnancy. *Am J Gynecol*. 2005; 193(1):204-08.
313. Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JA. Immunogenetics of pregnancy: role of 14-bp deletion in maternal HLA-G gene in primiparous preeclamptic Brazilian women. *Hum Immunol*. 2007; 68(8): 668-74.
314. Sánchez S. Epidemiología de la Pre eclampsia. *Rev Per Ginecol Obstet*. 2006; 52(4):213-18.
315. Avena J. Pre eclampsia Eclampsia. *Rev Posgrado Via Cát Med*. 2007; 165(1)15-20.
316. Xiao R, Sorensen TK, Williams MA, Luthy DA. Influence of pre eclampsia on fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2003; 13(3):157-62.
317. Barron WM, Marshall DL. Hypertension: in medical disorders during pregnancy. St. Louis: Mosby; 1995.
318. Levy MT, Jacober SJ, Sowers JR. Hypertensive disorders of pregnancy in southwestern NavajoIndians. *Arch Intern Med*. 1994; 154(19):2181-83.
319. Högberg U, Innala E, Sandstrom A. Maternal mortality in Sweden, 1980-1988. *Obstet Gynecol*. 1994; 84(2):240-44.
320. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of pre eclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 179(5):1359-75.
321. O'Brien M. Analysis of the role of HLA-G in pre eclampsia. *Hum Immunol*. 2000; 61(11):1126-31.

322. Saftlas AF. Immunogenetics determinants of pre eclampsia and related pregnancy disorders: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2005; 106(1):162-72.
323. Guariglia D, Herrera JL. Hipertensión inducida por el embarazo. Caracas: Disinlimed editores; 2001.
324. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre eclampsia. *Obstet Gynecol Ann.* 1972; 1:177-91.
325. Madazli R, Budak E, Calay Z, Aksu MF. Correlation between placental bed biopsy findings, vascular cell adhesion molecule and fibronectin levels in pre-eclampsia. *BJOG.* 2000; 107(4):514-18
326. Zeeman GG, Dekkere GA. Pathogenesis of pre eclampsia: A hypothesis. *Clin Obstet Gynecol.* 1992; 35(2):317-37.
327. Roberts JM, Hubel CA. Oxidative stress in pre eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190(5):1177-78.
328. Perry KG Jr, Martin JN Jr. Abnormal hemostasis and coagulopathy in pre eclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 1992; 35(2):338-50.
329. Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165(6):1711-16.
330. Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol-O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem.* 1994; 223(3):1049-59.
331. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels with the severity of pre eclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy.* 2009; 28(2):190-200.
332. Secondi MV. Hiperhomocisteinemia y Pre eclampsia: una combinación con grave riesgo vascular. *Rev Hosp Matern Infant Ramon Sarda.* 2001; 20(4): 152-155.

333. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8):827-39.
334. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5(8): 2145-154.
335. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(9): 657-72.
336. Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion are dependent upon integrin expression on human cytotrophoblasts. *Hum Reprod.* 1995; 10(3):734-42.
337. Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H. Importance of metalloproteinases (MMP) in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy.* 1995; 1(4): 263-69.
338. Huisman Ma, Timmer A, Zeinstra M, Serlier EK, Hanemaaijer R, Goor HV, Erwich JJHM. Matrix-metalloproteinase activity in first trimesterplacental bed biopsies infurther complicated and uncomplicated pregnancies. *Placenta.* 2004; 25(4): 253-58.
339. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14(2):163-76.
340. Plaisier EA. MT3-MMP in Endometrial Angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(11):5828-36.
341. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre eclampsia at antenatal booking: systematic review on controlled studies. *BMJ.* 2005; 330(7491):565.
342. Osungbade KO, Ige OK. Public health perspectives of pre eclampsia in developing countries: Implication for Health System Strengthening. *J Pregnancy.* 2011; 2011(481095):6.

343. Romanowicz L, Galewska Z, Jaworski S. Pre eclampsia (EPH-gestosis)-induced decrease of MMP-s content in the umbilical cord artery. *Clin Chim Acta*. 2003; 335(1-2):109-15.
344. Hill JA, Medin CG, Johnson PM. Immunohistochemical studies of human uteroplacental tissues from first trimester spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173(1): 90-6.
345. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre eclampsia. *Nature*. 2000; 405(6788):797-800.
346. Zygmunt M, Herr F, Münsted K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 110 Suppl 1:S10-8
347. Gibson G, Muse S. *A Primer of Genome Science*, 2nd Edition. North Caroline State: Sinauer Associates Inc; 2004.
348. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics. *Hum Genomics*. 2009; 4(2):69-72.
349. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein Lincoln D, Marth G, Sherry S, Mullikin JC. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001; 409 (6822): 928-33.
350. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(6):355-60.
351. Olive DM, Bean P. Principles and Applications of methods for DNA-base typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(6):1661-69.

352. Clayton D. Handbook of statistical genetics. West Sussex: Wiley; 2001.
353. Kiberstis P, Roberts L. The puzzle of complex diseases. *Science*. 2002; 296(1): 685-703.
354. Schulze T, McMahon F. Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet*. 2002; 114(1): 1-11.
355. Pelias MZ, Markward N. The Human Genome Project and Public Perception: Truth and Consequences. *Emory Law J*. 2000; 49(3):837-58.
356. Declaración de Helsinki Guías y recomendaciones. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá*. 1998; XVII (1).
357. Protocolo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Trastornos hipertensivos del embarazo. SEGO. 2006.
358. NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays, 3rd Edition. Pennsylvania, USA: Wayne; 1998.
359. Schneider S, Freerksen N, Maul H, Roehrig S, Fischer B, Hoeft B. Risk groups and maternal-neonatal complications of pre eclampsia Current results from the national German Perinatal Quality Registry. *J Perinat Med*. 2011; 39(3):257-65.
360. Comino R, Bartha JL, Barahona M. Repercusión de la hipertensión sobre peso fetal y parámetros clínicos. *Clin Invest Gynec Obstet*. 1995; 22(1):22-8.
361. Comino C. Estados hipertensivos del embarazo. Documentos de consenso de la SEGO. 1998; 508.
362. Osungbade KO, Ige OK. Public health perspectives of pre eclampsia in developing countries: Implication for Health System Strengthening. *J Pregnancy*. 2011; 2011(481095): 6.

363. Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Matos MC, Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens Pregnancy*. 2001; 20(3):269-81.
364. Lydakis C. The prevalence of pre eclampsia and obstetric outcome in pregnancies of normotensive and hypertensive women attending a hospital specialist clinic. *Int J Clin Practice*. 2001, 55(6):361-7.
365. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(9): 657-72.
366. Freije JMP, Diez-Itza I, Balbín M. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*. 1994; 269(24):16766-73.
367. Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Engild JJ, Salvesen G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans*. 1991; 19(3): 715-18.
368. Egeblad M, Zena W. New functions of the matrix metalloproteases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(3):161-74.
369. Lijnen HR. Matrix metalloprotease and the cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry*. 2002; 67(3):107-15.
370. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279(2):G245-49.
371. Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*. 2000; 13(1):20-33.
372. Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase: partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 250(3):459-77.

373. Homberger A. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8(9):725-9.
374. Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9(1):75-79.
375. Maenaka K, Jones EY. MHC superfamily structure and the immune system. *Curr Opin Struct Biol.* 1999; 9(6):745-53.
376. Natarajan K, Li H, Mariuzza RA, Margulies DH. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet.* 1999; 1(1):32-46.
377. O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev.* 1998; 163:129-38.
378. Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. *Epidemiología clínica. Ciencia básica para la medicina clínica*, 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 1994.
379. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiología clínica*, 2ª ed. Barcelona: Masson, Williams & Wilkins; 1998.
380. Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Bioestadística Médica*, 2ª ed. México: Editorial Manual Moderno; 1996.
381. Milton JS, Tsokos JO. *Estadística para biología y ciencias de la salud*. Madrid: Interamericana McGraw Hill; 2001.
382. Martín Andrés A, Luna del Castillo JD. *Bioestadística para las ciencias de la salud*, 4ª ed. Madrid: Norma; 1993.
383. Emerson JD, Colditz GA. Use of statistical analysis in the *New England Journal of Medicine*. *N Engl J Med.* 1983; 309(12): 709-13.
384. Goldin J, Zhu W, Sayre JW. A review of the statistical analysis used in papers published in *Clinical Radiology* and *British Journal of Radiology*. *Clin Radiol.* 1996; 51(1): 47-50.

385. Mora R, Ascaso C, Sentis K. Utilización de los análisis estadísticos en los artículos originales de Revista Clínica Española (1992-1993). *Rev Clin Esp.* 1995; 195(5):298-301.
386. Fernández Aparicio T, Minana López B, Guzmán Martínez Vallas P, Hita Villaplana G. Uso de los análisis estadísticos en los artículos originales de Actas Urológicas Españolas: Accesibilidad para el lector. *Actas Urol Esp.* 2003; 27(2): 103-09.
387. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine a primer. *N Engl J Med.* 2002; 347(19):1512-20.
388. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(5):391-97.
389. Schaid DJ. Biostatistical genetics and genetic epidemiology; Disease-marker association. Chichester: Wiley; 2002.
390. Clayton D. Handbook of statistical genetics; Population association. Chichester: Wiley; 2001.
391. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol.* 1995; 12(5):921-27.
392. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J R Stat Soc Ser B.* 1997; 39:1-38.
393. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(4):978-89.
394. Clayton D, Chapman J, Cooper J. Use of unphased multilocus genotype data in indirect association studies. *Genet Epidemiol.* 2004; 27(4):415-28.
395. Cordell HJ, Clayton DG. A unified stepwise regression procedure for evaluating the relative effects of polymorphisms within a gene using case/control or family data: application to HLA in type 1 diabetes. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(1): 124-41.

396. Elston RC. Introduction and overview. *Statistical methods in genetic epidemiology*. *Stat Methods Med Res*. 2000; 9(6):527-41.
397. D'Aubeterre López, ME. Material didáctico: Análisis de datos; Análisis no paramétricos: capítulo 19. Facultad de Ciencias Políticas y Sociología; Departamento de sociología IV- UCM.
398. Pulst SM. Genetic Linkage Analysis. *Arch Neurol*. 1999; 56(6):667-72.
399. Feingold E. Methods for linkage analysis of quantitative trait loci in humans. *Theor Popul Biol*. 2001; 60(3):167-80.
400. Sevilla S. Metodología de los estudios de asociación genética. *Rev Insuf Cardíaca*. 2007; 2(3):111-14.
401. Neale BM. *Statistical Genetics: Gene mapping through linkage and association*. London: Taylor & Francis Group; 2008.
402. Wilson ML, Goodwin TM, Pan VL, Ingles SA. Molecular Epidemiology of pre eclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2003; 58(1):39-66.
403. Pridjian G, Puschett JB. Pree clampsia part 2: Experimental and genetics considerations. *Obstet Gynecol Surv*. 2002; 57(9):619-40.
404. Altmüller J, Parmer LJ, Fisher G, Sherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: True linkage is hard to find. *Am J Hum Genet*. 2001; 69(5):936-50.
405. Haines JL, Pericak-Vance MA. *Approaches to gene mapping in complex human diseases*. New York: Wiley-Liss; 1998.
406. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Pre eclampsia: The Role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology*. 2009; 24:147-58.
407. NHLBI. Report of the Working Group on Reserach on Hypertension during Pregnancy: National Heart, Lung, and Blood Institute. <http://www.nhlbi.nih.gov/>. 2001.
408. Reece AE, Hobbins J. *Obstetricia Clínica*, Tercera edición. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2002.

409. Norwitz ER, Shust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1400-08.
410. Zuluaga N, Cuartas JM, Londoño J. Genética de la preeclampsia: una aproximación a los estudios de ligamiento genético. *Inst Nac Salud Colom Biomed.* 2004; 24(2): 207-25.
411. Goldman-Whol D, Ariel I, Greenfield C, Hanoch J, Yagel S. HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6(6): 535-40.
412. Kovats S. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990; 248(4952):220-23.
413. Moscoso J, Serrano-Vela JI, Pacheco R, Arnaiz-Villena A. HLA-G, -E and -F: allelism, function and evolution. *Transpl Immunol.* 2006; 17(1):61-64.
414. Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol.* 1994; 153(12):5516-24.
415. Humphrey KE, Harrison GA, Cooper DW, Wilton AN, Brennecke SP, Trudinger BJ. HLA-G deletion polymorphism and pre-eclampsia/eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995; 102(9):707-10.
416. Lin A, Yan WH, Dai MZ, Chen XJ, Li BL, Chen BG, Fan LA. Maternal human leukocyte antigen-G polymorphism is not associated with pre eclampsia in a Chinese Han population. *Tissue Antigens.* 2006; 68(4):311-16.
417. Joh TH, Hwang O. Dopamine beta-hydroxylase: biochemistry and molecular biology. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 493:342-50.
418. Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol.* 2000; 13 (1): 20-33.
419. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274 (31): 21491- 94.
420. O'Brien KD. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1993; 92(2): 945-51.
421. Aubuchon M, Pre eclampsia: animal model for a human cure. *PNAS.* 2011;108 (4):1197-198.
422. Kliman HJ, Feinberg RF. Trophoblast differentiation. The first twelve weeks of gestation. New York: Springer-Verlag; 1992.
423. Meisser A, Cohen M, Bischof P. Concentrations of circulating gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) are dependent on the conditions of blood collection. *Clin chem.* 2005; 51(1): 274-76.
424. Cohen M, Bischof P. Factors regulating trophoblast invasion. *Gynecol Obstet Invest.* 2007; 64(3): 126-30.
425. Cohen M, Meisser A, Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta.* 2006; 27(8): 783-93.
426. Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12(4): 225-32.
427. Hunt J, Petroff M, McIntire R, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 2005; 19(7):681-93.
428. Moreau P, Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella E, Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol.* 1999; 11(5): 803-11.

429. Kapasi K, Albert SE, Yie SM, Zavasava N, Librach C. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology*. 2000; 101(2):191-200.
430. Podjarny E, Losonczy G, Baylis C. Animal models of pre eclampsia. *Semin Nephrol*. 2004; 24(6): 596-606.
431. <http://www.unavarra.es/geneticapoblaciones/geneticapoblaciones.htm>.
432. Iversen AC, Nguyen OT, Tommerdarl LF, Eide IP, Landsem VM, Acar N, Mynhre R, Klungland H, Austgulen R. The HLA- G 14bp gene polymorphism and decidual HLA- G 14bp gene expression in preeclamptic and normal pregnancies. *J Reprod Immunol*. 2008; 78(2):158-65.
433. Anselem O, Girard G, Stepanian A, Azria E, Mandelbrot L. Influence of ethnicity on the clinical and biologic expression of pre-eclampsia in the ECLAXIR study. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011; 115(2): 153-6.
434. Roten LT, Fenstad MH, Forsmo S, Johnson MP, Moses EK, Austgulen R, Skorpen F. A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2). *Mol Hum Reprod*. 2011; 17(7): 439-46.
435. Aggarwal S, Dimri N, Tandon I, Agarwal S. Preeclampsia in North Indian women: the contribution of genetic polymorphisms. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011; 37(10): 1335-41.
436. Nagy B, Hupuczi P, Papp Z. High frequency of methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype in Hungarian HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR. *J Hum Hypertens*. 2007; 21(2); 154-8.
437. Jääskeläinen E, Keski-Nisula L, Toivonen S, Romppanen EL, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. MTHFR C677T polymorphism is not associated with placental abruption or preeclampsia in Finnish women. *Hypertens Pregnancy*. 2006; 25(2): 73-80.
438. Driul L, Damante G, D'Elia A, Springolo F, Ianni A, Di Leonardo C, Angelini M, Marchesoni D. Screening for pre-eclampsia in a low-risk population at 24 weeks: uterine artery Doppler flow velocimetry and genetic variants of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase. *Minerva Ginecol*. 2004; 56(5): 385-90.
439. Pérez-Mutul J, González-Herrera L, Sosa-Cabrera T, Martínez-Olivares R. A mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with preeclampsia in women of southeast Mexico. *Arch Med Res*. 2004;35(3): 231-4.
440. Pegoraro RJ, Chikosi A, Rom L, Roberts C, Moodley J. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in black South Africans and the association with preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004; 83(5): 449-54.
441. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. Association of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens*. 2004; 22(9): 1655-62.
442. Hill LD, York TP, Kusanovic JP, Gomez R, Eaves LJ, Romero R, Strauss JF 3rd. Epistasis between COMT and MTHFR in maternal-fetal dyads increases risk for preeclampsia. *PLoS One*. 2011; 6(1); e16681.
443. Mendes-Junior CT, Castelli EC, Simões RT, Simões AL, Donadi EA. HLA-G 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. *Tissue Antigens*. 2007; 69(3): 255-60.

444. Larsen MH, Hyleneius S, Andersen AM, Hviid TV. The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: revisited. *Tissue Antigens*. 2010; 75(3): 253-61.
445. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB*. 1999; 13: 781-792.



Imágenes tomadas de:

[http://i.bssl.es/unomasenlafamilia/2009/02/bebe\\_adn.jpg](http://i.bssl.es/unomasenlafamilia/2009/02/bebe_adn.jpg)

<http://www.mancia.org/foro/attachments/articulos/20812d1374870273-genetica-bebe-perfecto-otra-exageracion-medios-baby-dna.jpeg>





