

11262
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**COMPARACION DE LAS CONCENTRACIONES DE
RECEPTORES DE ESTROGENOS EN PLACENTAS Y DE
ESTRADIOL SERICO EN LA PREECLAMPSIA SEVERA
CON RESPECTO A EMBARAZOS SIN ALTERACIONES*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A

CARLOS MIGUEL SALAZAR JUAREZ

TUTOR: M. en C. JUAN CARLOS MARTINEZ CHEQUER

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN MEDICINA REPRODUCTIVA
HOSPITAL DE GINECOOBSTETRICIA "LUIS CASTELAZO AYALA"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL



MÉXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Gracias :

A Dios por darme la vida y la oportunidad de haber concluido una meta más en mi carrera profesional.

A mi padre Carlos por los principios inflexibles que han guiado mi vida.

A mi madre Rosario por enseñarme el respeto y amor por los demás.

A ambos por su comprensión, apoyo y fé en mí.

A el Dr. Juan Carlos Martínez Chequer por su paciencia y generosidad en la enseñanza.

Pero sobre todo por su amistad que sin ella éste trabajo probablemente no existiría.

A mi esposa Evangelina por su paciencia y apoyo moral durante todo este tiempo de arduo trabajo.

A mis hijas Lizbeth y María Fernanda, que significan el motivo para esforzarme cada día más en mi carrera..

A mi hermano Alberto, por sus aportaciones siempre puntuales y acertadas en referencia a este trabajo. Además del claro ejemplo de lo que debe ser un investigador.

A todo mi jurado, por sus aportaciones ya que gracias a sus comentarios y críticas pudo lograrse un enriquecimiento del trabajo.

A todos aquellos que directa o indirectamente estuvieron involucrados en el desarrollo de éste trabajo.

A el IMSS por facilitar el tiempo requerido para la realización de este trabajo.

A CONACYT por las facilidades otorgadas a través de la beca 137785

A mi abuela Victoria *in memoria*

***1er lugar en la Bienal del HGO #4 "Luis Castelazo Ayala" 2002. México,DF.**

El que no es capaz de soñar, jamás realizará sus sueños

HERÁCLITO

Bónum libro lactíficat cor hóminis

ANONIMO

(loc.lat. el buen libro alegra el corazón del hombre)

De omni re scibile

ANONIMO

(loc.lat. de todo cuanto es posible saber)

INDICE

Resumen	6
Antecedentes	8
Planteamiento del problema	15
Hipótesis	16
Objetivo	17
Material y métodos	18
Resultados	22
Discusión	23
Conclusiones	27
Bibliografía	28
Tablas y gráficas	34
Anexos	38

RESUMEN

A los estrógenos se les ha encontrado una acción reguladora del crecimiento, diferenciación y funcionamiento de diversos tejidos blanco tanto dentro como fuera del aparato reproductor, entre los que se incluye el endotelio vascular. En este tejido los estrógenos promueven muy particularmente un mecanismo consistente en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes, denominado angiogénesis. Los efectos ocasionados por los estrógenos son posibles a través de las acciones que ejercen sobre sus receptores. En la preeclampsia se encuentra un defecto en la angiogénesis consistente en una invasión incompleta del trofoblasto hacia las arterias espirales, sin embargo se desconoce la concentración de receptores de estrógenos en la placenta y de estradiol sérico así como la correlación entre ambos en esta entidad, por lo que el objetivo del presente estudio fue comparar la concentración de receptores de estrógenos en placentas y de estradiol sérico entre mujeres con preeclampsia severa y mujeres con embarazos sin alteraciones. Con tal motivo se desarrolló un estudio observacional, prospectivo, transversal y comparativo, que consistió en un muestreo no aleatorio de casos consecutivos. Se formaron dos grupos, uno con preeclampsia severa (n=16) y otro con embarazos sin alteraciones (n=18); se seleccionaron de acuerdo a la edad cronológica y gestacional e interrupción por cesárea. El tamaño de la muestra se obtuvo por medio de un estudio piloto y una fórmula para comparación de medias. El estradiol sérico materno se midió bajo la técnica de radioinmunoanálisis. Para la medición de receptores de estrógenos en placenta, se empleó el método de radioligando y carbón cubierto con dextrans. La cuantificación de proteínas se efectuó con el método de Lowry. La variabilidad intraensayo fue de .97 (coeficiente correlación intraclase) y la variabilidad interensayo fue de .80 (coeficiente kappa).

La concentración de receptores de estrógenos obtenida en las placentas de embarazos con preeclampsia severa y sin alteraciones fue de $1.31 \pm .50$ y $3.22 \pm .53$ femtomoles/mg proteína, respectivamente ($p < 0.003$). Las concentraciones de estradiol sérico fueron $4\ 906 \pm 640$ y $7\ 202 \pm 447$ pg/ml respectivamente ($p < 0.009$). No se encontró correlación entre la concentración de receptores de estrógenos en la placenta y la concentración de estradiol sérico materno. En conclusión, por primera vez se midieron los receptores de estrógenos en

placentas provenientes de mujeres que desarrollaron preeclampsia severa. Las concentraciones de receptores de estrógenos y de estradiol sérico fueron menores en las embarazadas que presentaron preeclampsia severa en comparación con las que cursaron con embarazos sin complicaciones.

La disminución de las concentraciones de receptores de estrógenos probablemente sea secundaria a una mala regulación ó a una ausencia en la expresión del receptor. Presentando una menor activación de la vía genómica y/o no genómica y la subsecuentemente disminución en la producción de sustancias bioactivas, que condicionan una mala invasión, diferenciación celular, proliferación celular, angiogénesis ó vasculogenesis.

ANTECEDENTES

El embarazo induce diversas modificaciones sobre el organismo materno entre las que destacan las anatómicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, con la finalidad de proteger a la madre de los riesgos impuestos por el mismo y el parto, así como también para facilitar la transferencia de gases y nutrientes hacia el feto, todo ello es posible gracias a la presencia y participación de la placenta (1).

A pesar de su naturaleza transitoria, la placenta actúa como un órgano endocrino productor de una enorme variedad de sustancias: hormonas esteroideas, glucoproteínas, polipéptidos, péptidos similares a los factores liberadores de hormonas, péptidos opioides, factores de crecimiento tisular y muchas más, constituyendo la principal fuente fetal de precursores metabólicos.

Durante su desarrollo la placenta presenta diferenciación, invasividad y proliferación celular (2-4) en respuesta a la acción de sustancias bioactivas como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento-1 similar a la insulina (IGF-1), factor de transformación del crecimiento alfa (TGF α), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), moléculas de adhesión y sus receptores, quienes mediante mecanismos endocrinos, paracrinos/autocrinos y neurales fomentan la producción de otras hormonas placentarias como la hormona gonadotropina coriónica (hCG), el lactógeno placentario (hPL), esteroides y prostaglandinas (5). A su vez, dichas sustancias bioactivas son reguladas por la acción de los estrógenos (6).

La invasividad celular de la placenta se manifiesta durante las primeras 2 semanas posteriores a la fecundación, culminando con la formación del citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto (7-9). Al mismo tiempo, diferenciaciones en el mesodermo conforman una enorme red de conductos venosos arterio-capilares denominados vellosidades que cuentan con una circulación interna determinada por el corazón del feto y una circulación externa que depende de la madre (10). Esta red queda establecida a los 20 días posfecundación y su posterior desarrollo incluye la invasión del citotrofoblasto por el sincitiotrofoblasto. El desarrollo normal de las arterias uteroplacentarias depende de dos tipos de invasión extratrofoblástica, el primero ocurre con la invasión de la decidua y el miometrio por el trofoblasto del estroma lo que origina las células gigantes del lecho

placentario (11), y el segundo cuando el trofoblasto endovascular emigra hacia las arterias espirales y las transforma en uteroplacentarias. Esta última se lleva a cabo en dos "ondas": la primera concluye a la 10ª semana de gestación y la segunda inicia entre las 14 y 16 para finalizar cuatro semanas después (12). Durante la segunda migración trofoblástica se produce una dilatación de las arterias espirales, lo que permite la transformación de un sistema de alta resistencia a uno de baja resistencia cuya finalidad es facilitar el máximo intercambio de nutrimentos y gases entre la madre y el feto (13). No obstante en algunos padecimientos como la *preeclampsia* se encuentra una *limitada invasión del trofoblasto* dentro de la porción miometrial de las arterias espirales lo que condiciona una mala adaptación vascular uteroplacentaria y por consiguiente una falla en el desarrollo adaptativo de la placenta (14). Esta grave complicación del embarazo se describe histológicamente con degeneración sincicial, congestión de los espacios intervellosos, degeneración y trombosis de las arteriolas de la decidua e infartos rojos (15). Tales lesiones son consecuencia de la disminución en el flujo sanguíneo proveniente de la madre y su intensidad depende del tiempo de ocurrencia, duración y gravedad de las manifestaciones clínicas. Es un síndrome específico del embarazo y constituye una de las principales causas de mortalidad materna y perinatal (16) afectando del 3-5% de todos los embarazos (17). En México su frecuencia oscila alrededor del 8% (18) y representa una tasa de muerte materna de 13.3 por 100 000 nacidos vivos (19), lo que equivale a una frecuencia del 36% de la mortalidad materna. El 45% de los casos se presenta entre las 28 y 36 semanas de gestación y el 40% entre las 37 semanas y el puerperio.

Clínicamente se manifiesta de dos maneras: una leve y otra severa. Las diferencias entre ambas están bien establecidas y se cuenta con normas específicas para su diagnóstico que han sido elaboradas por Comités Internacionales (20). El diagnóstico de la *preeclampsia* leve comúnmente puede ser erróneo tanto en mujeres multiparas como en primíparas ya que con frecuencia tiende a comportarse de una forma parecida al embarazo normal lo que no permite apreciar la mayor parte de las alteraciones descritas en dicha enfermedad, por tal razón muchos trabajos que se han realizado en pacientes con *preeclampsia* leve han aportado conclusiones erróneas (21). Luego entonces, la *preeclampsia* severa se considera un evento más representativo de las alteraciones de dicha complicación del embarazo.

A pesar de que el trofoblasto es un "sine qua non" del padecimiento -ya que este desaparece al extraerse la placenta- y de que se conocen factores de riesgo para su presentación como son: nutricionales, inmunes, genéticos y endocrinos, la etiología de la preeclampsia no está totalmente aclarada. El diagnóstico se realiza al encontrarse un incremento en la tensión arterial sanguínea y proteinuria (17), sin embargo la fisiopatología es mucho más que un incremento de la presión sanguínea y alteraciones del funcionamiento renal, ya que virtualmente existe una disminución de la perfusión en todos los órganos como consecuencia del intenso vasoespasmio secundario al incremento de la sensibilidad de la vasculatura a los diferentes agentes presores. Concomitantemente, la activación de la cascada de la coagulación a expensas de alteraciones plaquetarias origina la formación de microtrombos. Adicionalmente se encuentra una disminución en el volumen plasmático como consecuencia de la pérdida de líquidos del espacio intravascular, lo que condiciona un flujo sanguíneo comprometido hacia los órganos. Dichos eventos en conjunto comprometen aún más la deteriorada perfusión y generan la variedad e intensidad de los datos clínicos (17). De tal forma que algunas alteraciones en la compleja red de sistemas de regulación placentaria pueden ocasionar serios desórdenes en la gestación y frecuentemente son promovidas y regidas por los esteroides, entre otras sustancias (22). Dentro de los esteroides se incluyen a los estrógenos que son hormonas lipofílicas de las que existen tres tipos en el organismo humano: el 17β estradiol (el más potente), la estrona y el estriol (23). La relación existente entre preeclampsia y estrógenos ha sido pobremente estudiada pese a que existen evidencias suficientes de la importante participación de estos en los procesos de *diferenciación celular, angiogénesis y embarazo*.

Los estrógenos son sintetizados principalmente en los ovarios, tejido adiposo, piel, tejido óseo, músculo esquelético, folículo piloso y la placenta. Durante el embarazo comienzan a elevar sus concentraciones desde la implantación del embrión hasta el nacimiento, ignorándose aún el significado biológico para la madre y el feto de dicho incremento (24). Participan importantemente en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, pero actúan también en otros sitios del organismo como el hígado, hueso, cerebro y *vasos sanguíneos*, intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas y en la regulación de genes vasodilatadores (PGI_2 , NO_3), factores de crecimiento (VEGF, TGF α , IGF-II), receptores

para IGF-1 y EGF e incremento de la respuesta inmune humoral entre otras funciones (25-27).

Su actividad biológica está en relación directa con su biodisponibilidad plasmática, fijación a las proteínas plasmáticas, metabolismo, tasa de depuración tisular, afinidad de fijación al receptor de estrógenos, capacidad de translocación del receptor al núcleo, duración de la retención por el receptor en el núcleo y regeneración del receptor citosólico.

Los mensajes químicos incorporados en las hormonas con la finalidad de coordinar la actividad de diversos órganos y tejidos, son transportados a través de la sangre hasta los órganos blanco donde actúan. Estos órganos se caracterizan por tener proteínas llamadas receptores que captan a las hormonas en forma específica y con gran afinidad. Cuando los receptores son ocupados por su ligando, desencadenan procesos celulares que generan respuestas biológicas de duración variable y generalmente son más prolongadas que las desencadenadas por los impulsos nerviosos (28).

Las respuestas a las hormonas pueden clasificarse en genómicas y no genómicas (extragenómicas) dependiendo del mecanismo que utilicen (29). Las primeras incluyen acciones sobre el DNA que ocasionan cambios transcripcionales y modifican la tasa de producción de proteínas específicas: enzimas y proteínas estructurales p. ej. factores de crecimiento celular. Las respuestas genómicas generalmente se presentan con periodos de latencia largos (minutos, horas, días) e igualmente pueden modificar el funcionamiento de los tejidos afectados por periodos prolongados (30). Por otra parte, las acciones no genómicas son de breve latencia y se realizan por medio de interacciones con receptores membranales que generan segundos mensajeros: AMPc, GMPc, Ca^{++} o algunos receptores a neurotransmisores (31). Estos a su vez pueden modificar procesos membranales como la apertura de canales iónicos, o actuar directamente sobre el genoma. Este mecanismo es usado principalmente por hormonas protéicas o aminor biogénicas, que no penetran fácilmente a la célula. Los esteroides (estrógenos) pueden ocasionalmente participar sobre ambos mecanismos (32).

Particularmente, la vía genómica comienza con la entrada del estrógeno a la célula por difusión pasiva, cruza la membrana celular y se dirige al citoplasma o núcleo para unirse con su receptor (33). El receptor es un adaptador molecular con suficiente complejidad química que es capaz de reconocerlo al unirse con especificidad y alta afinidad a él mismo

en las células blanco (34), tiene más de 140 Kb y cuenta con 8 exones (35). Estructuralmente presenta cinco dominios: A/B, C, D, E y F (36). La región más constante y con mayor actividad en toda la familia es la C ya que une al receptor con el DNA. Entre la región C y D se encuentra el mecanismo de señalamiento de localización nuclear. La región D es como una bisagra entre la C y la E. La región E es relativamente larga y cuenta con varias funciones siendo la más importante la de unir al estrógeno, las otras son: transactivación dependiente del ligando, interfase de dimerización, interacción con la proteína de choque térmico-90 y una señal de localización nuclear. La región F no aparece en todos los receptores de la familia y su función es desconocida. La región A/B tiene un factor de transactivación independiente del estrógeno y su longitud y secuencia varía entre los diversos receptores. La estabilidad de la región C está dada por dos dedos de zinc y los aminoácidos que determinan la especificidad al DNA se encuentran en la P-box de la región C terminal del primer dedo de zinc (37). La transactivación se lleva a través de un factor independiente del ligando (AF-1) localizado en el dominio A/B. Todos ellos sin la presencia del estrógeno permanecen inactivos. Cuando el receptor no tiene ligando se encuentra en conjunto con proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsp56) (38) que actúan como chaperonas, manteniendo al receptor en una forma inactiva a la transcripción permitiendo su conformación competente y su actividad sobre la unión al DNA. Una vez que se une el estrógeno se liberan las proteínas de choque térmico y en forma de heterodímeros (39) se unen a secuencias específicas del DNA llamadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE), localizados en las regiones promotoras o "enhancers" de los genes blanco (40). Los ERE son dos secuencias palindrómicas separadas por tres nucleótidos que dan inicio a la expresión de diferentes genes, todos ellos *regulados por los estrógenos*. Una vez que el heterodímero se une al ERE se inicia directa o indirectamente la transcripción.

La vía no genómica se lleva a cabo a través de un receptor de membrana, fue descrita por primera vez en el sistema nervioso al observarse cambios en la fisiología de los nervios en cuestión de segundos a minutos. (41). Se consideraba que era el único sistema con esta vía de respuesta hormonal sin embargo, ahora se sabe que también ejerce sus efectos a nivel del sistema vascular (42). La secuencia en este funcionamiento es que el esteroide al unirse al receptor de membrana, activa una serie de señales intracelulares tales como el AMPc/PKA,

IP3/Ca²⁺, liberación de Ca²⁺ de sus reservas intracelulares, reducción del flujo de Ca²⁺ a través de los canales de membrana sensitivos al voltaje y proteínas asociadas a microtúbulos-cinasas (MAP) (41).

Por mucho tiempo se pensó que solo existía un solo tipo de receptor (α) pero en 1996 se reportó una isoforma diferente a la que se llamó receptor β (43). Los receptores β predominan en el hueso, glándula mamaria, pulmón, tracto digestivo (colon) y los sistemas: inmune, cardiovascular, urogenital (riñón) y nervioso. Los receptores α se encuentran en útero, hígado, ovario, endometrio y mama.(44). No obstante, pueden coexistir en un mismo tejido como es el caso de la glándula mamaria y el sistema nervioso central, curiosamente también pueden encontrarse en una misma célula en forma de heterodímeros.(44). A pesar que su estructura es similar, ya que el dominio de unión al DNA demuestra un 96% de homología, y el dominio de unión al ligando (estrogeno) guarda un 58% de homología.(45), la diferente distribución de ambos receptores en los tejidos hace pensar que existe una distinta propiedad biológica para cada uno.(44). Con base a estos hallazgos, es que se afirma que los estrógenos presentan diversos fenómenos biológicos que dirigen, regulan, controlan y modulan la expresión genética de una célula a través de procesos de crecimiento, proliferación, diferenciación e invasividad que se presentan en sus órganos blanco (46).Se ha descrito la presencia de receptores de estrógenos en el aparato reproductor y en la placenta (47), y recientemente se han identificado ambas isoformas mediante el empleo de técnicas de biología molecular (48)

Los receptores de estrógenos ofrecen una afinidad mucho mayor -millones de veces- que la de las proteínas del plasma. Por ello las concentraciones plasmáticas -aún siendo muy escasas- pueden dar efectos biológicos importantes (49).

La existencia de receptores de estrógenos en la placenta se ha estudiado desde hace tiempo reportándose su presencia a través de diferentes técnicas de laboratorio y en diferentes modelos biológicos (50, 51); se han encontrado en el citosol ó núcleo (52, 53) aunque en otras ocasiones no ha sido posible su aislamiento (54). En primates se demostró que la placenta es un tejido blanco a los estrógenos a través de sus receptores, regulan la diferenciación funcional del sincitiotrofoblasto (55) y coordinan el desarrollo de la placenta y los sistemas endocrinos fundamentales para el mantenimiento del neonato (56).

Se ha reportado la disminución en la concentración de los receptores de estrógenos en algunas entidades obstétricas como el embarazo prolongado que se caracteriza por la presencia de una placenta pequeña y disfuncional (57), lo que resulta muy similar a lo observado en la preeclampsia severa. Mientras que en embarazos donde hay una proliferación desmesurada de la placenta como es el caso del embarazo molar no se apreció la presencia de receptores para progesterona sino solo para estrógenos (58).

Estos hallazgos sugieren que el desarrollo de la placenta puede estar relacionado con el número de receptores de estrógenos y que en la preeclampsia severa pudiera existir una disminución en el número de receptores de estrógenos similar a la reportada en el embarazo prolongado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las hormonas intervienen en el desarrollo, proliferación y diferenciación celular en diversos tejidos incluyendo a la placenta. La placenta es considerada como un órgano endocrino puesto que secreta diversas hormonas entre las que destacan los estrógenos. Estos tienen un papel regulador en el crecimiento, diferenciación y funcionamiento celular a través de la interacción con sus receptores. La disminución en el número de receptores se ha encontrado asociada con alteraciones en el trofoblasto. En la preeclampsia se encuentra un desarrollo alterado del trofoblasto, por lo que se genera la siguiente cuestión:

¿La concentración de receptores de estrógenos en la placenta y las concentraciones de estradiol en el suero sanguíneo son menores en las pacientes con preeclampsia severa en comparación con aquellas que cursan con embarazos sin alteraciones?

HIPOTESIS

Las mujeres que desarrollan preeclampsia severa tienen una menor concentración de receptores de estrógenos placentarios y una menor concentración sérica de estradiol, comparados con las de mujeres cuyos embarazos cursan sin alteraciones.

OBJETIVO

Comparar las concentraciones de receptores de estrógenos placentarios y de estradiol sérico provenientes de mujeres que presentan preeclampsia severa con respecto a las de pacientes con embarazos sin alteraciones.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva y en los Servicios de Preeclampsia, Terapia Intensiva y Unidad Tocoquirúrgica del hospital de Gineco-obstetricia "Luis Castelazo Ayala" del IMSS. Durante el periodo comprendido entre Marzo de 1999 a Febrero del 2001.

El protocolo de estudio fue autorizado por el Comité Local de Investigación del hospital.

Se compararon un grupo de estudio constituido por 16 pacientes que cursaron con preeclampsia severa y un grupo testigo de 18 pacientes que tuvieron embarazos normales.

El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a una fórmula de diferencia de medias (59), realizándose previamente un estudio piloto para el conocimiento de las concentraciones de receptores de estrógenos en placentas de mujeres con preeclampsia severa y en aquellas con embarazos sin alteraciones. Teniendo para los receptores una σ^2 .91 y δ 5.07; para el estradiol una σ^2 .163 y una δ 3 726, siendo la constante de 7.849
Sustituyendo: $2 \frac{\sigma^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{\delta^2}$

δ^2

Resultando 0.50 sujetos para los receptores y 2.67 sujetos para el estradiol

Criterios de inclusión

Grupo de estudio

1. Preeclampsia severa
2. Edad comprendida entre 18 y 30 años
3. Embarazos mayores a 36 semanas
4. Interrupción del embarazo por cesárea

Grupo testigo

1. Embarazos sin alteraciones
2. Puntos 2,3,4 similares a los del grupo problema

Criterios de no inclusión

1. Hipertensión crónica
2. Enfermedades de la colágena, renales ó metabólicas
3. Eclampsia
4. Síndrome de hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y trombocitopenia (HELLP)
5. Pacientes sin control prenatal

6. Embarazo múltiple

Criterios de eliminación

1. Corioamnionitis
2. Acretismo placentario
3. Desprendimiento prematuro de placenta normoinsera

Criterios Operativos

Preeclampsia severa

Se consideró preeclampsia severa cuando hubo una tensión arterial de 160/110 mmHg o mayor, persistentes en dos tomas realizadas con un intervalo de 6 horas. Proteinuria 2 g/litro en orina de 24 horas y edema acentuado.

Receptores de estrógenos placentarios

Se consideró como receptor de estrógeno placentario a la molécula peptídica obtenida del resultado del análisis de las células del trofoblasto y que bajo la técnica de radioligando se expresó en femtomoles por miligramo de proteína.

Metodología

Con la paciente en quirófano y previo al inicio de la operación cesárea, se le tomaron 10 ml de sangre de la vena antecubital del brazo contralateral al que contenía la venoclisis. Se centrifugó y el suero obtenido se congeló a -20°C , hasta la determinación del estradiol mediante radioinmunoanálisis utilizando estuches comerciales Cis Bio International. La especificidad del análisis fue del 100%, la sensibilidad del 95% y los coeficientes de variación del 3.5 y 4% (60).

Inmediatamente después del alumbramiento se tomó una muestra de tejido placentario y se colocó en solución fisiológica a 4°C , posteriormente se guardó la muestra con nitrógeno líquido a -70°C hasta la determinación de los receptores de estrógenos (61).

Obtención de receptores de estrógenos

A 4° C se disecó el tejido de la placa basal separando los vasos del trofoblasto. A 2 gr del tejido obtenido se fragmentó finamente y se le agregó amortiguador TED [(Tris-hidroxi-metil-amino-metanol-HCl 10mM, etilen-diamino-tetracetato sódico (EDTA) 1mM, ditioneitol (DTT) 1mM] y Molibdato de Na 10mM, a un pH de 8. Se homogenizó en un politrón (Tissumizer-Tekmar), aplicándose 4 pulsos de 20 segundos con reposo de 5 segundos. El homogenado pasó a una ultracentrifuga refrigerada Beckman L8-80 a 100 000 g por 30 minutos. Del sobrenadante se tomaron alícuotas para la determinación de receptores de estrógenos (anexo 1).

Medición de receptores

Bajo la técnica de radioligando y carbón cubierto con dextrán usando estradiol-3H: (2,3,6,7H) actividad específica (85 - 110 Ci/nmol de Amersham International) a concentraciones de .25-1 nM; la unión inespecífica se determinó adicionando 200 veces la concentración de Dietil-etilbestrol (DES) [Sigma Chemical Company].

La consistencia de la medición fue realizada a través de un coeficiente de correlación intraclass (variación intraobservador) el cual fue igual a .97 (p <.001). Para la validez (variación interobservador) se usó el coeficiente kappa que resultó igual a .85.

Medición de proteínas

Bajo la técnica de Lowry se realizó en primer término una curva de estandarización con base de albúmina a diferentes concentraciones. Posteriormente se colocaron 5 µl de la muestra en un tubo de ensayo y se leyó con un espectrofotómetro a 550 nm de D.O. Del resultado obtenido bajo conversiones aritméticas se obtuvieron los miligramos proteínas. (anexo 2).

Saturación de los receptores de estrógenos

Debido a la característica específica del receptor para discriminar las señales verdaderas de las que no lo son, a través de un fenómeno fisicoquímico dependiente de fuerzas de Van der Waals, uniones de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, se encontró la concentración de la hormona libre que se utilizó para las mediciones de receptores de

estrógenos placentarios. Al estandarizar la técnica se encontró el punto de saturación para el 100% de los receptores (fig.1).

Determinación de la afinidad de la unión hormona-receptor

Para determinar la afinidad de la unión de la hormona y el receptor, así como la concentración total de los sitios de unión, se utilizó el diagrama de Scatchard, puesto que describe a la constante de disociación (Kd). Para la obtención de Kd se realizó un análisis de regresión ($y=mx+b$), a partir de los datos de las hormonas unidas y libres, donde "y" representa la relación hormona unida/libre. La afinidad del receptor se localiza sobre la pendiente (m) y la concentración total del receptor se encuentra en el intercepto de la pendiente sobre "x". La pendiente negativa nos explica que a mayor saturación de receptores se observa una pérdida del equilibrio de la relación unido/libre, así, cuando "x" se encuentra en su extremo máximo, "y" se encuentra en su mínima relación (fig.2).

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como mediana (Md) \pm desviación intercuartílica. Las concentraciones de receptores de estrógenos placentarios entre ambos grupos, al igual que las concentraciones de estradiol sérico materno se analizaron mediante la prueba no paramétrica de comparación entre 2 grupos no relacionados (U de Mann-Whitney). Con la finalidad de correlacionar las concentraciones de estradiol materno y las de receptores de estrógenos placentarios se utilizó la prueba no paramétrica de correlación de rangos de Spearman.

Se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas debido a que los resultados no se distribuyeron de forma normal.

RESULTADOS

Características generales

Al compararse la edad, peso, paridad y semanas de gestación entre los dos grupos de pacientes, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellas (tabla I).

Concentraciones placentarias de los receptores de estrógenos

Las concentraciones placentarias de los receptores de estrógenos de las placentas provenientes de embarazos con preeclampsia fueron menores en comparación con los de las placentas provenientes de embarazos sin alteraciones. Al compararse ambos resultados se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Tabla II).

Concentraciones séricas de estradiol

Las concentraciones séricas de estradiol fueron menores en las pacientes que cursaron con preeclampsia severa en comparación con las de mujeres con embarazos sin alteraciones. Dicha diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Tabla II).

Correlación entre las concentraciones séricas de estradiol materno y las concentraciones placentarias de receptores de estrógenos

Al realizar las pruebas de correlación entre las concentraciones séricas de estradiol y las concentraciones placentarias de receptores de estrógenos en las mujeres que cursaron con preeclampsia severa, se obtuvo un valor negativo igual a -0.114 que no fue estadísticamente significativo. Cuando se correlacionaron las concentraciones séricas de estradiol con las concentraciones placentarias de los receptores de estrógenos en el grupo control, se obtuvo un valor negativo igual a -0.075 el cuál no fue estadísticamente significativo.

DISCUSION

Nuestro trabajo parte del conocimiento de que en la preeclampsia severa existe una mala migración del trofoblasto hacia las arterias espirales, además de que al interrumpir la gestación y evacuar a la placenta, ésta enfermedad desaparece de forma sorprendente(13). Lo anterior nos habla de una alteración en el desarrollo de la placenta y de su posterior manifestación clínica de la enfermedad. Al tratarse de un órgano endocrino, la placenta, regula procesos morfológicos y fisiológicos mediante eventos endocrinos, paracrinos y/o autocrinos (62). Dentro de la variedad de hormonas que produce la placenta, existe un grupo que interviene en procesos proliferativos, invasivos y de desarrollo celular tanto en tejidos reproductivos como en no reproductivos: los estrógenos (30). En particular, el estradiol se incrementa 1000 veces durante el embarazo sin conocer aún por completo su significado biológico. Se le ha encontrado participación en cambios morfológicos y fisiológicos de la placenta, ejerciendo sus funciones a través del acoplamiento con su receptor y la posterior activación de la vía genómica o no genómica.

Nuestro trabajo planteó la posibilidad de que en las placentas provenientes de mujeres con embarazos con preeclampsia severa, presentaran una disminución en la concentración de receptores de estrógenos, en relación aquellas provenientes de embarazos sin alteraciones (63). Similar a lo previamente reportado en otra entidad obstétrica como es el embarazo prolongado, donde su imagen histológica es muy similar a la que presenta la preeclampsia severa. La disminución de receptores de estrogénos en otros sitios no reproductivos parecen tener un significado clínico, tal es el caso del valor pronóstico en cáncer de mama o su posible participación en la aterosclerosis coronaria.(42). Nuestros resultados mostraron la presencia de receptores de estrógenos en las placentas provenientes de embarazos con y

sin preeclampsia. Al hacer la comparación encontramos un valor menor en el grupo de placentas con preeclampsia severa con respecto al grupo sin preeclampsia, observándose una diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Esto nos hace pensar que al existir un reducido número de receptores de estrógenos en la placenta de mujeres con preeclampsia severa ocasiona que la respuesta a los estrógenos esté disminuida. Ocasionando una menor activación de la vía genómica, responsable de los eventos de larga duración y de la acción sobre el DNA, expresando por lo mismo un menor número de moléculas necesarias para el desarrollo, invasividad y proliferación celular. Entre dichos procesos se encuentra la mala migración del trofoblasto hacia las arterias espirales, aspecto inicial para el desarrollo de la preeclampsia.

Esta disminución de los receptores de estrógenos en las placentas provenientes de mujeres con preeclampsia severa puede explicarse por la calidad del tejido placentario, ya que desde el aspecto histopatológico en la preeclampsia a diferencia del tejido normal se observa fibrosis, calcificaciones y aterosclerosis(15). O bien, existe una alteración en la regulación de la expresión del mismo, puesto que la regulación del receptor es un proceso complejo que envuelve diferentes pasos sujetos al control hormonal. Hechos que se han evidenciado tanto en el útero grávido como en el no grávido en diferentes especies animales y que confirman que para haber una respuesta a estímulos hormonales primero debió existir una estimulación sobre el órgano blanco(64). En úteros de primates se ha visto que el epitelio luminal presenta una mayor expresión de receptores a estrógeno y mayores niveles de RNAm que el epitelio estromal (65). En ruminantes se apreció que la supresión de receptores a nivel luminal es un riesgo para el mantenimiento del embarazo (66) lo que tal vez se explique porque el dicho epitelio está mas asociado al desarrollo del embrión (64). Por lo anterior, la respuesta al estradiol depende tanto de la localización celular como de las

diferencias entre las células del mismo tejido (65). Otra forma de regular la expresión del receptor de estrógeno es mediante las concentraciones séricas de estradiol a través de una acción bifásica (51), puesto que se ha observado que el útero del ratón las dosis fisiológicas de estradiol incrementan la expresión del RNAm del receptor, mientras que en el oviducto del pollo se ha encontrado que las dosis supra- fisiológicas de estradiol disminuyen la expresión del RNAm de dicho receptor (67). En nuestro trabajo no fue posible conocer la regulación de la expresión del receptor de estrógeno ya que no realizamos el diseño apropiado para tal propósito.

Otro objetivo del estudio fue el estudiar los niveles de estradiol materno ya que como arriba se mencionó, tienen una relación directa con los receptores de estrógenos. Aquí encontramos que el nivel sérico en las mujeres con preeclampsia severa fue menor en comparación con el grupo sin alteraciones, diferencia que fue significativa estadísticamente ($p < 0.001$). Estos datos apoyan el concepto que en el embarazo complicado con preeclampsia severa no se presentan niveles supra-fisiológicos de estradiol y además coincide con lo ya descrito para esta enfermedad, en la que por existir una alteración enzimática en el trofoblasto además de una deficiencia en la producción de dehidroepiandrosterona fetal, ocasionan una baja producción de estrógenos (68). Por consiguiente, nuestros resultados coinciden con lo que fisiológicamente sucede en la preeclampsia.

Finalmente al buscar una correlación entre los receptores y el nivel sérico de estradiol, resultó ser positiva mas no lo suficiente para ser significativa. Pero si lo suficiente para dejar ver que para la expresión del receptor es necesario el estímulo hormonal, que aunque no fuere el normal, es conocido que cantidades mínimas de estradiol (69) o incluso su ausencia son capaces de generar la actividad del receptor, éste último por una vía no

genómica (70). Así que la disminución de los receptores de estrógenos no se debe a los niveles bajos de estradiol circulantes, ya que para ocasionar una baja tendría que existir una dosis supra-fisiológica, sino a un evento que condicione una mala expresión del receptor en algún momento del desarrollo del trofoblasto, pero tendría que ser estudiado bajo otro diseño de investigación, muy diferente al desarrollado en este trabajo.

En conclusión, el presente trabajo nos muestra como el efecto hormonal, en particular del estradiol mediante su receptor, participa en algunas alteraciones biológicas que suceden el tejido placentario. Por primera vez se describe la presencia de los receptores de estrógenos en las placentas de embarazos complicados con preeclampsia, encontrándose una menor concentración. Esta puede ser secundaria a una mala regulación en la expresión del receptor y su RNAm, con la subsecuente menor generación de biomoléculas. Así, se verían interrumpidos los fenómenos de invasión, diferenciación celular, proliferación celular y angiogénesis ocasionando la falta de invasión del trofoblasto a las arterias espirales, alteración en el endotelio, liberación de biomoléculas y finalmente la manifestación de la enfermedad.

CONCLUSIONES.

1. Por primera vez se midieron los receptores de estrógenos en placentas provenientes de mujeres que desarrollaron preeclampsia severa.
2. Las concentraciones de receptores de estrógenos y de estradiol sérico fueron menores en las embarazadas que presentaron preeclampsia severa en comparación con las que cursaron embarazos sin alteraciones.
3. El estradiol es una molécula que participa en el desarrollo celular, invasividad y diferenciación celular y angiogénesis tanto en tejidos reproductivos como en no reproductivos. Ha demostrado su importancia en procesos metabólicos y morfológicos en la placenta, todo esto mediante su receptor ya que sin su presencia no hay una respuesta biológica al esteroide. En la preeclampsia severa se describe una menor concentración de éstos receptores, lo que hace pensar en una mala regulación de su expresión. Derivando este fenómeno a una falla en la invasión del trofoblasto a las arterias espirales, alteración del endotelio, liberación de biomoléculas y finalmente la manifestación clínica de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Halm E, Gleicher N. Cambios fisiológicos en el embarazo normal. En: Gleicher N, ed. *Medicina Clínica en Obstetricia*. Argentina: Editorial Panamericana; 1989:58-85.
2. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, et al. Human cytotrophoblast adopt a vascular phenotype as they differentiate. *J Clin Invest* 1997; 2131-51.
3. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, et al. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 1997;151:1809-18.
4. Petraglia F, Florio P, Micheroux AA, et al. Steroid-protein interaction in human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:227-31.
5. Vischer U. Estrogens and atherosclerosis: a direct protective effect on the vascular wall. *Eur J Endocrinol* 1997;137:343-44.
6. Speroff L, Glass RH. Análisis clínicos. En: Speroff L, Glass RH, Kase NG, ed. *Endocrinología Ginecológica e Infertilidad*. España: Toray; 1986:553-78.
7. Hertig AT, Rock J. Two human ovum of the previllous stage, having an ovulation age of about 11 and 12 days. *Contrib Embryol* 1941;29:127-56.
8. Moore K. *The developing human: Clinically oriented embryology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1988.
9. Hamilton WJ, Boyd JD. Developmental of the human placenta in the first three mounths of gestation. *J Anat* 1960;94:297-328.
10. Philippe E, Sauvage PJ. La placenta y sus membranas. En: Iffy L, Kaminetzky H, ed. *Obstetricia y Perinatología*. Argentina: Panamericana, 1985:184-263.
11. Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Uteroplacental vascular pathology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1975;5:47-65.
12. Pijnemborg R, Vercruyse L, Verbist L, Van Assche A. Interaction of trophoblast with placental bed capillaries and venules of normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1998;19: 569-575.
13. Roberts JM, Redman WG. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993;341:1447-51.
14. Reister F, Heyl W, Kaufman P, Rath W. Trophoblast invasion in pre-eclampsia. *Zentralbl Gynakol* 1999;121:587-90.

15. Santamaría A. Patología obstétrica. En: Arias-Stella, Correa P, ed. Texto de Patología. México: Prensa Médica Mexicana; 1975:988-90.
16. Dekker GA. The pharmacological prevention of pre-eclampsia. *Bailliere's Clinical Obstet Gynecol* 1995;9:509-28.
17. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357:53-6.
18. Lopez-Llera M. Generalidades sobre la toxemia. En: Lopez-Llera, ed. Toxemia del embarazo. México: Limusa: 1990:15-43.
19. Velasco V, Navarrete HE, Madrazo NM, Cardona JA. Mortalidad materna por preeclampsia en el Instituto Mexicano del Seguro Social 1987-1996. *Rev Med IMSS* 1997;35:439-45.
20. National High Blood Pressure Education Program Working Group report on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1691-712
21. Chesley LC. Alteraciones Hipertensivas en el embarazo. En: Gleicher N, ed. *Medicina Clínica en Obstetricia*. Argentina:editorial Panamericana; 1989:861-88
22. Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes. *Ann Rev Genet* 1985;19:209-52.
23. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Biosíntesis, metabolismo y mecanismo de acción de las hormonas. En: Speroff L, Glass RH, Kase NG, ed. *Endocrinología Ginecológica e Infertilidad*. España: Toray; 1986:1-38.
24. Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncitio trophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids* 1999;64:624-7.
25. Ciocca DR, Roig LM. Estrogen receptors in human non-target tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Rev* 1995;16:35-62.
26. Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocrine Rev* 1995;16: 559-89.
27. Banerjee SK, Sakar DK, Weston AP, Alok De, Campbell DR. Over expression of VEGF and its receptor during the development of estrogen-induced. *Carcinogenesis* 1997;18:1155-61.
28. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240(13): 889-95

29. Beyer C, Gonzalez FO. Mecanismos moleculares de acción de las hormonas esteroideas en mamíferos. En: Orozco E, Gariglio VP, ed. *Genética y Biomedicina Molecular*. México: editorial Limusa; 2000: 253-65
30. Katzenellenbogen BS. Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. *J Soc Gynecol Invest* 2000; 7(1suppl): S33-7
31. Ji TH, Oh MS, Koo YB, Ji IH. Activation and signal generation by membrane receptor. *Mol Cells* 1995; 5: 1-8
32. Ravaynere JF, Vignon F, Bringer J, Pujel P. Non-genomic steroid effects. *Ann Endocrinol(Paris)* 2000; 61(6): 517-23
33. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid thyroid receptor superfamily. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 451-86.
34. Jensen EV, DeSombre ER. Mechanism of action of the female sex hormones. *Annu Rev Biochem* 1972; 41: 203-30.
35. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human estrogen receptor gene. *EMBO J* 1988; 7: 3385-8.
36. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor superfamily. *EMBO J* 1992; 11: 1003-13.
37. Mader S, Kumar V, Verneuil H, Chambon P. Three aminoacids of the estrogen receptor are essential to its ability to distinguish an estrogen. *Nature* 1989; 338: 271-4.
38. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 21455-8.
39. Telleria CM, Zhong L, Derb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, et al. Differential expression of the estrogen receptors alfa and beta in the rat corpus luteum of pregnancy regulation by prolactin and placental lactogen. *Endocrinology* 1998; 139(5): 2432-42
40. Gronemeyer H. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J* 1992; 6: 2524-9.
41. Beyer C, Karolczak M. Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase. *J Neurosci Res* 2000; 59: 107-116
42. Mendelson ME, Karos RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340(23), Junio 10: 1810-11

43. Gustafsson JA. Novel aspects of estrogen action. *J Soc Gynecol Investing* 2000;7(1suppl): S8-9
44. Gustafsson JA. An up-date on estrogen receptors. *Semin Perinatol* 2000;24(1): 66-69
45. Iwase H, Omato Y, Toyama T, Hara Y, Iwata H. Clinical significance of estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer* 1999;6(4)Oct25: 325-30
46. Barrón CA, Bermejo ML, Castro RI. El receptor de estrógenos en la glándula mamaria. *Rev Invest Clin* 1997; 49: 515-28
47. Khan-Dawood SF, Dawood YM. Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150(5pt1): 501-5
48. Wu WX, Ma XH, Smith GC, Nathanielsz DW. Differential distribution of ER alpha and ER beta mRNA in uterine tissues of the pregnant rhesus monkey. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(1): C190-8.
49. Mattick S, Glenn K, de Haan G, Shapiro J. Analysis of ligand dependence and hormone response element synergy. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997;60:285-94.
50. Ing NH, Ott H. estradiol up-regulates ER alpha mRNA in sheep endometrium. *Biol Reprod* 1999; 60(1): 134-9
51. Meikle A, Forsberg M, Sahlin Lmasironi B, Tasende C, Garfalo EG. A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40(3): 283-93
52. Patricio B. Récepteurs estrogéniques et progestéroniques dans le placenta humain. *Rev Fr Gynécol Obstét* 1994; 89(3): 145-7
53. Billiar R, Pepe G, Albrecht E. Immunohistochemical identification of the estrogen receptors in the nuclei of cultured human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 1997; 18: 365-70
54. Rossmannith WG, Wolfahrt S, Ecker A, Eberhardt E. The demonstration of progesterone but not of estrogen receptors in the developing human placenta. *Horm Metab Res* 1997; 29: 604-10
55. Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human cytotrophoblast. *Placenta* 1999; 20: 669-76

- 56 Pepe GJ, Albrecht DE. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocrine Rev* 1995; 16: 608-15
- 57 Li J, Lu H, Hou Y. The studies of the estrogen and progesterone receptor levels in the placenta, fetal membrane, uteroplacental bed and myometrium in patients with prolonged pregnancy. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1995; 30: 536-8.
- 58 Cseh I, Szepesi J, Walentin S, Szabo T, Drawez S, Szalay J, et al. Significance of the determination of estrogen and progesterone receptors in trophoblast diseases. *Zentralbl Gynecol* 1990; 12: 151-9
- 59 Mejía-Aranguré JM, Fajardo GA, Gómez DA, Cuevas-Urióstegui ML, Hernández-Hernández DM, Garduño EJ, et al. El tamaño de muestra: un enfoque práctico en la investigación pediátrica. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1995;52:381-91.
- 60 Estr Ctria (manual) Cis Bio International. France 1996: 8-14.
- 61 González-Sánchez JL, Calzada SL, Galindo VA, Salazar EL. Receptores de estradiol en la neoplasia intraepitelial cervical y cancer cervicouterino. *Ginecol Obstet Mex* 1996; 64:438-42.
- 62 Petraglia F, Santuz M, Florio P, Simoncini T, Luisi S, Plaine L, et al. Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J Reprod Immunol* 1998; 39(1-2): 221-33.
- 63 Rivera J, Cano A. Oestrogen and progesterone receptors in human term placenta. *Placenta* 1989;10:579-88.
- 64 Ing NH, Tamesi BM. Estradiol up-regulates ER and PR gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol reprod* 1997; 56: 1205-15
- 65 Whithes DC, Hamon M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during oestrus cycle of the ewe. *J Endocrinol* 1993; 138:479-92.
- 66 Spencer TE, Becker NC, Georg P, Ogle TF. Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen induced luteolysis in ewes. *Endocrinology* 1995; 136: 4932-44.
- 67 Zhou Y, Chorich PL, Ogle FT, Maesh VB. Regulation of estrogen receptor protein and mRNA estradiol in rat uterus. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 46(6): 687-98.
- 68 Scott WW. Progesterone and estradiol production by normal and preeclamptic placentas. *Obstet Gynecol* 1988;71:222-6.

- 69 Albrecht ED, Pepe GJ. Central integrative role of oestrogen in modulating the communication between the placenta and fetus that results in primate placental development. *Placenta* 1999;20:129-39.
- 70 Jiang SW, Lloyd VR, Jin L, Eberhardt. Estrogen receptor expression and growth-promoting function in human choriocarcinoma cells. *DNA and Cel Biology* 1997; 16(8): 969-77.

Tabla I

Características generales de las pacientes

	Normal (n=18)	preeclampsia (n=16)	p
Edad °	26 ± 7	27 ± 9	n.s.
Peso °	72.5 ± 20.2	69.5 ± 16.0	n.s.
Edad gestacional °	39.5 ± 0.2	37.0 ± 0.2	n.s.
Paridad			
primíparas	6	8	
multiparas	12	8	n.s.

Tabla 1.- Distribución de las características generales de ambos grupos. ° Md ± desviación intercuartílica; °media ± d.e.

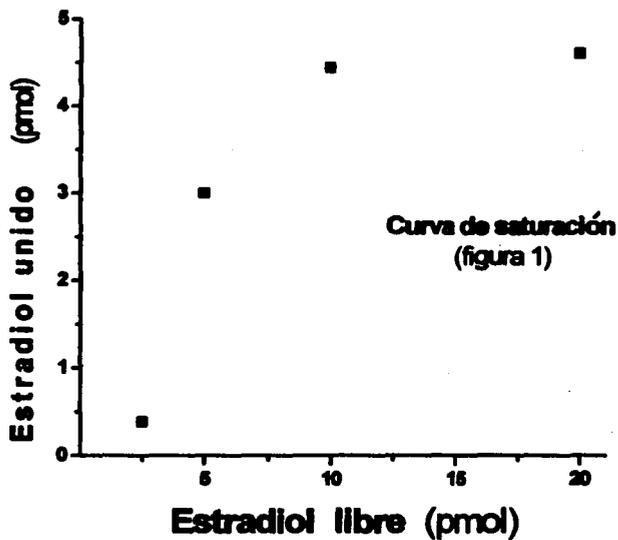


Fig. 1. Curva de saturación del receptor de estrógeno. Relación de cómo a mayor estrógeno libre marcado (ligando), se va uniendo al total de receptores de un tejido en estudio, hasta su saturación.

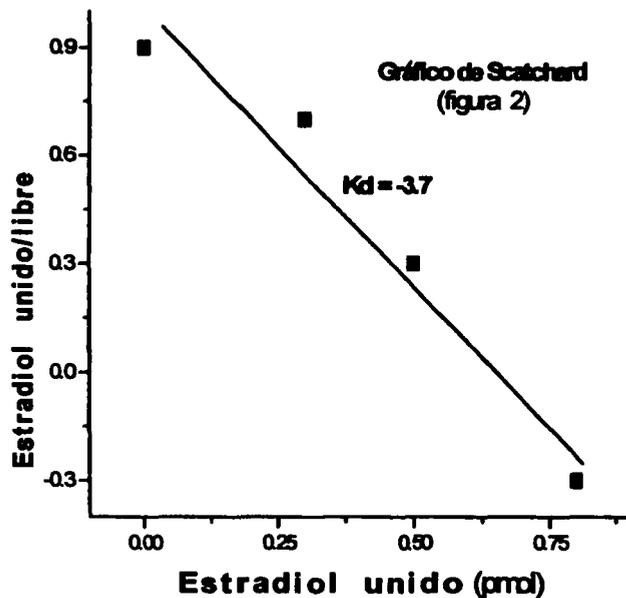


Fig.2. Gráfico de Scatchard. El máximo valor de eje de las "x" nos indica la saturación máxima del receptor. La pendiente negativa nos da la constante de disociación (K_d), al ser negativa nos dice que a un incremento de "x" disminuye "y" en intervalo de -3.7.

Tabla II
Concentraciones de receptores de estrógenos placentarios y estradiol sérico

	normales n=18	preclampsia n=16	p
Receptores*	3.22 ± .53	1.31 ± .50	<.004
Estradiol °	7202 ± 447	4906 ± 640	<.01

Tabla 2. Resultado del número de receptores de estrógenos en placenta y de estradiol sérico se expresaron en medias ± error estándar; * femtomoles/miligramo proteína; ° picomoles/mililitro.

ANEXO 1

Técnica de radioligando y carbón cubierto con dextrán

A) Reactivos

Solución TED (TRIS - EDTA - DTT)

- 1.- Poner en un vaso de precipitado 655.5 mg de TRIS (PM 121.1 x10), más 279.2mg de EDTA (Etilen-diaminotetracetato), más 77.1 mg de DTT (Dithiothreitol) y 1 210 mg de molibdato de Na. Estas cantidades son para preparar 500 ml de buffer.
- 2.- Al vaso se le agrega 200ml de H₂O bidestilada.
- 3.- Se agita con un agitador magnético hasta disolver la mezcla.
- 4.- Estandarizar el potenciómetro (medidor de pH), usando un estándar de 4 y otro de 7.
- 5.- Medir el pH de la solución y llevarlo a 7.4. Ajustándose con HCl ó NaOH.
- 6.- Pasar a matriz aforado de 500ml, enjuagando el vaso de precipitado 3 veces con agua bidestilada. Se termina aforando a 500ml.
- 7.- Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

Dextrán

- 1.- Pesar 100mg grenetina, trisma base 121mg, dextrán 025mg. Todo es para 100ml de preparación.
- 2.- En baño María disolver la grenetina con H₂O bidestilada, por otra parte se mezcla tris y dextrán usando un agitador magnético.
- 3.- Se mezclan ambas soluciones y se lleva a un pH de 8, usando NaOH.
- 4.- Se deja de agitar hasta su completa homogenización, se colocan en tubos cónicos de 10ml y se congela hasta su uso.

B) Procedimiento

Citosol

- 1.- Limpiar la placenta sobre una plancha de hielo, separando vasos, trofoblasto y amnios.
- 2.- Pesar 1gr de tejido no vascular.
- 3.- Tejido + 2 ml (relación: 2 ml/1 gr tejido) TED/Molibdato Na.
- 4.- Homogenizar en un politrón a 4°C, a pulsos de 25-5-25 seg. (homogenizar-descanso-homogenizar).

- 5.- El material se coloca en tubos de policarbonato para rotor T1-75.
- 6.- Usar ultracentrífuga Beckman a 100 000g por 30 minutos.
- 7.- Preparar tubos con trazador con H³, evaporar etanol con nitrógeno en campana de aspiración. Colocados permanentemente en hielo.
- 8.- Separar el sobrenadante del "pellet", el cuál se guarda, y agregar carbón activado a una razón de 5mg/2ml.
- 9.- Agitar en vórtex, colocar en tubos de policarbonato (2) y centrifugar en frío (4°C) a 3000g / 5 minutos.
- 10.- Con suma precaución separar el sobrenadante con pipetas Pasteur sin arrastrar el carbón localizado en el pellet, mismo que se desecha.
- 11.- Con micropipeta automática pasar 200µl para cada tubo, agitar y meter en cámara de refrigeración a 4°C durante 18 horas (incubación del trazador-tejido).
- 12.- El sobrante del sobrenadante se guarda para medición de proteínas.
- 13.- Al día siguiente tomar dextrán (10ml) y agregar 25mg de carbón activado. Agitar en vórtex continuamente, evitando la sedimentación.
- 14.- Sacar los tubos (trazador-tejido), retirar el hielo y agregar a cada tubo 200µl del carbón cubierto con dextrán.
- 15.- Luego de agitarlos en vórtex se colocan en camisas de centrifuga.
- 16.- Centrifugar en frío (4°C) por 10 minutos.
- 17.- El sobrenadante se pasa a los frascos viales respetando el botón de carbón.
- 18.- Agregar 5ml de líquido de centelleo, agitar, colocar en frascos viales del contador de centelleo líquido.
- 19.- Medición de centelleo en un contador de emisiones beta.

ANEXO 2

Técnica de Lowry

Reactivos.

A) Solución A: NaOH 400mg - 100ml Agua Bidestilada

1) Lowry A. Folin a 2N, se pasa a 1N con agua a 1:1

2) Lowry B

- Carbonato de Sodio (NaCO_3 al 2%) 2gr - 100ml. En un matraz se coloca el carbonato de sodio y con poca solución A se disuelve. Luego se termina de aforar a 100ml.
- Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 50mg - 5ml de solución A
- Sulfato de Cobre (Cu SO_4 al 1%) 50mg - 5ml solución A.

Preparación

1) Lowry A: 1ml de Folin con 1ml de agua

2) Lowry B: Na_2CO_3 = 100 partes = 20ml ó 10ml

$\text{K Na C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ = 3 partes = .6ml ó .3ml

Cu SO_4 = 3 partes = .6ml ó .3ml

Se mezcla todo y queda formada el Lowry B.

B) Solución Cupro - alcalina (Lowry A - Lowry B)

en relación 50 ml Lowry A - 1ml Lowry B ó 25ml - .5ml.

Curva de Estandarización y ejemplo con una muestra

Tubo	Albúmina	Agua	Mezcla	Folin	D:O	x	Prot/sistema	Dilución	Citosol	prot/T
	µg/µl	µl	cupr-alc (ml)	µl	550nm		*	1.3	200µ (µg)	mg
B-B	- -	200	1	100	- -	-	-			
1-2	10-10	190	1	100	.070-.066	.07	10.82	14.07	2813.2	2.8
3-4	20-20	180	1	100	.139-.135	.14	21.65	28.15	5629	5.6
5-6	30-30	170	1	100	.198-.193	.20	30.93	40.21	8041.8	8.04
7-8	40-40	160	1	100	.236-.236	.24	37.11	48.24	9648.6	9.6
9-10	50-50	150	1	100	.309-.322	.32	49.48	64.32	12864	12.8
Muestra										
1	5	195	1	100	.380		58.76	76.39	15277.6	15.2

* $\Sigma \text{conc. albúmina} / \Sigma x = 150/97 = 154.64$

Anexo 3

Tablas y gráficas

Tabla I.- Se aprecia que no hay diferencias entre ambos grupos en relación a edad cronológica, edad gestacional, peso y paridad.

Figura 1.- Se observa una curva en la que se evidencia que a mayor concentración de hormona marcada (libre) llega un momento en el que existe saturación por el receptor, o sea que las concentraciones de los receptores con hormona (unida) llegan a ser similares. Dicha gráfica nos da la concentración de hormona marcada (libre) con la que deberemos de continuar trabajando el resto de nuestras muestras de placenta. Con esto se estandariza la técnica.

Figura 2.- Esta gráfica nos ayuda a comprender la dinámica de la afinidad de la hormona por el receptor. Al ser una pendiente negativa nos habla que al encontrarse mayor hormona unida, la relación de hormona libre /unidad se va perdiendo, hasta llegar a un punto donde la pendiente corta a "x", lo que equivale a la concentración total de receptores. Debido a que existen otras moléculas que pueden unirse al receptor (inespecífico) y que lo que deseamos conocer es que lo unido realmente represente a la hormona (específico), es necesario obtener la Kd que es una constante que nos indica que por cada punto de "x", la "y" cambia su valor.

Tabla II.- Se aprecian las diferencias entre ambos grupos, tanto en las concentraciones de receptores de estrógenos como en las de estradiol sérico, siendo en ambos casos estadísticamente significativas. Encontrándose una concentración menor, para las pacientes provenientes de embarazos complicados por preeclampsia severa.