

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**



UMSNH

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PROTEÍNAS G MONOMÉRICAS Rho Y Rac Y EL ESTRÉS OXIDATIVO Y
NITROSATIVO EN PLACENTAS HUMANAS EN LA PREECLAMPSIA**

**Tesis que presenta Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental
Q.F.B Ana Gabriela Campos Arroyo**

Director de tesis

D.C. Salvador Manzo Avalos

Sinodales

D.C. Alfredo Saavedra Molina

D.C Daniel Godínez Hernández

D.C Homero Reyes de la Cruz

DC. Víctor Meza Carmen

Morelia, Michoacán, México.

Febrero de 2011

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Salvador Manzo Avalos.

Tesis apoyada por el Programa de Investigación 2009

Coordinación de la Investigación Científica

Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología

CONACYT

HOSPITAL General Dr. Miguel Silva

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La placenta	1
1.2. Unión fetomaterna	1
1.3. Espacio intervelloso	3
1.4. Circulación placentaria	4
1.5. Circulación placentaria fetal	5
1.6. Circulación placentaria materna	6
1.7. La Placenta y membranas fetales tras el nacimiento	6
1.8. Superficie materna de la placenta	7
1.9. Superficie fetal de la placenta	8
1.10. Cordón umbilical	8
II. ANTECEDENTES	10
2.1. Hipertensión asociada al embarazo	10
2.2. Preeclampsia	10
2.3. Estrés oxidativo y nitrosativo	14
2.4. Sistemas antioxidantes	23
2.5. Proteínas G	25
2.5.1. Proteínas Rho	25
2.5.2. Proteínas RhoA, RhoB y Rac	26
2.5.3. Proteínas Rac	31
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS	34
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos específicos	34
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1. Material biológico	35

6.2. Obtención de las muestra	35
6.3. Determinación de la concentración de proteína	35
6.4. Determinación del óxido nítrico	37
6.5. Determinación de TBARS	39
6.6. Inmunodetección de las proteínas RhoA, RhoB, Rac, SOD, eNOS y catalasa	40
6.7. Perfil de nitrosilación	41
VII. RESULTADOS	43
7.1. Datos clínicos de las pacientes	43
7.2. Presencia del estrés nitrosativo en placentas de mujeres sanas y con PE	45
7.2.1. Determinación de los niveles de óxido nítrico	45
7.2.2. Perfil de nitrosilación	47
7.2.3. Inmunodetección de la eNOS	49
7.3. Análisis del estrés oxidativo en placentas de mujeres sanas y con PE	51
7.3.1. Determinación de los niveles de lipoperoxidación	51
7.3.2. Presencia de los niveles de SOD	53
7.3.3. Determinación de los niveles de catalasa	55
7.4. Presencia de las proteínas RhoA, RhoB y Rac en placentas de mujeres sanas y con PE	57
7.4.1. Inmunodetección de las proteínas RhoA y RhoB	57
7.4.2. Inmunodetección de la proteína Rac	61
VIII. DISCUSIÓN	63
IX. CONCLUSIÓN	72
X. LITERATURA CITADA	73

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La placenta

La placenta es el lugar principal de intercambio de nutrientes y de gases entre la madre y el hijo. La cual consta de dos componentes:

- Una porción fetal que se desarrolló a partir del saco coriónico
- Una porción materna que procede del endometrio

La placenta y el cordón umbilical constituyen un sistema de transporte de sustancias entre la madre y el feto. Los nutrientes y el oxígeno pasan de la sangre materna a través de la placenta a la sangre fetal, mientras que los productos de desecho y el dióxido de carbono circulan en sentido contrario. La placenta y las membranas fetales realizan las siguientes funciones y actividades: protección, nutrición, respiración, excreción, producción de hormonas. Al nacer se expulsa la placenta y las membranas fetales del útero (Moore y Persaud, 2004).

1.2. Unión materno-fetal

La parte fetal de la placenta (corion veloso) está unida a la porción materna (decidua basal) a través del escudo citotrofoblástico, una capa externa de células trofoblásticas situadas en la superficie materna de la placenta (Fig. 1). Las arterias y las venas endometriales pasan libremente a través de las hendiduras del escudo y se abren hacia el espacio interveloso (Moore y Persaud, 2004).

La forma de la placenta depende del área persistente de vellosidades coriónicas. Normalmente se trata de una zona circular, que otorga forma de disco a la placenta. A medida que las vellosidades coriónicas invaden la decidua basal, el tejido decidual se erosiona para aumentar el espacio interveloso. Esta erosión produce varias zonas de tejido decidual en forma de cuña, los tabiques placentarios, que se proyectan hacia la placa coriónica, la parte de pared coriónica

relacionada con la placenta. Los tabiques placentarios dividen la parte fetal de la placenta en regiones convexas irregulares, los cotiledones. Cada cotiledón está formado por dos o más vellosidades primarias y sus múltiples vellosidades ramificadas. Al finalizar el cuarto mes, la decidua basal ha sustituido casi completamente sustituida por los cotiledones (Fig. 1 y 2) (Cross, 2005).

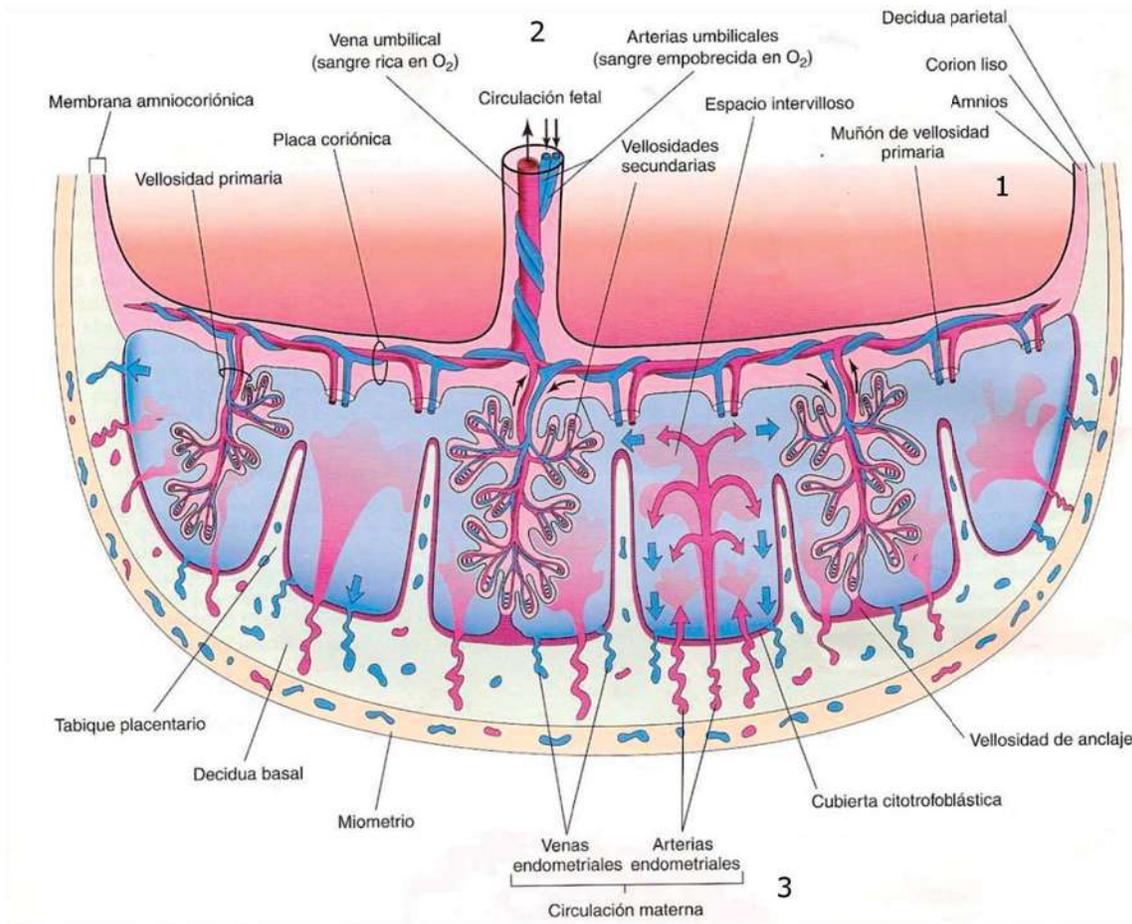


Figura 1. Esquema de un corte transversal de una placenta a término que muestra 1) relación de corion velloso (parte fetal de la placenta) con la decidua basal (parte materna de la placenta), 2) circulación placentaria fetal y 3) circulación placentaria materna. Obsérvese que las arterias umbilicales llevan sangre fetal poco oxigenada (en azul) a la placenta y que la vena umbilical lleva sangre oxigenada (en rojo) al feto (Moore y Persaud, 2004).

La sangre materna fluye hacia el espacio intervelloso en pequeñas cantidades en forma de embudo de las arterias endometriales espirales y realiza un intercambio con la sangre fetal a medida que la sangre materna pasa alrededor de las vellosidades secundarias. A través de ellas se lleva a cabo el principal intercambio de material entre madre y embrión/feto. La sangre arterial que penetra desplaza la sangre venosa hacia el espacio intervelloso en las venas endometriales, que se diseminan en la totalidad de la superficie de la decidua basal (Moore y Persaud, 2004).

1.3. Espacio intervelloso

El espacio intervelloso que contiene sangre materna procede de las lagunas que se formaron en el sincitiotrofoblasto durante la segunda semana del desarrollo. Este espacio grande relleno de sangre es consecuencia de la unión y crecimiento de las redes lacunares. Los tabiques placentarios dividen el espacio intervelloso de la placenta en compartimientos; no obstante, existe comunicación libre entre ellos debido a que los tabiques no llegan a la placa coriónica (Iglesias y col., 2002).

La sangre materna penetra en el espacio intervelloso a través de las arterias endometriales espirales de la decidua basal (Fig. 3). Las arterias espirales pasan a través de hendiduras del escudo citotrofoblástico y vierten la sangre en el espacio intervelloso. Este gran espacio es drenado por las venas endometriales, que también penetran el escudo citotrofoblástico. Las venas endometriales se encuentran en toda la superficie de la decidua basal. Las numerosas vellosidades coriónicas secundarias, que surgen de las vellosidades primarias, son bañadas continuamente por sangre materna que circula a través del espacio intervelloso. La sangre lleva el oxígeno y las sustancias nutritivas necesarias para el crecimiento y desarrollo del feto. La sangre materna también contiene productos de desecho, como dióxido de carbono, sales y productos del metabolismo proteico (Moore y Persaud, 2004).

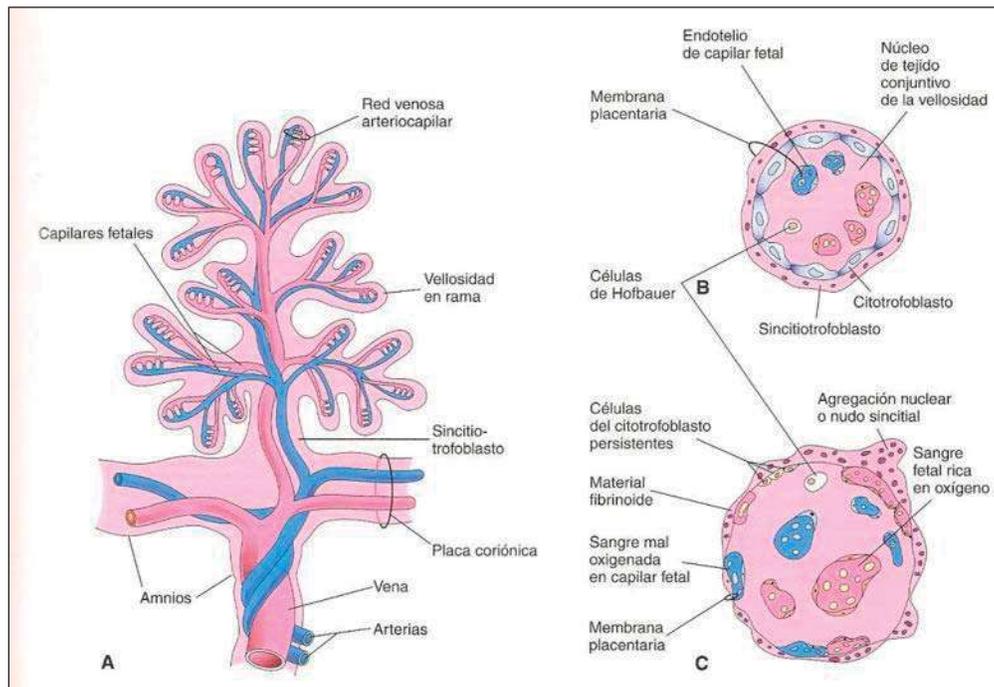


Figura 2. Estructura interna de la placenta. A, Vellosidad coriónica primaria que muestra su sistema arteriocapilarvenoso. B y C, cortes a través de una vellosidad en rama a las 10 semanas y a término, respectivamente. Obsérvese que la membrana placentaria se adelgaza mucho a término. Se cree que las células de Hofbauer son células fagocíticas (Moore y Persaud, 2004).

1.4. Circulación placentaria

Las vellosidades coriónicas secundarias de la placenta funcionan como una barrera placentaria en la que se intercambian materiales a través de ella entre las circulaciones fetal y materna. Se cree que el intercambio principal entre la madre y el feto tiene lugar a través de las numerosas vellosidades secundarias que surgen de las vellosidades primarias (Lagman, 2001).

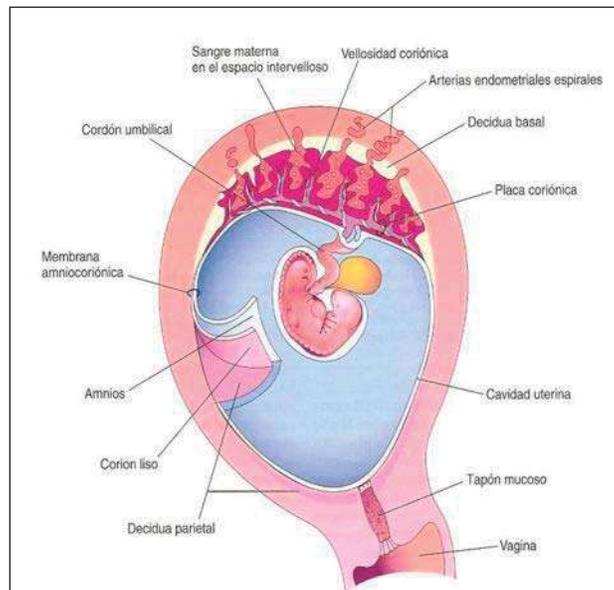


Figura 3. Corte sagital de un útero gestante a las cuatro semanas que muestra la relación de las membranas fetales entre sí, así como con la decidua y el embrión (Lagman, 2001).

1.5. Circulación placentaria fetal

La sangre con poco oxígeno sale del feto y pasa a la placenta a través de las arterias umbilicales. En el lugar de unión del cordón a la placenta, estas arterias se dividen en varias arterias coriónicas de disposición radial que se ramifican libremente en la placa coriónica antes de penetrar en las vellosidades coriónicas de disposición radial que se ramifican libremente en la placa coriónica antes de penetrar en las vellosidades coriónicas. Normalmente no se mezclan la sangre fetal y la materna; sin embargo, a veces pueden pasar cantidades muy pequeñas de sangre fetal a la circulación materna cuando aparecen defectos diminutos en la membrana placentaria. La sangre fetal bien oxigenada de los capilares fetales pasa a venas de pared delgada que siguen a las arterias coriónicas hasta el sitio de unión del cordón umbilical, donde convergen para originar la vena umbilical. Este vaso de gran tamaño porta sangre enriquecida en oxígeno hasta el feto (Moore y Persaud, 2004).

1.6. Circulación placentaria materna

La sangre materna del espacio intervelloso se encuentra temporalmente fuera del sistema circulatorio materno. Penetra en dicho espacio a través de 80 a 100 arterias endometriales espirales de la decidua basal. Estos vasos vierten sangre en el espacio intervelloso a través de las hendiduras del escudo citotrofoblástico. El flujo sanguíneo de las arterias es pulsátil y la circulación materna lo impulsa en movimientos tipo chorro. La sangre que entra tiene una presión mucho mayor que la que se halla en el espacio intervelloso y emane hacia la placa coriónica que constituye el "techo" del espacio intervelloso. A medida que se disipa la presión, la sangre fluye lentamente alrededor de las vellosidades secundarias, permitiendo el intercambio de productos metabólicos y gaseosos con la sangre fetal. La sangre vuelve finalmente a la circulación materna a través de las venas endometriales (Moore y Persaud, 2004).

El bienestar del embrión y del feto depende en gran parte del baño adecuado de las vellosidades secundarias por la sangre materna. La reducción de la circulación uteroplacentaria conlleva a hipoxia fetal lo que puede producir la muerte del feto. El espacio intervelloso de la placenta madura contiene alrededor de 150 ml de sangre que se repone de tres o cuatro veces por minuto. Las contracciones intermitentes del útero durante el embarazo disminuyen ligeramente el flujo sanguíneo uteroplacentario; sin embargo, no expulsan cantidades importantes fuera del espacio intervelloso. Por consiguiente, la transferencia de oxígeno al feto disminuye, pero no se interrumpe, durante las contracciones uterinas (Moore y Persaud, 2004).

1.7. Placenta y membranas fetales tras el nacimiento

La placenta y las membranas fetales expulsadas del útero después del nacimiento son las secundinas (siguiente al nacimiento). La placenta (Plakuos, pastel plano)

suele tener forma de disco de un diámetro de 15 a 20 cm y un grosor de 2 a 3 cm (Fig. 4). Pesa entre 500 y 600 gramos, lo que representa alrededor de un sexto del peso de un feto promedio. Los bordes de la placenta se continúan con los sacos amniótico y coriónico rotos (Lagman, 2001).

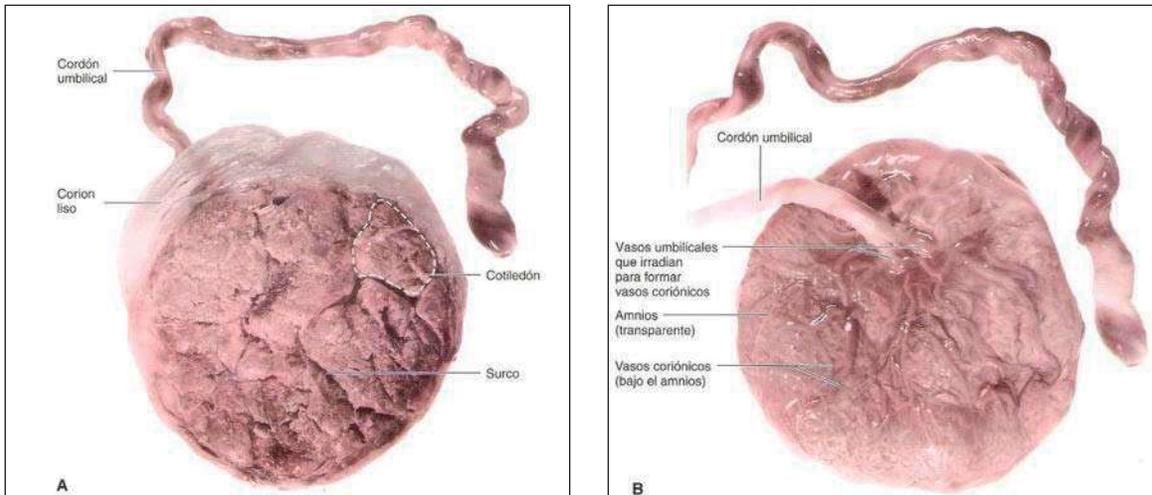


Figura 4. Placentas y membranas fetales después del nacimiento. A, superficie materna que muestra cotiledones y los surcos a su alrededor. B, superficie fetal que muestra vasos sanguíneos que transcurren desde la placa coriónica profunda al amnios y convergen para formar vasos umbilicales en la unión del cordón umbilical (Moore y Persaud, 2004).

1.8. Superficie materna de la placenta

El aspecto de la superficie materna se debe a las zonas vellosas ligeramente abultadas, los cotiledones, que se hallan separadas por los surcos ocupados previamente por los tabiques placentarios (Fig. 4 y 5). La superficie de los cotiledones está cubierta por delgados fragmentos grisáceos de decidua basal que se separaron de la pared uterina al expulsar la placenta. Estos fragmentos se pueden reconocer en cortes de la placenta examinados al microscopio. La mayor

parte de la decidua se retiene temporalmente en el útero y se elimina con la hemorragia uterina (Moore y Persaud, 2004).

1.9. Superficie fetal de la placenta

El cordón umbilical se une normalmente a la superficie fetal de la placenta y su epitelio forma un continuo con el amnios adherido a dicha superficie. La superficie fetal de una placenta recién expulsada es lisa y brillante, ya que está cubierta por el amnios. Los vasos coriónicos que se dirigen hacia y salen del cordón umbilical son visibles con claridad a través del amnios transparente. Los vasos umbilicales se ramifican en la superficie fetal para originar vasos coriónicos que penetran en las vellosidades coriónicas y forman el sistema arteriocapilar venoso (Moore y Persaud, 2004).

1.10. Cordón umbilical

La fijación del cordón umbilical a la placenta se ubica normalmente cerca del centro de la superficie fetal de este órgano (Fig. 4A y 4B), pero se pueden situar en cualquier punto (Moore y Persaud, 2004).

El cordón umbilical suele tener entre 1 y 2 cm de diámetro y 30 a 90 cm de longitud un promedio 55 cm, los cordones excesivamente largos o cortos son poco frecuentes. Los cordones de gran longitud tienden al colapso o a enroscarse alrededor del feto. Es importante reconocer el colapso del cordón umbilical de forma precoz, ya que dicho cordón podría estar comprimido entre la parte del cuerpo fetal que se presenta y la pelvis materna y producir hipoxia fetal o anoxia. Si la falta de oxígeno se mantuviese durante un periodo superior a 5 minutos, se podría dañar el cerebro del feto y causar retraso mental (Lagman, 2001).

El cordón umbilical suele tener dos arterias y una vena rodeadas por tejido conjuntivo mucoso (gelatina de Warton). Como los vasos umbilicales son más largos que el cordón, es común que se doblen o enrosquen. Frecuentemente forman bucles, originando nudos falsos sin importancia; sin embargo, en alrededor del 1% de los embarazos se forman nudos verdaderos en el cordón, que se pueden apretar y producir la muerte fetal por anoxia. En la mayoría de los casos, los nudos se forman durante el trabajo de parto como consecuencia del paso del feto a través de un bucle del cordón alrededor del feto (Lagman, 2001).

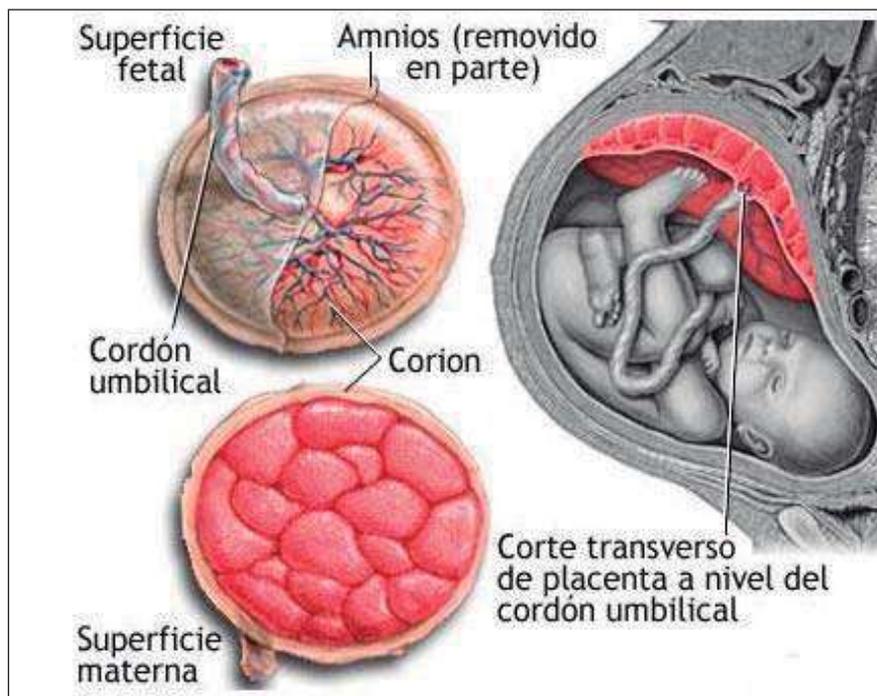


Figura 5. Estructura de la placenta donde se muestra algunos componentes de la misma, así como la superficie fetal y la superficie materna de la placenta (Moore y Persaud, 2004).

II. ANTECEDENTES

2.1. Hipertensión asociada al embarazo

La salud de la mujer, en especial durante el embarazo, demanda diagnósticos exactos y congruentes, sobre todo cuando presenta problemas agudos como las complicaciones hipertensivas de la gestación (Gómez y col., 2003).

La hipertensión arterial durante el embarazo se define como la elevación sostenida de la presión arterial \geq a 140 mm Hg sistólica /90 mm Hg diastólica, por lo menos en dos registros con un mínimo de 6 horas entre uno y otro; o bien, una elevación de 30 mm Hg o más en la presión sistólica y 15 mm Hg o más en la presión diastólica, sobre las cifras previas existentes en el primer trimestre del embarazo (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva., 2007).

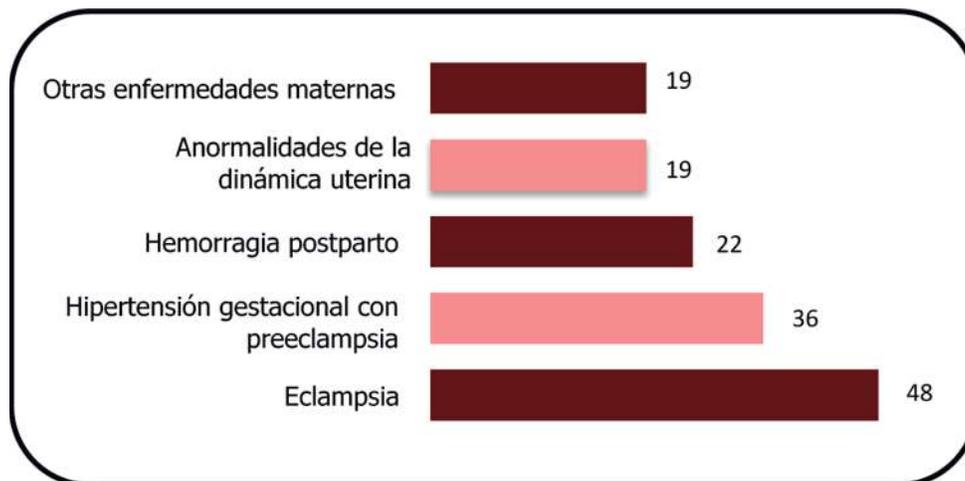
Los estados hipertensivos durante el embarazo se clasifican de acuerdo a la Secretaría de Salud (2007) en:

- Hipertensión gestacional
- Preeclampsia/Eclampsia
- Hipertensión crónica
- Preeclampsia agregada a hipertensión crónica

2.2. Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es un desorden específico del embarazo que se caracteriza por hipertensión y proteinuria después de la semana 20 de gestación (Dechend y col., 2003). Además, es una de las principales causas de mortalidad materna, fetal y neonatal en todo el mundo. Se ha estimado que del 5 al 7% de embarazos en el mundo está acompañado por este desorden, resultando en una enfermedad de alta morbilidad (Mutter y Karumanchi, 2008).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 8% y el 10% de las mujeres embarazadas en Latinoamérica sufren de PE. En México es la complicación más frecuente del embarazo y la primera causa de ingreso de pacientes embarazadas a las unidades de terapia intensiva debido a hemorragia masiva (Fig. 6) (Estrada-Altamirano y col., 2002). En Michoacán, las principales causas de muerte materna están asociadas a hemorragias obstétricas y a la preeclampsia-eclampsia. En el 2008, se registraron 40 defunciones en mujeres embarazadas o durante el parto o el puerperio; el grupo de edad más frecuente fue el de 25 a 29 años (Michocan.gob.mx, 2009).



(Modificada de Gómez y col., 2003)

Figura 6. Mortalidad materna según causa. Las causas más frecuentes de muerte se relacionan con hipertensión arterial; la principal es eclampsia con el 22% de las defunciones; sumando las cinco principales causas presentadas en la gráfica, se integra el 67% del total de este rubro (Gómez y col., 2003).

Algunas de las complicaciones fetales incluyen bajo peso al nacimiento, nacimiento prematuro y muerte. Algunas complicaciones maternas incluyen daños renales, el síndrome HELLP (Hemólisis, linfocitopenia, trombocitopenia y elevación de las enzimas hepáticas), daño al hígado, edema cerebral y muerte (Mutter y Karumanchi., 2008).

Son numerosos los factores de riesgo que predisponen a la preeclampsia los cuales incluyen condiciones médicas con el potencial para causar la enfermedad microvascular (ejemplo: preeclampsia previa, embarazos múltiples, hipertensión crónica, diabetes mellitus y enfermedades del riñón). Otros factores de riesgo están asociados con el embarazo por sí mismo o pueden ser específicos de la madre o el padre del producto (Tabla 1) (Wagner, 2004).

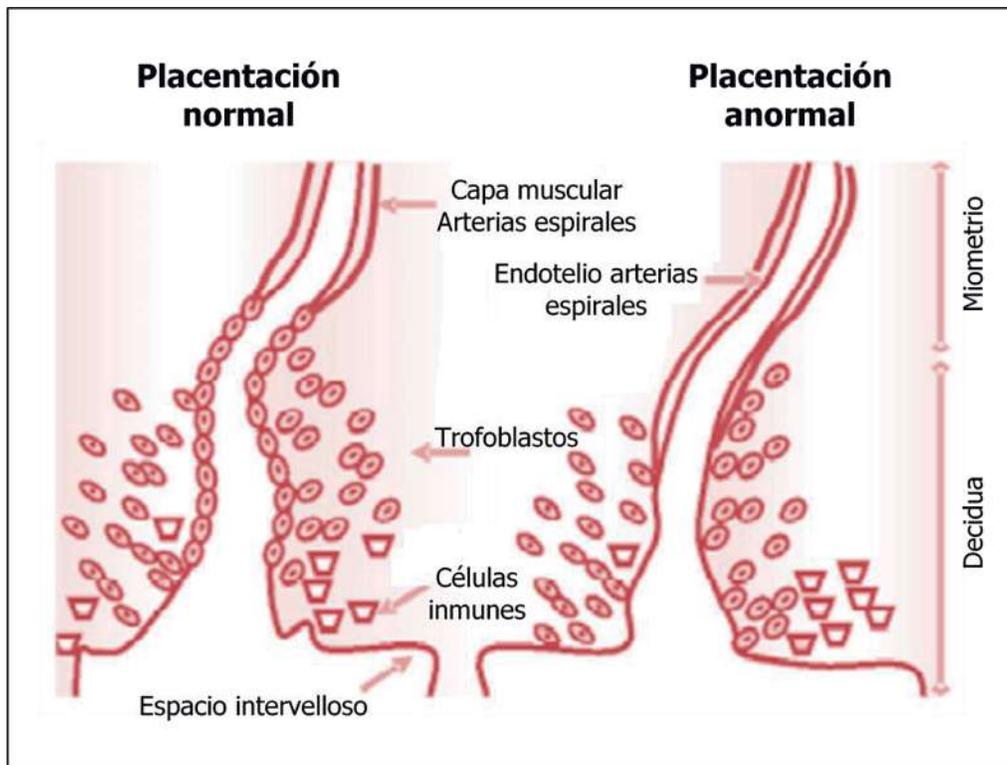
Aunque la causa exacta de la PE se mantiene sin conocer, varios mecanismos patofisiológicos se han implicados en el desarrollo de la preeclampsia. Estos mecanismos incluyen: disfunción endotelial, estrés oxidativo, activación de trombosis y el sistema de renina-angiotensina (RAS). La perfusión deficiente uteroplacentaria se ha reconocido como una característica en todos los síndromes de preeclampsia (Dinesh, 2005).

La PE se ha observado sólo en mujeres embarazadas conduciéndonos a la conclusión de que la placenta es necesaria para el desarrollo de la enfermedad. En casi todos los casos, la enfermedad desaparece poco después del parto cuando es expulsada la placenta, pero puede persistir si el tejido placentario se mantiene (Del Monaco y col., 2008).

TABLA 1. Factores de riesgo de la PE (Modificada de Wagner, 2004)

Factores asociados al embarazo	Factores específicos de la madre	Factores específicos del padre
<ul style="list-style-type: none"> •Anormalidades cromosomales •Hidropesía fetal •Embarazo multifetal •Anomalías congénitas •Infección del tracto urinario 	<ul style="list-style-type: none"> •Edad superior a 35 años •Edad inferior a 20 años •Raza negra •Historia familiar de preeclampsia •Condiciones medicas especificas: diabetes gestacional, diabetes tipo I, obesidad, hipertensión crónica, enfermedad renal •Estrés 	<ul style="list-style-type: none"> •Padre primerizo •Padre de un embarazo preeclámptico

Un evento clave en la placentación normal es la invasión de las arterias espirales maternas en la decidua y el miometrio por los citotrofblastos fetales (Mutter y Karumanchi, 2008). Normalmente las células del trofoblasto invaden el miometrio y la decidua materna en un proceso denominado pseudovasculogénesis. La migración de estos trofoblastos transforman las arteriolas espirales maternas que suministran la sangre materna a la placenta a partir de vasos de resistencia de calibre pequeño a vasos de grande calibre permitiendo un adecuado flujo sanguíneo materno. En la PE este proceso es desordenado y el trofoblasto fetal no invade adecuadamente el miometrio materno y las arteriolas espirales (Fig. 7) (Brosens y col., 1972). La incompleta conversión de las arterias espirales resulta en una persistente hipoxia e insuficiencia placentaria, disfunción endotelial, restricción del crecimiento uterino y preeclampsia (Jauniaux y col., 2006).



Modificada de Redman y col., 2005.

Figura 7. Esquema de las arterias espiraladas del útero en que se muestra el reemplazo del endotelio de la arteria por células del trofoblasto y la falta de este fenómeno en la placentación anormal, una de las causas de la preeclampsia (Redman y col., 2005).

2.3. Estrés oxidativo y nitrosativo

El estrés oxidativo y nitrosativo se definen como el desbalance que existe entre la cantidad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y los sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos (Seddon y col., 1994; Aejmelaus y col., 1997). De esta manera se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además, se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer, hipertensión arterial, etc. (Dorado y col., 2003).

Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ERO), las especies reactivas de hierro (ERI), así como las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (Dorado y col., 2003).

Podemos definir "radical libre" como cualquier molécula que es capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados en sus orbitales más externos. Un electrón se encuentra no apareado cuando aparece solo en un orbital. La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales libres y contienen únicamente electrones apareados (Romero, 1990).

Algunos ejemplos de los radicales libres más frecuentemente producidos por los sistemas biológicos que dan origen a especies reactivas son los mostrados en la tabla 2 (Dorado y col., 2003).

Tabla 2. Radicales libres (Dorado y col., 2003)

A: Radical libre	B: Reacción más común que los origina
$\cdot\text{O}_2^-$ Radical superóxido	$\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADPH}^+ + \text{H}^+ + 2 \cdot\text{O}_2^-$
$\cdot\text{OH}$ Radical hidroxilo	$\cdot\text{UQ} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{UQ} + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$
$\text{RO}_2\cdot$ Radical peroxilo	$\text{LH} + \text{RO}_2\cdot \rightarrow \text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$
$\text{RO}\cdot$ Radical alcoxilo o fenoxilo	$\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}\cdot$
$\text{L}\cdot$ Radical peróxido lípido	$\text{L O}_2\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$
$\cdot\text{NO}_2$ Radical de óxido nítrico	$\cdot\text{OH} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{NO}_2$

Tabla 2. (A) Ejemplo de los radicales libres más frecuentemente producidos por los sistemas biológicos que dan origen a especies reactivas y (B): reacciones más comunes que los origina (Dorado y col., 2003).

Durante el embarazo, la placenta es una fuente importante de la síntesis de prooxidantes y antioxidantes endógenos. El exceso crónico de la generación de radicales libres podría, en teoría, agotar los sistemas antioxidantes y resultar en el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN (Scholl y col., 2005).

El estrés oxidativo se ha implicado en la fisiopatología de la PE debido a que daña el endotelio vascular materno y hay evidencias de que el papel normal de esta capa celular es severamente comprometido. Los radicales libres liberados de la unidad fetoplacentaria mal perfundida inician la peroxidación lipídica por el ataque de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular, convirtiéndolos a peróxidos lipídicos y una variedad de metabolitos secundarios. La peroxidación descontrolada altera la fluidez y permeabilidad de la membrana, por lo tanto, los peróxidos lipídicos y los metabolitos secundarios, tales como el malondialdehído (MDA; un buen indicador de estrés oxidativo formado en primer lugar), son transportados a través de la circulación por lipoproteínas, causando daño en distintos tejidos. La peroxidación lipídica es balanceada en todas las células y tejidos por una variedad de mecanismos antioxidantes (Fiore y col., 2005).

Se ha observado que los niveles de isoprostano, un marcador de estrés oxidativo que induce vasoconstricción y el malondialdehído aumentan en placentas con PE comparados con placentas normales (Dechend y col., 2003).

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es la principal especie reactiva de oxígeno producida por la placenta el cual es generado en las células por la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y componentes de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (METC). El $O_2^{\cdot-}$ también puede ser generado bajo ciertas condiciones por vías enzimáticas que producen otras ERO incluyendo óxido nítrico, monóxido de carbono y peroxinitrito las cuales tienen efectos vasoactivos en la placenta (Myatt y Cui, 2004).

La función catalítica de la NADPH oxidasa, es la reducción de un electrón del oxígeno molecular, permitiendo la formación del $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 8) (Mizrahi y col., 2006).



Figura 8. Reacción en donde se muestra la producción de anión superóxido, por la reducción univalente del oxígeno usando a la NAD(P)H como donante de electrones (Mizrahi y col., 2006).

La NADPH oxidasa unida a la membrana celular es la principal fuente de generación de O_2^- , y tanto el O_2^- derivado de la NADPH oxidasa como el O_2^- derivado de la mitocondria constituyen la mayor parte de este radical en la vasculatura (Madamanchi y col., 2005).

La NADPH oxidasa es una enzima multimérica compuesta de un flavocitocromo b_{559} asociado a la membrana (un heterodímero que consta de dos subunidades, gp91^{phox} y p22^{phox}) y cuatro componentes citosólicos: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, y la Rac GTPasa pequeña (Mizrahi y col., 2006). Bajo una apropiada estimulación esas subunidades se ensamblan en la membrana celular.

Basados en las diferentes interacciones identificadas entre los componentes del sistema multienzimático, De Leo y Quinn (1996) han elaborado un modelo que explica la forma y la secuencia en que se produce el ensamblaje (Fig. 9) (Méndez y col., 1997). Este modelo se plantea de la siguiente manera:

1. En el reposo, el complejo citosólico se mantiene estabilizado a través de diferentes interacciones incluidas las homologías en tándem src3 (SH3). La región catiónica de p47^{phox} está secuestrada, lo que impide su interacción con p22^{phox} en la membrana.

2. En la activación, p47^{phox} se fosforila y pierde la unión intracatenaria por el dominio SH3. Esto expone los dominios SH3 y la región catiónica, lo que facilita su interacción con p67^{phox}, inicialmente. Después el complejo se transloca a la

membrana y se alinea a través de la interacción SH3 entre p47^{phox} y las regiones ricas en prolina de p22^{phox}. En este momento la región catiónica de p47^{phox} se libera de su unión a p67^{phox} y establece un enlace de alta afinidad con el flavocitocromo b558, lo que puede deberse a una mayor fosforilación de p47^{phox} o a la acción de Rac (Dang y col., 2001).

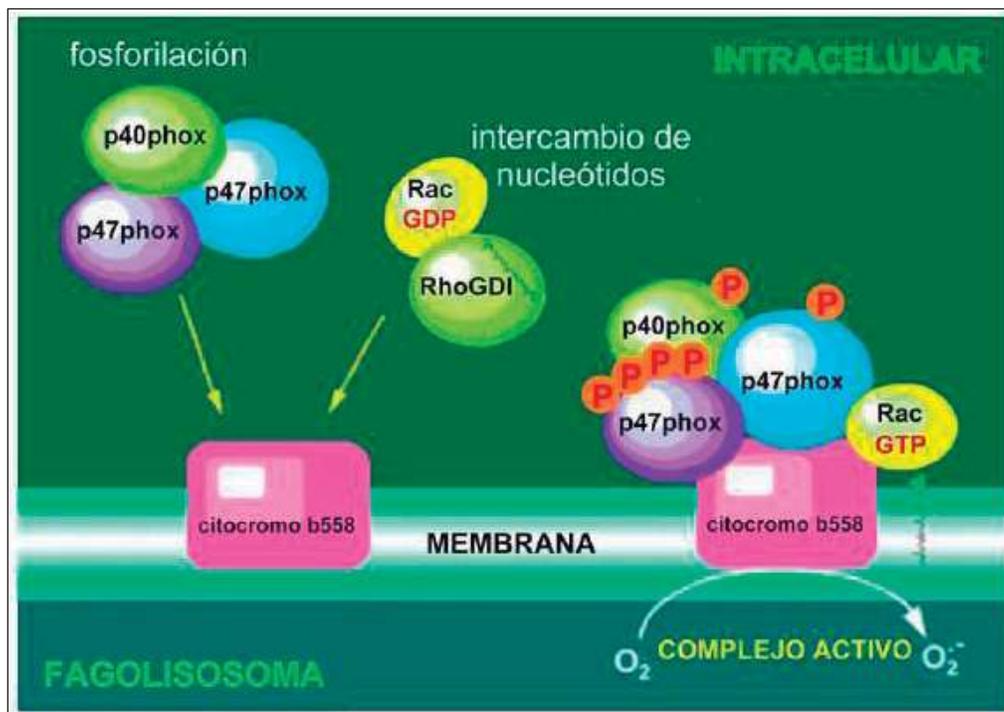


Figura 9. Ensamblaje de los componentes de la NADPH oxidasa para formar el complejo activo. A la izquierda se muestran los componentes de la NADPH oxidasa cuando la célula está en reposo. A la derecha se muestra el complejo activo. Para la formación del complejo activo p47 ha tenido que sufrir múltiples fosforilaciones en residuos de serina cercanos al C-terminal y Rac ha tenido que cambiar de un estado inactivo unido a GDP a un estado activo unido a GTP (Cascales, 2005).

Se han identificado varios homólogos de la subunidad gp91^{phox} en células somáticas por clonación molecular (Tabla 3). A estos homólogos de la subunidad gp91^{phox} se les conoce como NOX. Aunque la función fisiológica de los genes Nox no fagocíticos sigue siendo en gran parte desconocida, algunas de esas nuevas

isoformas Nox han demostrado generar especies reactivas de oxígeno en modelos de reoxigenación (Myatt y Cui, 2004).

Tabla 3. Características de genes Nox (Modificada de Myatt y Cui, 2004)

	Nox1	Nox2	Nox3	Nox4	Nox5
Cromosoma	X	X	6	11	15
Tamaño del péptido	564	569	569	578	566
Generación de ROS	Si	Si	Desconocido	Si	Si
Regulación	EGF	Ca ²⁺	Desconocido	Ang II	Ca ²⁺
Función	Proliferación	Defensa	Desconocido	Detección de O ₂	Proliferación

Tabla 3. Características de genes Nox. En esta tabla se muestra las principales características de genes Nox donde se puede observar que algunas isoformas Nox generan especies reactivas de oxígeno (Myatt y Cui, 2004).

Las NADPH oxidasas están presentes en la placenta y son excesivamente estimuladas en la preeclampsia. Mediante Western blot y expresión cuantitativa del RNAm se ha confirmado que p22, p47 y p67 phox son expresados en cantidades bajas en la placenta normal y son sobre-regulados en placentas de pacientes con PE (Dechend y col., 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que la PE está asociada con una predisposición a incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno mediadas por la NADPH oxidasa estimulada por agonistas (Lee y col., 2003).

Cuando el O₂^{·-} y el NO[·] se encuentran presentes, su interacción produce el anión peroxinitrito (ONOO⁻), un poderoso oxidante de una variedad de biomoléculas. El ONOO⁻ provoca peroxidación lipídica, inhibiendo el sistema de transporte de electrones mitocondrial y nitra residuos de tirosina; además, oxida grupos sulfidrilo

sobre proteínas alterando su actividad ó interrumpiendo vías de transducción de señales (Kossenjans y col., 2000).

La producción de ONOO^- puede ser indirectamente determinada por la presencia de residuos de nitrotirosina (Beckman y col., 1994). Se ha observado un incremento en la expresión de residuos de nitrotirosina, formados a partir de la interacción del ONOO^- con residuos de tirosina en la vasculatura fetal y estroma vellosa de placentas preeclámpticas. Esto sugiere la participación del ONOO^- en los procesos patológicos de placentas con PE (Myatt y col., 1996).

El ONOO^- puede ser representativo de una disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico, así como un iniciador de varios efectos nocivos en las células endoteliales. Sin embargo, es posible que el ONOO^- pueda tener un papel protector. Ya que se ha reportado que puede ser benéfico en la adhesión leucocitaria. Son necesarios más estudios para comprender los efectos vasculares del incremento del ONOO^- en mujeres con preeclampsia (Roggensack y col., 1999).

El óxido nítrico es sintetizado durante la conversión enzimática de la L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Fig. 10). Existen 3 isoformas de la NOS cada una codificada en genes diferentes, siendo dos constitutivas y una inducible por estímulos inflamatorios (Tabla 4). La NOS constitutiva descubierta en endotelio vascular se denominó eNOS (NOS III) y su gen se encuentra en el cromosoma 7q35-36 que contiene 26 exones, mientras que la isoforma constitutiva neuronal se encuentra en el cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, la cual fue denominada nNOS (NOS I); su gen se encuentra en el cromosoma 12q24.2-3 y contiene 29 exones. La isoforma inducible es conocida como iNOS (NOS II); y su gen se encuentra en el cromosoma 17cenq11.2 y contiene 26 exones. Existe otra isoenzima: la NOS mitocondrial (mtNOS) de la cual no se sabe si esta codificada en un gen independiente o es la nNOS con cambios postraduccionales que la translocan a la mitocondria. Aunque también se han

encontrado las isoformas eNOS e iNOS dentro de la mitocondria, recientemente existen evidencias que la mtNOS no es ninguna de las 3 isoformas descritas (Sánchez y col., 2004).

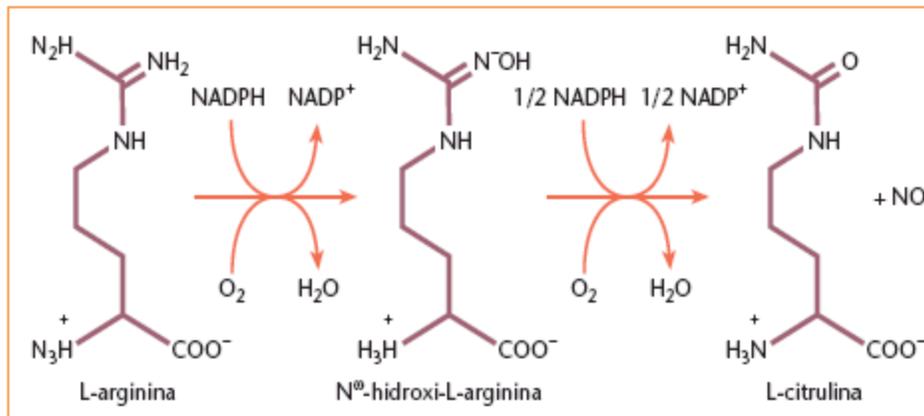


Figura 10. Biosíntesis del óxido nítrico. La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza una oxidación de 5 electrones de un nitrógeno guanidino de la L-arginina, para generar NO y L-citrulina. La L-hidroxiarginina es un intermediario que está estrechamente unido a la enzima. Ambos pasos en la reacción son independientes de calcio-calmodulina y esta reacción se potencia con la presencia de la tetrahydrobiopterina (Bredt y Snyder, 1994).

Características	NOS endotelial (eNOS) ≠(NOS tipo III, NOS-3)	NOS neuronal (nNOS) ≠(NOS tipo I, NOS-1, bNOS)	NOS inducible (iNOS) ≠(NOS Tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS)
Regulación primaria	Ca ²⁺ /calmodulina	Ca ²⁺ /calmodulina	Expresión génica
Localización subcelular	Membrana y citosol	Citosol?	Citosol y membrana
Cantidad de NO ^h producida	baja (pmolar)	baja (pmolar)	alta (μmolar)
Función	Señalización celular	Señalización celular	Citotóxica Citostática Citoprotectora

* Abreviaturas alternativas.
Tomado de Moncada S. Pharmacological Reviews 1997; 49: 137-42.

Tabla 4. Isoformas de las óxido nítrico sintasas. Principales características de las NOS cada una codificada en genes diferentes, dos constitutivas y una inducible por estímulos inflamatorios (Sánchez y col., 2004).

El óxido nítrico (NO) durante el embarazo es un factor importante de relajación del miometrio debido a que controla el flujo sanguíneo en el útero y la placenta, donde se mantiene el tono vascular basal y se atenúa la acción de vasoconstrictores (Hudicek-Martincinc y col., 2004).

Varios estudios sugieren que la concentración de nitritos en suero de sangre periférica de mujeres con PE es significativamente más alta que cuando se comparan con pacientes sanas. El NO se detectó en el suero utilizando la reducción de nitratos por la nitrito reductasa y la detección de nitritos empleando la reacción de Griess (Alemán y col., 2008).

En la PE, la actividad de la NOS fetoplacentaria y las concentraciones del NO en la circulación umbilical están alteradas. Algunos estudios han descrito una disminución en la actividad de la NOS placentaria; además se han encontrado concentraciones elevadas de nitrito/nitrato en la sangre de la vena umbilical de pacientes preeclámpticas comparadas con pacientes normales, sugiriendo un incremento de la producción de NO en la unidad fetoplacentaria en la PE (Schiessl y col., 2005).

Myatt y col. (1997) observaron un incremento en la expresión de la eNOS en el endotelio vascular de pacientes con preeclampsia, el cual se atribuye a una posible respuesta adaptativa al incremento del estrés inducido por la vasoconstricción a través de las células endoteliales en las placentas PE.

Se ha observado que la expresión de la iNOS en el tejido de placentas de mujeres con PE es significativamente más alta comparadas con las mujeres sanas. Este aumento probablemente se deba a una respuesta a la elevada presión arterial, por el papel del NO como vasodilatador. Sin embargo, a pesar de ello no se genera una respuesta vasodilatadora por el NO en la PE, por lo que probablemente hay un daño en el endotelio en los pacientes con esta patología (Alemán y col., 2008).

2.4. Sistemas antioxidantes

Puesto que tanto a nivel celular como tisular es necesario un control de las reacciones oxidativas asociadas con la producción de energía, biosíntesis, defensa contra infecciones y toxicidad química, este control está mediado por un sistema de defensa antioxidante presente en todas las células y formado por moléculas capaces de actuar como atraparoras de radicales libres (Romero, 1990).

Estos sistemas antioxidantes pueden clasificarse de acuerdo a Dorado y col. (2003) en dos grupos:

1.- Enzimáticos:

- Superóxido dismutasas (Cu/Zn-SOD y Mn-SOD)
- Citocromo oxidasa
- Catalasa
- Peroxidasas (Glutación peroxidasa y Glutación reductasa)

2.- No enzimáticos:

- Vitaminas A y E
- Ácido ascórbico
- Ácido úrico

La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, prolongando la vida media biológica del NO \cdot por el removimiento del anión superóxido. Existen tres isoenzimas de la SOD las cuales se encuentran ampliamente distribuidas. Una enzima intracelular dependiente de cobre/zinc (Cu/Zn-SOD ó SOD1) se encuentra predominantemente en el citoplasma y el núcleo, una SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD ó SOD2) se encuentra predominantemente en la mitocondria, mientras que una tercera

isoenzima se encuentra en la matriz extracelular (EC-SOD ó SOD3). La importancia de la SOD en el aumento de la actividad del NO se demostró por experimentos empleando el dietilditiocarbamato (DETCA), un inhibidor de la Cu/Zn-SOD, donde se observó que disminuye la relajación mediada por el NO del músculo liso vascular (Telfer y col., 1997).

Se ha observado una disminución en la actividad antioxidante de las superóxido dismutasas (SODs) en placentas de pacientes con PE. Recientemente se ha demostrado que la disminución de la actividad de la SOD en la PE puede ser atribuida a la ausencia de la SOD1 en de la labor de parto. Además, en la PE la labor de parto sobre regula actividad de la SOD1 en membranas fetales, así como a la SOD2 y la SOD3 en la placenta completa (Roland y col., 2010).

Por otro lado, se ha observado que hay una disminución en la expresión del RNAm de la SOD1 en las placentas preeclámpticas. Donde además, se ha especulado que el decremento de la actividad antioxidante puede resultar en un aumento en los niveles de peróxidos lipídicos en placentas con PE (Wang y Walsh, 1996).

Algunos estudios sugieren que la SOD3 se encuentra presente en elevadas concentraciones dentro de la matriz extracelular de las arterias sistémicas, donde se ha propuesto que regulan el tono vascular del músculo liso mediante el aumento de la biodisponibilidad del NO. La localización de la SOD3 alrededor de los vasos vellosos, sugiere que la SOD3 sirve potencialmente para proteger la vasculatura fetal del anión superóxido, tanto en embarazos normales como preeclámpticos. La distribución y la actividad de la SOD3 difiere entre mujeres con un embarazo normal y mujeres con PE, sugiriendo que la SOD3 no está involucrada en los cambios vasculares observados en la PE (Boggess y col., 1998).

La catalasa se localiza principalmente en los peroxisomas, la cual cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua (Romero, 1990).

En el suero de mujeres con PE se ha detectado una disminución en los niveles de catalasa comparados con el suero de mujeres sanas. Un desbalance entre oxidantes y antioxidantes en mujeres embarazadas podría ser útil en la identificación temprana de la PE y la suplementación con antioxidantes en las primeras semanas de gestación podría ser útil (Kolusari y col., 2008).

2.5. Proteínas G

Existen 2 clases de proteínas G dependiendo del peso y estructura molecular: las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G monoméricas (proteínas G de bajo peso molecular), conocidas como proteínas G debido a que unen nucleótidos de guanina (Kaziro y col., 1991). Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades (alfa, beta y gamma) que funcionan como transductores de los receptores de la membrana plasmática (Yamamoto y col., 1989).

Actualmente se han identificado alrededor de 100 proteínas G monoméricas en eucariontes, las cuales se han incluido en la superfamilia de Ras. Los integrantes de esta superfamilia se han agrupado en 5 familias: la familia Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran. Los miembros de Ras principalmente regulan eventos de transformación celular y expresión génica; los miembros de Rho regulan tanto la organización del citoesqueleto como la expresión génica; los miembros de Rab y Sar1/Arf regulan el transporte intracelular de vesículas y los miembros de Ran regulan el transporte nucleocitoplásmico durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular (Takai y col., 2001).

2.5.1. Proteínas Rho

La familia de las proteínas Rho en mamíferos consiste en 6 subfamilias: Rho (A, B y C), Rac (1 y 2), Cdc42 (HS y G25K), Rnd, RhoBTB y RhoT/Miro (Bustelo y col., 2007).

Como todos los miembros de la superfamilia Rho, estas proteínas funcionan como interruptores moleculares, ciclando entre un estado inactivo, en el que se encuentran unidas a GDP, y un estado activo en el que se hallan unidas a GTP (Fig. 11) (Takai y col., 2001). La actividad de las proteínas Rho es determinada por el radio de su forma de unión al GTP/GDP. La activación de estas proteínas debido al intercambio de GDP por GTP es promovido por factores de intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) mientras que las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs) promueven la hidrólisis del GTP, de tal modo conduciéndola a su inactivación (Bustelo y col., 2007). Su actividad también es controlada por las proteínas Rho-GDI (inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina), que mantienen a las proteínas Rho/Rac inactivas secuestradas en el citosol. Una vez activadas las proteínas Rho, estas pueden interactuar con varios efectores (Seasholtz y Brown, 2004) permitiendo la estimulación de cascadas de señalización que promueven respuestas celulares entre las que se incluyen la regulación del citoesqueleto, tráfico vesicular, crecimiento celular, citocinesis y la transcripción génica (Bustelo y col., 2007).

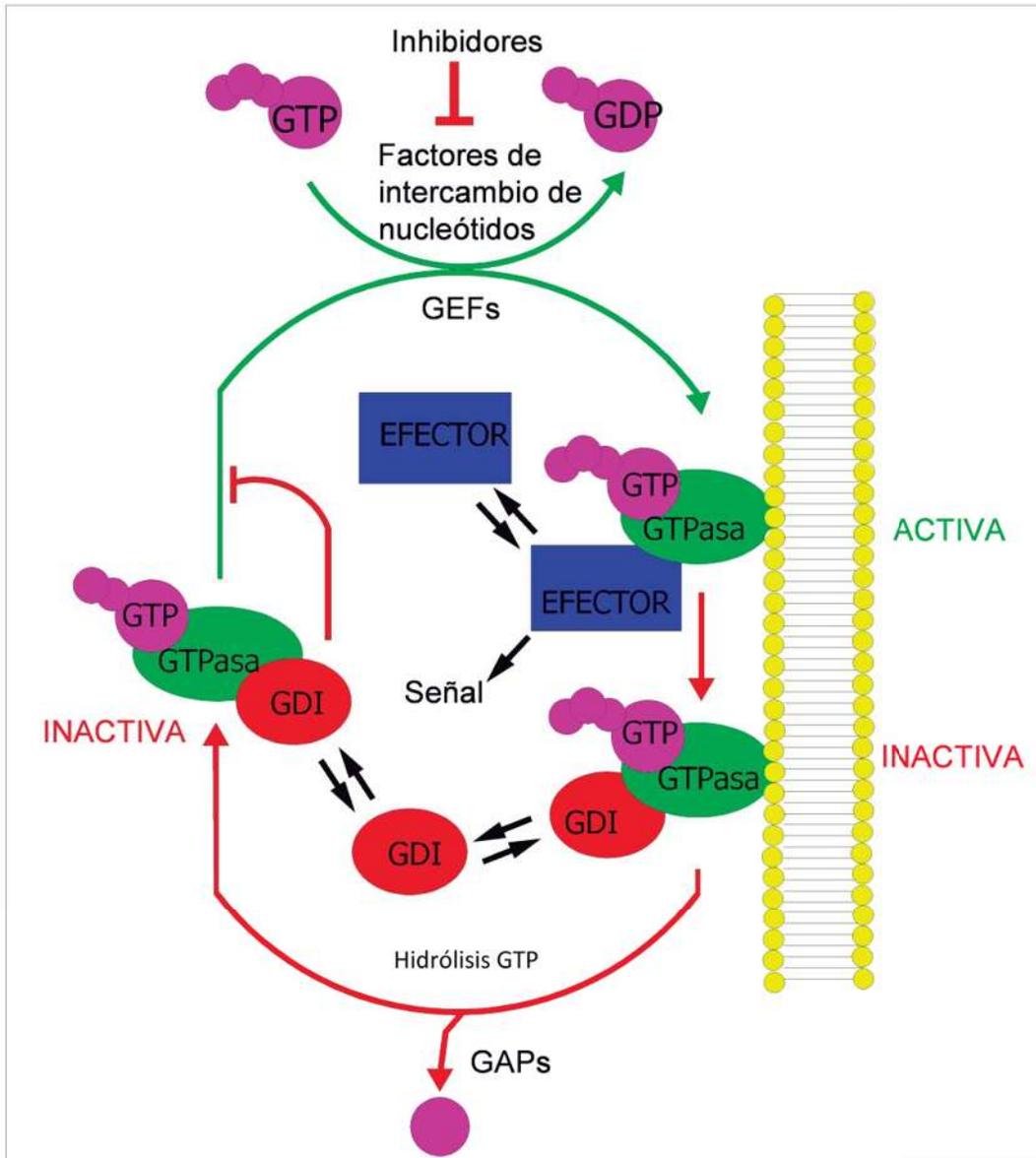


Figura 11. Ciclo de actividad de las Rho GTPasas. Esquema de las proteínas Rho ciclando entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP (Bustelo y col., 2007).

2.5.2. Proteínas RhoA, RhoB y Rac

El gen *rho* fue clonado por primera vez en 1985 del molusco *Aplysia* por Madaule y Axel. Al menos 3 genes se han encontrado en humanos, denominados *rhoA* (clona 1 o 12), *rhoB* (clona 6) y *rhoC* (clona 9) (Chardin y col., 1989), los cuales codifican para las proteínas RhoA, RhoB y RhoC, respectivamente. Estas proteínas tienen un peso molecular de alrededor de 21 kDa, y muestran entre sí un 85% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Ridley., 1995); mantienen pequeños bloques de secuencias altamente homólogas implicadas en la unión e hidrólisis del GTP y tienen secuencias C-terminal requeridas para la fijación a la membrana plasmática (Madaule y Axel, 1985).

RhoA induce la formación de fibras de estrés, adhesión celular, migración e invasión, crecimiento celular y expresión génica. Se ha observado que RhoB es una proteína inducible que participa en la inhibición del crecimiento celular e inducción de la apoptosis. Mientras que RhoC se expresa en ciertas formas de cáncer y su expresión se ha correlacionado con la invasión celular (Seasholtz y Brown, 2004).

Las proteínas Rho tienen importantes funciones en la fisiología vascular en condiciones normales. Recientemente se ha señalado que la activación del sistema transduccional Rho/Rho-cinasa es uno de los nuevos y principales mecanismos de vasoconstricción en la hipertensión arterial con potencial terapéutico (Johns y col., 2000). Estudios recientes sugieren que esta ruta de señalización desempeña un papel crucial en la regulación de la presión arterial *in vivo* (Jalil y col., 2005).

El sistema Rho A/Rho cinasa está estrechamente vinculado a prolongados estados de contracción del músculo liso, ó vasoconstricción, y a su vez a desordenes hipertensivos en modelos animales y humanos (Friel y col., 2006).

La contracción del músculo liso es regulada por la cinasa de la cadena ligera de miosina dependiente de calcio (MYLK). El aumento del calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) activa a la MYLK, la cual fosforila a la cadena ligera de miosina (MYL), aumentando

la actividad de la ATPasa de miosina para provocar un incremento en la tensión (Fig. 12). La fosfatasa de miosina puede revertir la fosforilación de la MYL para inducir un estado de relajación. Sin embargo, durante la contracción inducida por agonistas en una constante $[Ca^{+2}]_i$, la inhibición simultánea de la fosfatasa de miosina conduce al aumento de la fosforilación de la MYL y tensión de la misma. Ese incremento independiente de calcio en la fosforilación de miosina y la tensión se denomina "sensibilización de calcio". RhoA activa se une a Rho cinasa (ROCK1), la cual fosforila a la subunidad de unión a miosina (PPP1R12A) de la fosfatasa de miosina, inhibiendo su actividad. ROCK activada puede fosforilar a la cadena ligera de miosina (MYL) en Thr18 y Ser19. Ambas acciones permiten la sensibilización de calcio, permitiendo la contracción del músculo liso (Fig. 12) (Lartey y col., 2007).

Se conoce que la proteína RhoB en su forma activa es blanco de la proteína cinasa N (PKN1) la cual es un efector de Rho en los endosomas, donde regula el tráfico endosomal mediado por el receptor EGF. Además, RhoB estimula el ensamblaje de los filamentos de actina y regula el transporte endosomal a través de la proteína efectora DIAPH1. Algunos estudios genómicos han demostrado la sobre regulación de las proteínas RhoB y Rab durante el embarazo en el cerdo de Guinea. En células neuronales, RhoB es el principal regulador de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (Conway y col., 2004).

Lartey y col. en el 2007 mediante ensayos de Western blot determinaron la presencia de la proteína RhoB y su efector DIAPH1 en miometrio humano donde además los niveles del efector DIAPH1 aumentan en muestras de mujeres embarazadas, comparadas con mujeres normales, sugiriendo que esta proteína está implicada en la regulación de las interacciones actina-miosina durante el embarazo.

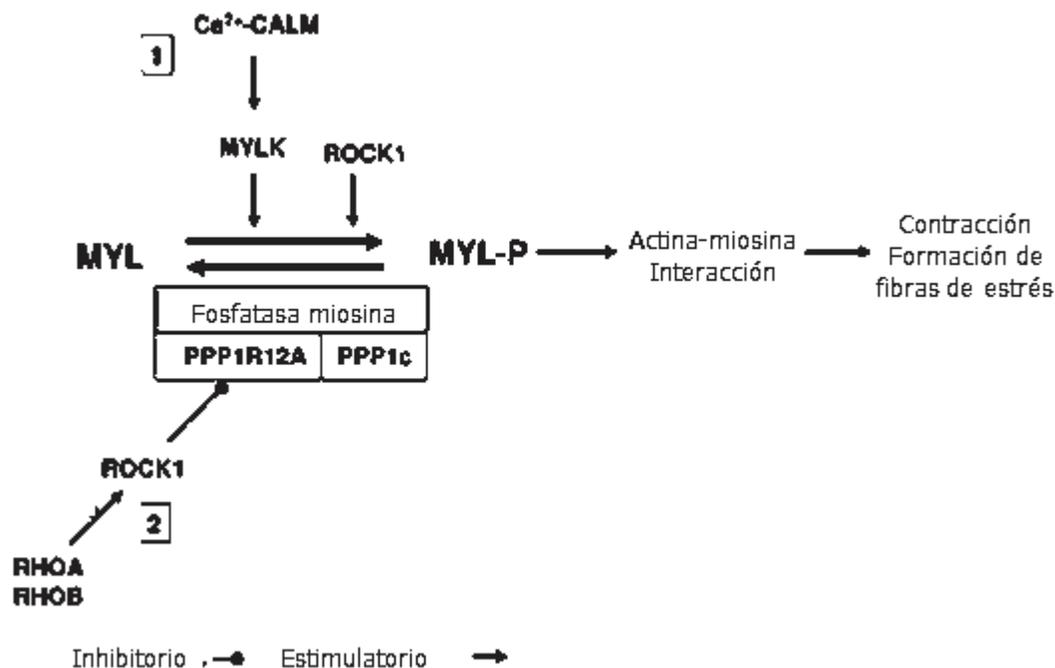


Figura 12. Esquema de algunas vías involucradas en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MYL) en el miometrio humano. El nivel de fosforilación de la MYL y la posterior interacción actina-miosina para producir la contracción, está principalmente determinada por el equilibrio entre MYLK y la actividad de la fosfatasa de miosina. (1) el incremento del $[Ca^{+2}]_i$ activa la calmodulina (CALM), que se une a la MYLK, resultando en la fosforilación de la MYL. La cadena ligera de miosina fosforilada interactúa con la actina polimerizada para provocar un aumento en la contracción y tensión. (2) Rho unido a GTP activa a Rho cinasa (ROCK1), la cual fosforila a la subunidad de la fosfatasa de miosina PPP1R12A, inhibiendo su actividad. Esta inhibición resulta en un aumento independiente de calcio en la fosforilación de la cadena ligera de miosina, la cual se denomina "sensibilización de calcio" (Modificada de Lartey y col., 2007).

Además, se ha observado que una disminución significativa de los niveles del RNAm de la proteína RhoA en la arteria umbilical en embarazos complicados con PE puede servir para contrarrestar la perfusión disminuida asociada con la fisiopatología de la PE (Friel y col., 2006).

Por otro lado, existe una fuerte relación entre la ruta de señalización de Rho y el óxido nítrico en la hipertensión. La inhibición de las proteínas Rho, mediante estatinas o la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* que regulan negativamente

la expresión de la eNOS (Laufs y Liao, 1998) y de la iNOS en células del músculo liso vascular (VSMC) en ratas (Muniyappa y col., 2000), sugiriendo que la inhibición de la proteína Rho estimula la producción del óxido nítrico en células VSMC.

2.5.3. Proteínas Rac

Las proteínas Rac son miembros de la familia Rho, existiendo varias isoformas Rac1, Rac1b, Rac2 y Rac3 (Matos y col., 2003). Estas desempeñan un papel importante en la migración celular induciendo morfología y migración celular, además de la expresión génica (Higashi y col., 2010). Es considerada como un mediador central en la fisiología cardiovascular, reactividad vascular y regulación de la presión sanguínea (Nowicki y col., 2001).

La proteína Rac puede interactuar con varias moléculas efectoras río abajo y desencadenar varias respuestas celulares. Por ejemplo, un efector es la proteína cinasa PAK que se activa mediante la interacción directa con Rac-GTP (Matos y col., 2003). Rac1 también puede estimular la actividad de la cascada de señalización de la cinasa del amino terminal de JUN (JNK), resultando en la fosforilación del factor de transcripción c-Jun y de esta forma aumentando su potencial de activación transcripcional y por lo tanto afectando la expresión de varios genes (Hannke-Lohmann y col., 2000). Algunas proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas o MAPK) en la vasculatura, como la JNK y la p38, son activadas por factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la Ang II. En células del músculo liso vascular, la Ang II induce la activación de p38, dependiente del peróxido de hidrógeno, probablemente derivado de la NADPH oxidasa. La activación de esta vía puede estar afectando el sistema vascular en diferentes niveles (Paravicini y Touyz, 2006).

El papel de Rac como regulador del complejo NADPH oxidasa fue descrito por primera vez en fagocitos y neutrófilos. Recientemente, un complejo NADPH oxidasa, regulado por Rac1, se ha caracterizado en células no fagocíticas, tales como el músculo liso vascular, cardiomiocitos y células endoteliales (Griendling y col., 2000). Rac es un componente esencial para el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa, la cual participa en la generación del anión superóxido, tanto en células fagocíticas como en no fagocíticas. La activación de la NADPH oxidasa no fagocítica, depende de la interacción de Rac1 con p67^{phox} (Moldovan y col., 2006).

Por otro lado, por medio de ensayos de "pull-down" se ha observado que la actividad de Rac1 disminuye en placentas de mujeres con PE, comparadas con placentas de mujeres normales. Donde además, la actividad de una vía de transducción de señales dependiente de JNK es regulada río abajo en la PE. Lo anterior sugiere que la regulación río abajo de esta vía de transducción de señales esté involucrada en la alteración de genes importantes para la invasión, proliferación y adhesión de células placentarias en la PE (Hannke-Lohmann y col., 2000).

III. JUSTIFICACION

Debido a que la preeclampsia es una de las principales causas de mortalidad materna y fetal en el mundo y a la falta de antecedentes de cómo las proteínas Rho y Rac, así como el estrés oxidativo y nitrosativo pueden participar en muestras de cotiledones y cordón umbilical para conllevar a la PE, motiva el presente trabajo de investigación.

IV. HIPÓTESIS

Los niveles de las proteínas G monoméricas Rho y Rac, así como del estrés oxidativo y nitrosativo aumentan en las placentas de pacientes preeclámpticas.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de las proteínas G monoméricas Rho y Rac, así como el estrés oxidativo y nitrosativo en placentas de pacientes preeclámpticas.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el estrés nitrosativo en placentas humanas con PE.
- Analizar el estrés oxidativo en placentas humanas con PE.
- Investigar los niveles de las proteínas RhoA, RhoB y Rac en placentas humanas para observar su posible relación con la PE.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se emplearon placentas de pacientes normotensas y con preeclampsia, proporcionadas de acuerdo al Convenio realizado con el comité de ética del Hospital General "Dr. Miguel Silva" de la Ciudad de Morelia, Michoacán. Las placentas se colectaron inmediatamente después del parto y se les agregó un buffer de fosfatos (PBS) pH 8.3, el cual contenía NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM y se colocaron en un contenedor especial con hielo para su traslado al laboratorio.

6.2. Obtención de muestras

Se tomaron muestras de cotiledón y cordón umbilical de la porción materna y fetal, vena y arteria umbilical y se depositaron en solución PBS realizando varios lavados para retirar el exceso de sangre presente en las muestras. Posteriormente, las diferentes muestras se cortaron en trozos pequeños en un buffer de lisis pH 8.0 (Dodecilsulfato sódico (SDS) 0.1%, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl 0.5 mM, MgCl₂ 0.5 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 0.5%) y se homogenizaron. Enseguida se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y del sobrenadante se obtuvieron las alícuotas para cada una de las diferentes muestras. Finalmente los homogenados totales se mantuvieron en refrigeración a 4°C para la realización de los experimentos posteriores (Fig. 13).

6.3. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col. (1951). Este es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade el reactivo de Folin que forma un complejo coloreado con las

proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas.

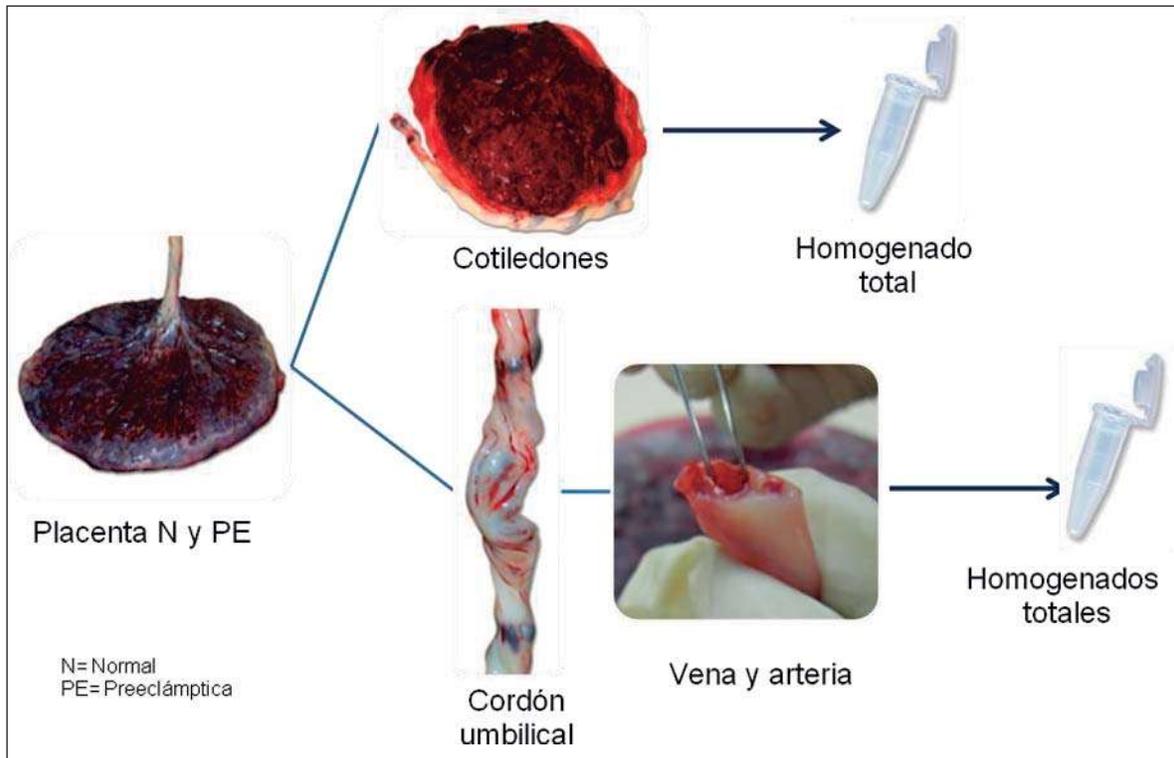


Figura 13. Esquema representativo del material biológico empleado y de la obtención de las muestras.

El procedimiento se realizó por duplicado. Para realizar la curva de calibración, se preparó una batería de tubos con los volúmenes correspondientes a 0, 12.5, 25, 75 y 100 μg de albúmina sérica bovina a partir de una solución patrón de 0.5 mg/ml y se completó un volumen de 200 μl en cada tubo con agua desionizada. Para las diferentes muestras de placentas de pacientes normotensas y con preeclampsia, se colocaron 10 μl de muestra a 190 μl de agua desionizada. Tanto para la curva de calibración como para las diferentes muestras se les adicionó 1ml de solución C, la cual consta de la solución A (Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0.4% y tartrato de Na^+ al

0.21%) y la solución B (CuSO_4 al 0.5%); se agitó y se dejó reposar por 10 minutos. Finalmente, se añadieron 100 μl del reactivo de Folin (1:1) y se dejó reposar por 30 minutos. Después, se leyó la muestra a una absorbencia de 660 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18, usando un blanco para ajustar el aparato y se registraron las lecturas obtenidas. La curva de calibración se graficó en Excel (Microsoft Office®) y por interpolación se estimó la concentración de proteína de las muestras, empleando la línea de interpolación.

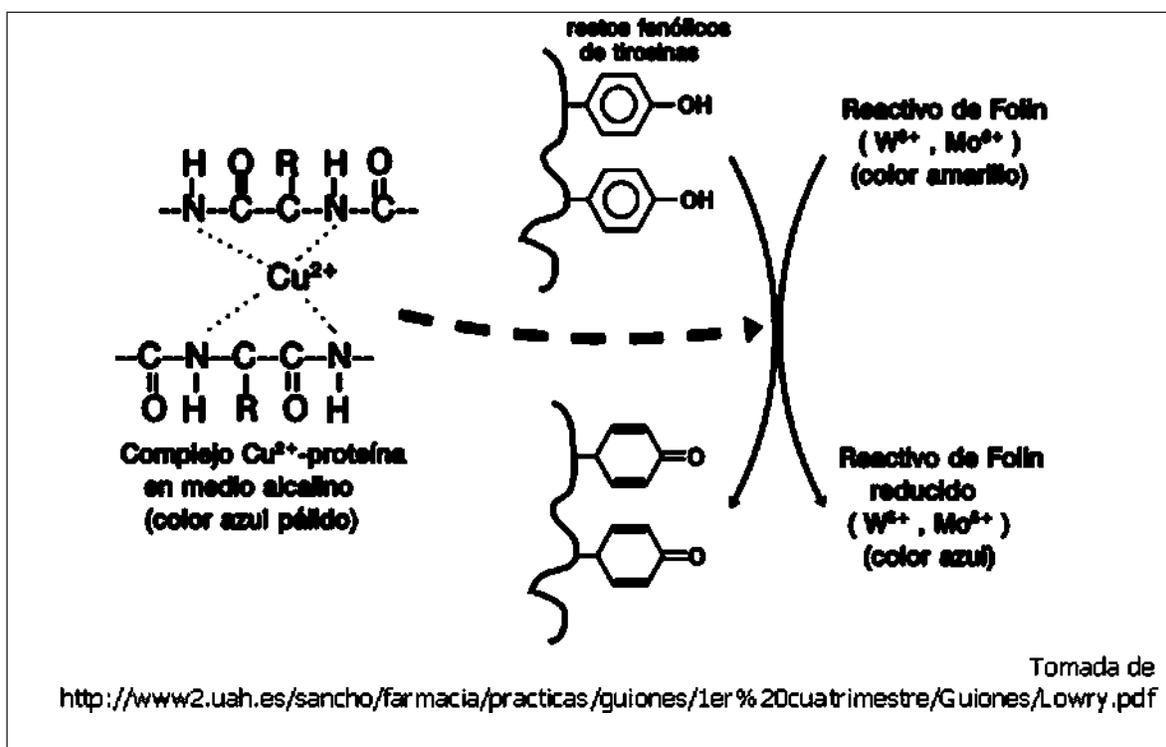


Figura 14. Reacción entre la proteína y los reactivos. Esquema ilustrativo de la reacción del reactivo de Folin con la proteína indicando el color resultante de dicha interacción.

6.4. Determinación de los niveles de óxido nítrico

La determinación del óxido nítrico se realizó de manera indirecta por medio de la cuantificación de nitritos por el método de Griess, de acuerdo al protocolo descrito

por Green y col. (1982), el cual consiste en una reacción de diazotización para la determinación espectrofotométrica de nitritos formados por la oxidación espontánea del NO· bajo condiciones fisiológicas (Fig. 15).

La detección límite para este método está entre 0.1 y 1µM de nitritos. Se cuantifica el nitrito, ya que es uno de los principales productos, estables y no volátiles del óxido nítrico.

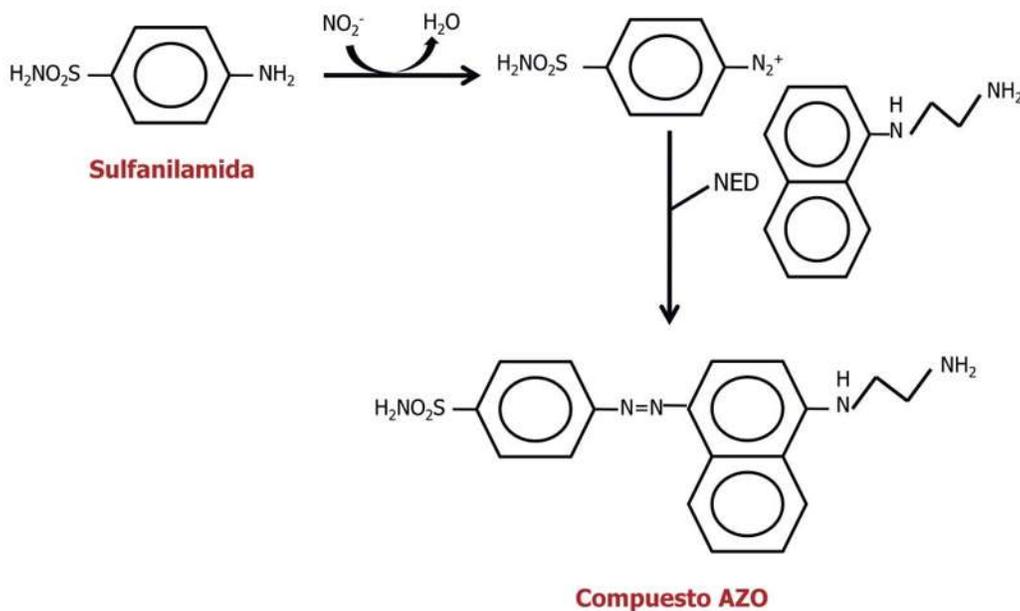


Figura 15. Determinación indirecta del óxido nítrico. En la figura se muestra la reacción de nitritos (producto del metabolismo del $\cdot\text{NO}$) con el reactivo de Griess, conformado por sulfanilamida y N-1-naftiletilendiamina (NED), produciendo un compuesto AZO, el cual puede ser leído a 540 nm (Green y col., 1982).

El ensayo se realizó agregando 0.50 mg de proteína de los diferentes homogenados totales y medio base (PBS) a un volumen final de 2 ml y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 20 µl de HClO_4 al 0.4% y se dejaron permeabilizar por 10 min. Después se centrifugaron a 5 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se tomaron 1400µl del sobrenadante y se agregaron 200µl de reactivo de Griess; a continuación, se

incubaron durante 30 min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Y se leyeron a una absorbencia de 540 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18.

Para determinar la concentración del óxido nítrico se preparó una curva estándar empleando concentraciones conocidas de NaNO_2 para obtener concentraciones en el rango μM . La concentración del óxido nítrico se calculó mediante la grafica obtenida de la curva patrón. La curva de calibración se graficó en Excel (Microsoft Office®) y por interpolación se estimó la concentración de proteína de las muestras, empleando la línea de interpolación.

6.5. Determinación de TBARS

Para determinar los niveles de estrés oxidativo de manera indirecta se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportado por Buege y Aust, (1978). Este método cuantifica la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés) entre las que ese encuentra el malondialdehído, el principal producto de la oxidación de lípidos (Fig. 16).

Este experimento se realizó por duplicado. Se preparó una batería con las muestras a utilizar, agregando a cada tubo 1 mg de proteína de cada homogenado y medio PBS hasta completar un volumen de 1 ml. Se dejaron incubar por 30 min con agitación suave (80 rpm). Enseguida a cada tubo se les adicionaron 2 ml de una solución ácida (ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N). Posteriormente, los tubos se calentaron en baño Maria hirviendo y a los 15 min se retiraron para ser enfriados en hielo. Enseguida se centrifugaron a 7500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se tomó 1.5 ml del sobrenadante y se leyó a una absorbencia de 532 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados fueron expresados en nmolas de TBARS/mg de proteína y se calcularon en base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído ($1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

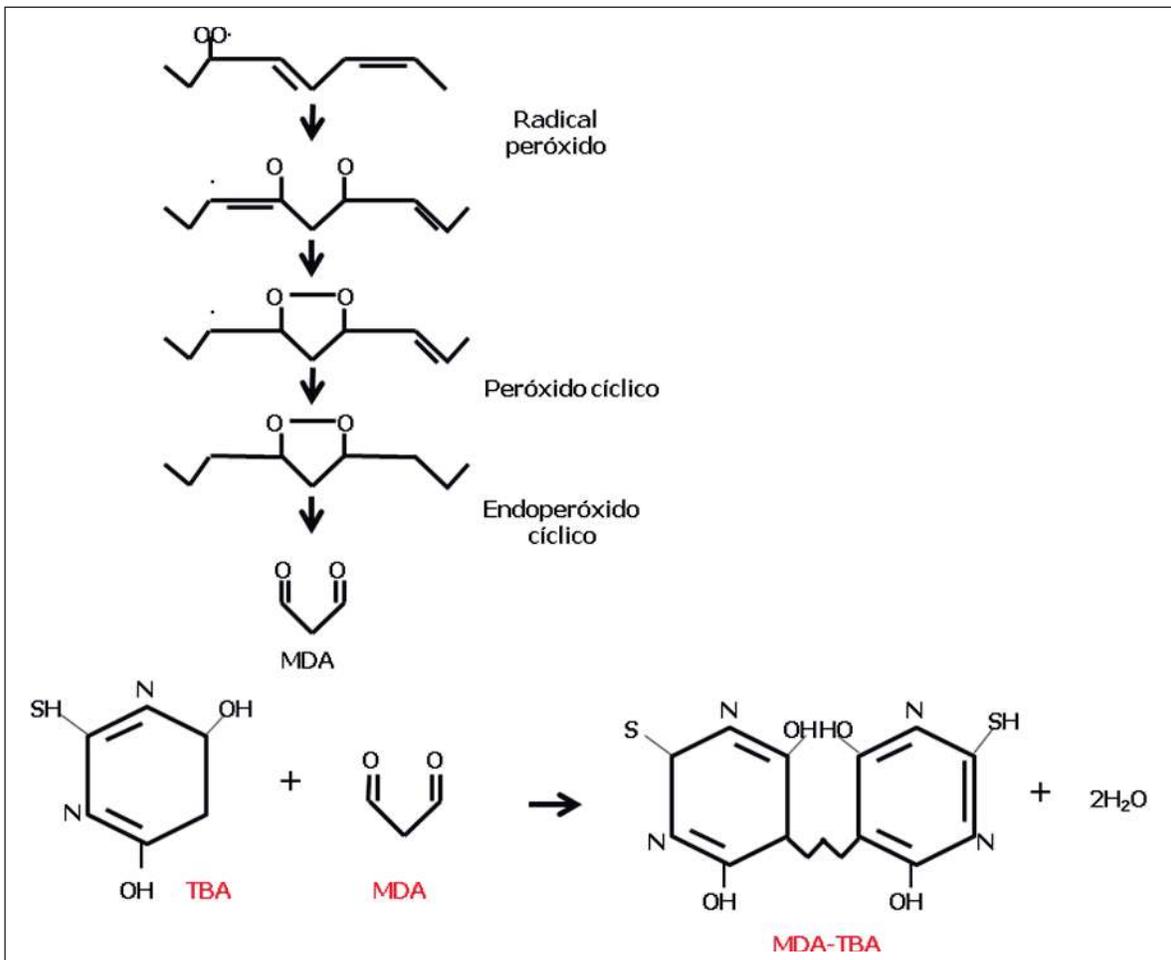


Figura 16. Diagrama de la formación del aducto MDA-TBA. En la figura se muestran las reacciones involucradas en la formación del malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la lipoperoxidación. Se muestra también la reacción entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar el aducto MDA-TBA, el cual se cuantifica espectrofotométricamente a 532 nm (Buege y Aust, 1978).

6.6. Inmunodetección de las proteínas RhoA, RhoB, Rac, SOD, catalasa, eNOS y perfil de nitrosilación

La inmunodetección se realizó de acuerdo al protocolo de Laemmli y col. (1970) y Towbin y col. (1979). Se tomaron 30 μ g de proteína del homogenado total de cada una de las diferentes muestras y se mezclaron con 6 μ l de buffer de solubilización (Tris/HCl 0.5M pH 6.8, SDS 8%, glicerol 40%, 2-Mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 100 μ l y H₂O cbp 5ml) y se hirvieron a 95°C durante 3 minutos. En

seguida se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 13 %) a 100v durante 2 hrs aproximadamente. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinildieno), empleando una solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) a 100 v durante 1h. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar una óptima transferencia y posteriormente se destiñeron con buffer de lavado TBS-T pH 7.6 (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) durante 5 minutos.

Las membranas ya lavadas se incubaron con TBST-leche al 5% durante toda una noche para bloquear sitios inespecíficos. Transcurrido este tiempo las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T, pH 7.6, durante 10 min cada lavado. En seguida, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-RhoA, anti-RhoB, anti-Rac1, anti-eNOS, anti-SOD2 y anti-catalasa (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución 1:2000 en 10 ml de TBST-leche al 5% durante 90 min en agitación moderada. Posteriormente, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T pH 7.6 durante 10 min cada lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal IgG acoplado a peroxidasa a una dilución 1:4000 en 10 ml de TBST-leche al 5% durante 90 min, y mediante quimioluminiscencia se determinó la interacción antígeno-anticuerpo (Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology), exponiendo las membranas a una película de rayos X para su posterior revelado y fijación durante 30 segundos. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3400C (Hewlett Packard) y las imágenes se guardaron en una computadora. La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ®).

6.7. Perfil de nitrosilación

Se emplearon 30 µg de proteína y se mezclaron con 6 µl de buffer de solubilización. Posteriormente se hirvieron a 95°C durante 3 minutos. Las proteínas

se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (10%) durante 90 min a 100 V. Una vez completada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF empleando un equipo de transferencia húmeda (Bio-Rad) durante 60 min a 100V. Una vez transferidas, las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar una óptima transferencia, posteriormente se destiñeron con buffer de lavado TBS-T pH 7.6. Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T-gelatina (USB) al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua.

A continuación las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo anti-3-nitrotirosina (anti-3-NT, Molecular Probes) en TBST-T-gelatina al 1% a una dilución 1:2000 por una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa (goat anti-rabbit; Southern Biotech) en TBS-T-gelatina 1% a una dilución 1:4000. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10 min. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology), exponiendo las membranas a una película de rayos X para su posterior revelado y fijación durante 30 segundos. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3400C (Hewlett Packard) y las imágenes se guardaron en una computadora. La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ®).

VII. RESULTADOS

7.1. Datos clínicos de las pacientes

Para verificar que nuestro material biológico (placenta) procedía de mujeres con un embarazo normal y mujeres con preeclampsia, el hospital general “Dr. Miguel Silva” de la Ciudad de Morelia, Michoacán, nos proporcionó algunos datos clínicos que nos permitió corroborar que las placentas provenían de pacientes con PE y fueran viables para nuestra investigación (Tabla 5 y 6).

Pacientes Normales	Edad	Presión sanguínea (120/90 mmHg)
1.- Paciente 1	17	120/70
2.- Paciente 2	25	115/70
3.- Paciente 3	34	120/70
4.- Paciente 4	38	120/80

Tabla 5. Datos clínicos de mujeres con un embarazo normal. Donde se muestra que la edad varía desde 17 a 38 años de edad y la presión arterial es menor o igual a 120/90 mmHg para cada una de las diferentes pacientes.

Pacientes Preeclámpticas	Edad	Presión sanguínea (120/90mmHg)	Proteinuria (>300mg/ml)
1.- Paciente 1	19	190/130	700mg/ml
2.- Paciente 2	23	160/100	380mg/ml
3.- Paciente 3	29	150/90	900 mg/ml
4.- Paciente 4	30	140/100	350mg/ml

Tabla 6. Datos clínicos de mujeres con preeclampsia. Donde se muestra que la edad varía desde 19 a 30 años, la presión arterial es mayor a 120/90 mmHg y existe una presencia de proteinuria mayor a 300 mg/ml, las cuales son las principales características de la preeclampsia.

Una vez corroborado que nuestras placentas provenían de mujeres con un embarazo normal y con preeclampsia, se obtuvieron las muestras de cotiledón y cordón umbilical tanto de la porción materna como fetal, vena y arteria umbilical. Esto con el objetivo de poder analizar las posibles diferencias que pudiesen existir entre cada una de las muestras normales y preeclámpticas.

7.2. Presencia del estrés nitrosativo en placentas de mujeres sanas y con PE

7.2.1. Determinación de los niveles del óxido nítrico

Con la finalidad de analizar el estrés nitrosativo en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con preeclampsia, se determinó la concentración del óxido nítrico de manera indirecta por el método de Griess, de acuerdo al protocolo descrito por Green y col. (1982).

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos, donde podemos observar un aumento significativo en los niveles del óxido nítrico en las muestras de cordón umbilical porción materna (99.50%), cordón umbilical porción fetal (99.97%), vena (99.99%) y arteria (99.98%) de mujeres con PE comparadas con las muestras control.

Los resultados obtenidos nos sugieren que el aumento del óxido nítrico en muestras de placentas de pacientes con PE se pueda deber a una respuesta a la elevada presión arterial, por el papel que tiene el óxido nítrico como vasodilatador y que a pesar de ello no se esté generando una respuesta vasodilatadora por el NO[•] en la PE, por lo que probablemente hay un daño en el endotelio de las mujeres con esta patología.

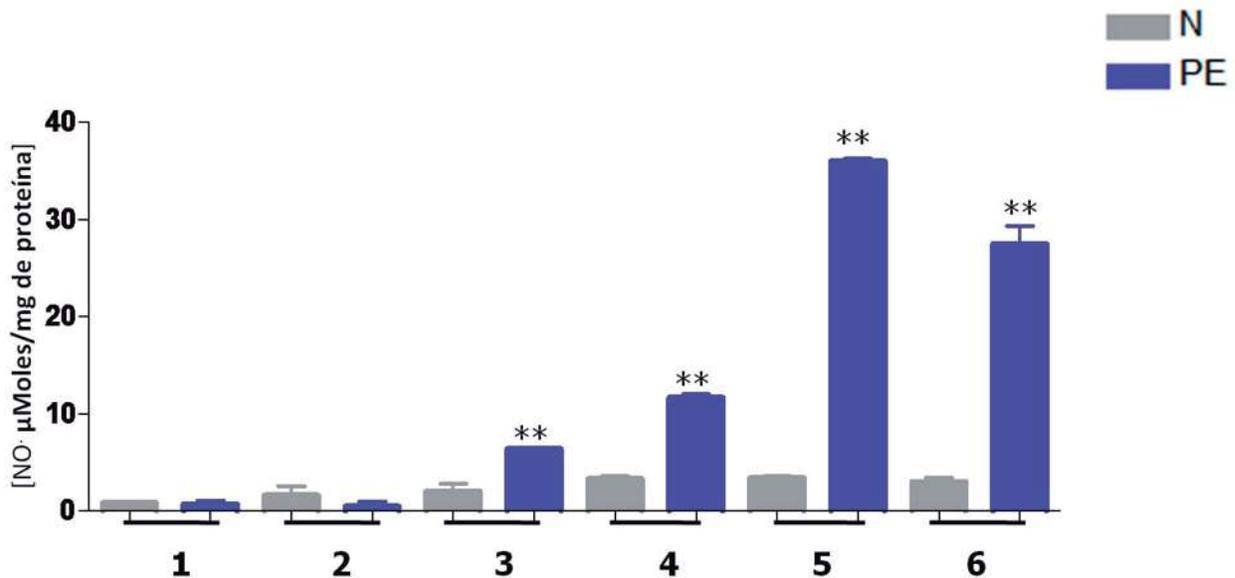


Figura 17. Niveles del óxido nítrico en muestras de placentas de mujeres con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules las muestras de placentas de pacientes con preeclampsia (PE). El experimento fue repetido tres veces con resultados similares y los datos fueron procesados para la obtención de la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó por medio de la t de Student para datos no pareados. Un valor de * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ fueron estadísticamente significantes.

7.2.2. Perfil de nitrosilación

El óxido nítrico puede reaccionar rápidamente con otras moléculas como el anión superóxido para formar el ONOO⁻, un poderoso oxidante, la producción de peroxinitrito puede ser indirectamente analizada, determinando la presencia de residuos de nitrotirosina. Para corroborar si las proteínas se encontraban nitrosiladas por acción del peroxinitrito, se realizó un Western blot empleándose el anticuerpo 3-NT.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18. En el panel (A) se muestra el perfil de nitrosilación, donde podemos observar varias proteínas nitrosiladas con diferentes pesos moleculares tanto en las muestras de placentas de pacientes con PE como en las muestras de placentas de pacientes normales, en el panel (B) se muestra la placa correspondiente a la inmunodetección de la tubulina con un peso molecular esperado de 55 kDa como control de carga. En el panel (C) se muestra el análisis densitométrico correspondiente al perfil de nitrosilación, en el cual podemos apreciar que la nitrosilación de proteínas es mayor en cordón umbilical porción materna y fetal, vena umbilical y arteria umbilical comparadas con los cotiledones porción materna y fetal. Además, existen algunas tendencias a aumentar los niveles de nitrosilación en las muestras de cotiledón porción materna, cordón umbilical porción materna y cordón umbilical porción fetal de placentas de mujeres con PE comparadas con las mujeres sanas. Estos resultados nos sugieren que el óxido nítrico efectivamente está reaccionando con el anión superóxido para formar peroxinitrito, y que algunas muestras son más susceptibles a ser nitrosiladas como la vena y arteria umbilical, además de que el aumento de la nitrosilación de proteínas puede estar relacionado con procesos patológicos como la PE.

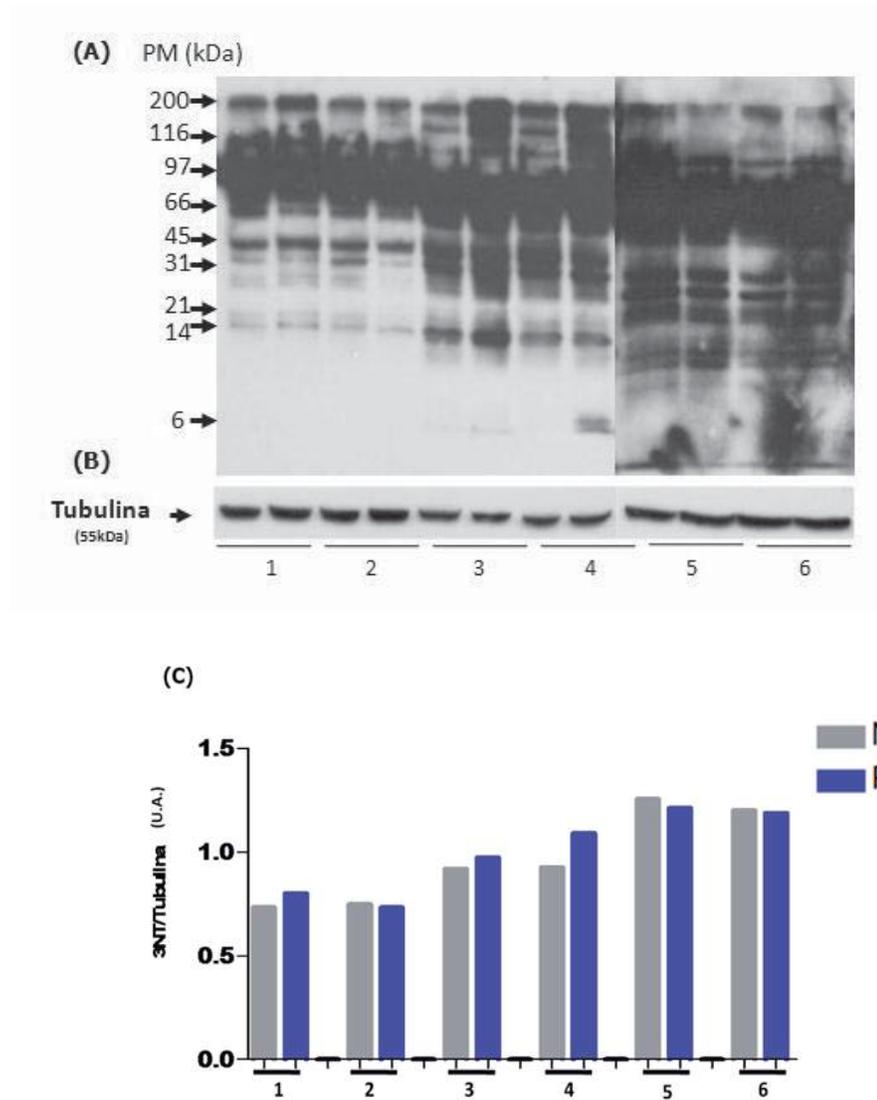


Figura 18. Perfil de nitrosilación de proteínas en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Inmunodetección de las proteínas nitrosiladas en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE, (B) niveles de tubulina como control de carga y (C) análisis densitométrico correspondiente al perfil de nitrosilación. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules las muestras de placentas de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

7.2.3. Inmunodetección de la eNOS

Con la finalidad de determinar si la síntesis de óxido nítrico en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE provenía de la eNOS se realizó un Western blot para analizar si los niveles de esta proteína variaban.

Con los datos obtenidos en el Western blot se realizó el análisis densitométrico, dividiendo el número de píxeles de la proteína entre el número de píxeles del control de carga. La gráfica obtenida se muestra en la figura 19 panel (A), en el cual se puede observar que existen algunas tendencias a aumentar los niveles de la eNOS en muestras de cotiledón porción materna y arteria umbilical de muestras de placentas de mujeres con PE comparadas con sus respectivos controles. En el panel (B) se muestra la inmunodetección de tubulina que nos sirvió como control de carga, observándose una banda con un peso molecular esperado de 55 kDa, donde se puede notar que la carga para las diferentes muestras de placentas de pacientes normales y con PE es homogénea lo que garantiza que la inmunodetección de nuestras proteínas no se debe a una carga inadecuada de la muestra. En el panel (C) se muestra una banda con un peso molecular esperado de 140 kDa correspondiente a la proteína eNOS, donde la intensidad de la banda es mayor tanto en el cotiledón porción materna y cotiledón porción fetal comparado con el cordón umbilical porción materna y fetal, vena umbilical y arteria umbilical.

Estos resultados nos sugieren que la síntesis del óxido nítrico observada en nuestro experimento anterior no proviene en su totalidad de la eNOS y que probablemente otras óxido nítrico sintasas (iNOS y nNOS) estén participando en la producción del óxido nítrico.

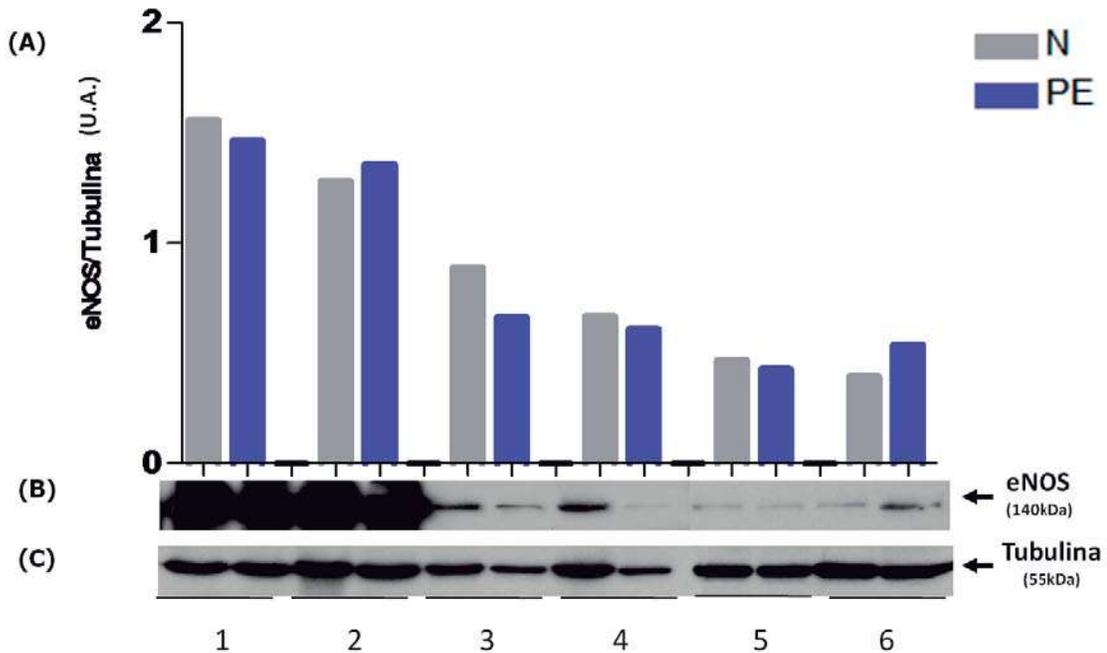


Figura 19. Inmunodetección de los niveles de la eNOS en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Análisis densitométrico correspondiente a la inmunodetección de la eNOS, (B) Inmunodetección de los niveles de la eNOS en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE y (C) niveles de tubulina como control de carga. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules las muestras de placentas de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

7.3. Análisis del estrés oxidativo en placentas de mujeres sanas y con PE

7.3.1. Determinación de los niveles de lipoperoxidación

Para analizar el estrés oxidativo en placentas de mujeres sanas y con PE se determinaron los niveles de lipoperoxidación por medio de una modificación del método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) reportado por Buege y Aust, (1978). En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa un aumento significativo en los niveles de TBARS en las muestras de cordón umbilical porción materna (99.83%) y arteria umbilical (97.95%) de placentas de mujeres con PE comparadas con las placentas de mujeres sanas. Estos datos nos indican la presencia del estrés oxidativo en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. Siendo unas muestras más susceptibles al aumento del estrés oxidativo, sugiriéndonos que este aumento puede estar relacionado con la fisiopatología de la PE, probablemente por daño el endotelio vascular. Por otro lado, (Fig. 20) se puede apreciar que no existen diferencias significativas en las muestras de cotiledón porción materna y porción fetal, cordón umbilical porción fetal y vena umbilical entre los grupos comparados; este resultado nos puede sugerir que los mecanismos de defensa antioxidante probablemente estén actuando de tal manera que no se produzca un incremento en la peroxidación de lípidos, contrarrestando así el daño por estrés oxidativo.

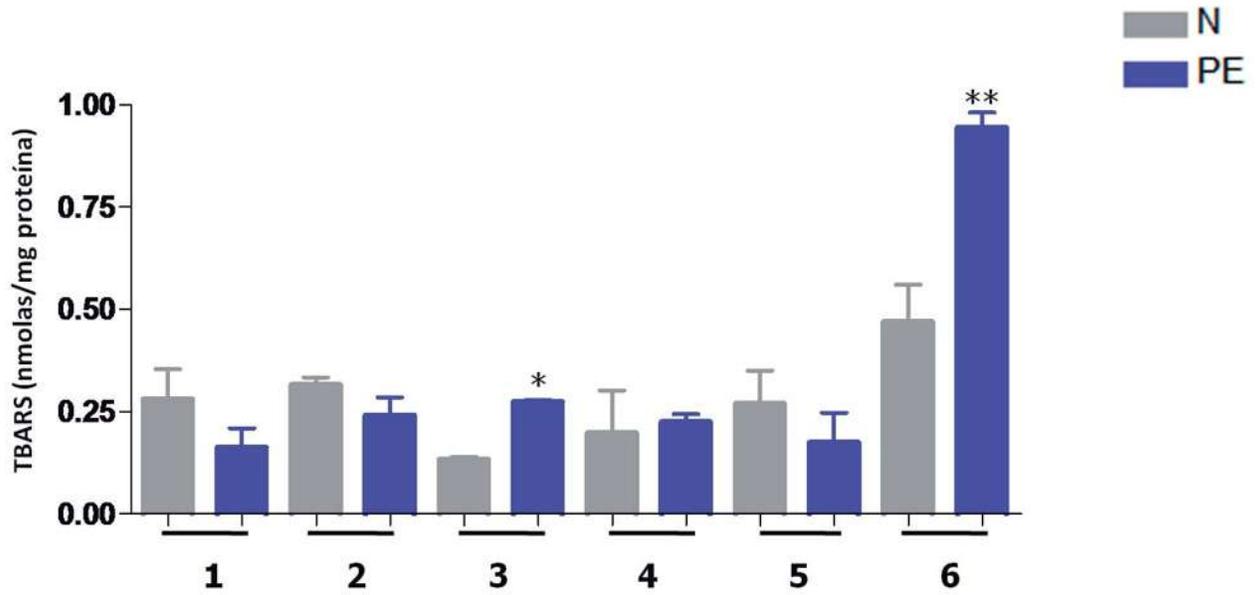


Figura 20. Niveles de TBARS en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules las muestras de placentas de pacientes con preeclampsia (PE). El experimento fue repetido tres veces con resultados similares y los datos fueron procesados para la obtención de la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó por medio de la t de Student para datos no pareados. Un valor de * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ fueron estadísticamente significantes.

7.3.2. Presencia de los niveles de la SOD2

Con la finalidad de determinar si los mecanismos de defensa antioxidante variaban entre las muestras de placentas de mujeres sanas y con PE, se analizaron los niveles de la SOD2 mediante Western blot.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21. En el panel (A) se muestra el análisis densitométrico correspondiente de la inmunodetección de la SOD-2, en el cual se puede observar que existen tendencias a aumentar los niveles de la SOD-2 principalmente en cordón umbilical porción fetal y porción materna, así como en arteria umbilical de placentas de mujeres con PE comparadas con sus respectivos controles. En el panel (B) se muestra una banda con un peso molecular esperado de 27 kDa correspondiente a la proteína SOD-2 en cada una de las muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. En el panel (C) se muestra la inmunodetección de la tubulina que sirvió como control de carga, observándose una banda con un peso molecular esperado de 55 kDa, donde se puede notar que la carga para las diferentes muestras de placentas de pacientes normales y con PE es homogénea lo que garantiza que la inmunodetección de nuestras proteínas no se debe a una carga inadecuada de la muestra.

Los resultados obtenidos nos muestran una expresión diferencial en los niveles de SOD-2, y las tendencias a aumentar en los niveles de la SOD-2 en muestras de placentas de mujeres con PE comparadas con sus respectivos controles, nos sugieren que la capacidad antioxidante está actuando de tal manera que no permite el aumento de la peroxidación de lípidos; sin embargo, las tendencias a disminuir los niveles de la SOD-2 en muestras de placentas de mujeres con PE, nos indican una menor capacidad de dismutación del anión superóxido, implicando así un mayor daño oxidativo expresado por otros mecanismos diferentes a la lipoperoxidación.

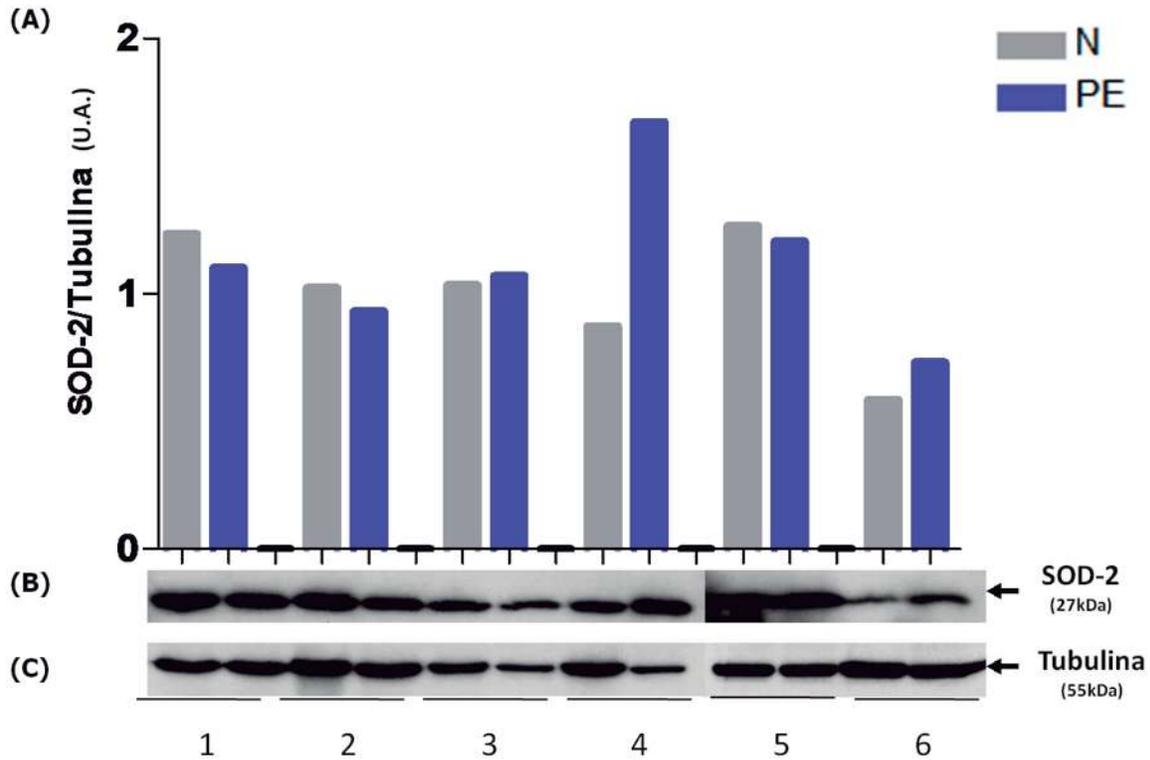


Figura 21. Inmunodetección de la SOD-2 en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Análisis densitométrico correspondiente a la inmunodetección de la SOD-2. (B) Inmunodetección de los niveles de la SOD-2 en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE y (C) niveles de la tubulina como control de carga. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

7.3.3. Determinación de los niveles de la catalasa

La catalasa rompe el producto generado por la SOD-2 (H_2O_2), desdoblándolo al peróxido de hidrógeno en agua. Con la finalidad de observar la capacidad antioxidante de la catalasa en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE se determinaron sus niveles mediante Western blot.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22. En el panel (A) se muestra el análisis densitométrico correspondiente de la inmunodetección de la catalasa, en el cual se puede observar que existe una tendencia a disminuir los niveles de la catalasa en todas las muestras de placentas de mujeres con PE comparadas con las placentas de mujeres sanas. En el panel (B) se muestra una banda tenue con un peso molecular esperado de 60 kDa correspondiente a la catalasa en cada una de las muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. En el panel (C) se muestra la inmunodetección de la tubulina que sirvió como control de carga, observándose una banda con un peso molecular esperado de 55 kDa, donde se puede notar que la carga para las diferentes muestras de placentas de pacientes normales y con PE es homogénea lo que garantiza que la inmunodetección de nuestras proteínas no se debe a una carga inadecuada de la muestra.

Estos resultados nos sugieren que la capacidad antioxidante al menos por esta enzima se ve comprometida en procesos patológicos como la preeclampsia, permitiendo así el aumento del estrés oxidativo.

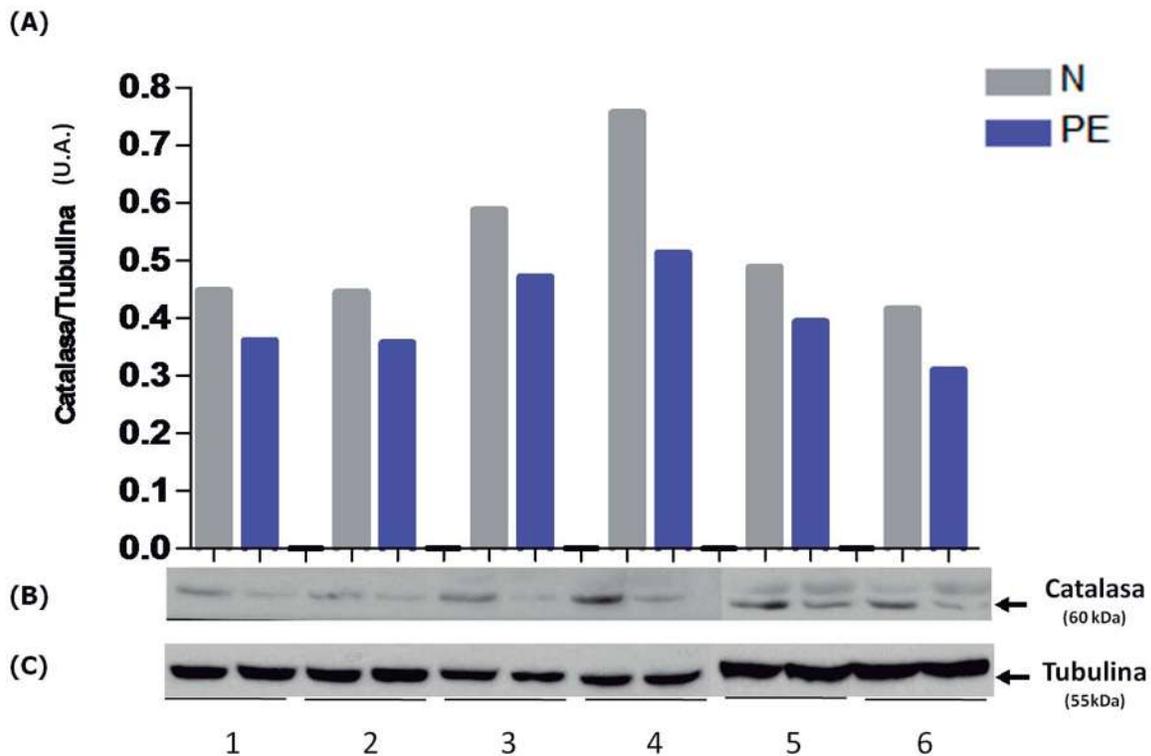


Figura 22. Inmunodetección de la catalasa en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Análisis densitométrico correspondiente a la inmunodetección de la catalasa. (B) Inmunodetección de los niveles de la catalasa en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE y (C) niveles de la tubulina como control de carga. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

7.4. Presencia de los niveles de las proteínas RhoA, RhoB y Rac en placentas de mujeres sanas y con PE

7.4.1. Inmunodetección de las proteínas RhoA y RhoB

Para observar la posible relación de las proteínas RhoA y RhoB en la PE, se determinaron los niveles de expresión mediante Western blot en las muestras de placentas de mujeres sanas y con PE.

Con los datos obtenidos en el western blot se realizó un análisis densitométrico, dividiendo el número de píxeles de la proteína entre el número de píxeles del control de carga. La gráfica obtenida se muestra en la figura 23 panel (A) donde podemos observar que existe una ligera tendencia a disminuir los niveles de la proteína RhoA en las muestras de cotiledón porción materna y porción fetal, vena umbilical y arteria umbilical de placentas de pacientes con PE, comparados con sus respectivos controles. En el panel (B), se puede apreciar una banda con un peso esperado de 25 kDa correspondiente a la proteína RhoA en muestras de cotiledón porción materna y porción fetal, cordón umbilical porción materna y porción fetal, vena y arteria umbilical de muestras de placentas de pacientes normales y con PE. En el panel (C) se muestra una banda con un peso molecular esperado de 55 kDa correspondiente a la tubulina, utilizada como control de carga, observándose que la carga para las diferentes muestras de placentas de pacientes normales y con PE es homogénea lo que garantiza que la inmunodetección de nuestras proteínas no se debe a una carga inadecuada de la muestra.

Por otro lado, la determinación de la proteína RhoB se muestra en la figura 24. En el panel (A) se muestra el análisis densitométrico correspondiente de la inmunodetección de la proteína RhoB, en el que se puede que existe una tendencia a disminuir los niveles de la proteína RhoB en muestras de cotiledón porción materna y fetal, cordón umbilical porción fetal, vena umbilical y arteria umbilical de las placentas de mujeres con PE comparadas con sus respectivos controles, mientras que en el panel (B) se muestra la presencia de una banda de

aproximadamente 26 kDa correspondiente a la proteína RhoB en cada una de las diferentes muestras de las placentas de mujeres sanas y con PE. panel (C) podemos observar una banda de aproximadamente 55 kDa correspondiente a la tubulina que sirvió como control de carga, donde se puede notar que la carga para las diferentes muestras de placentas de pacientes normales y con PE es homogénea lo que garantiza que la inmunodetección de nuestras proteínas no se debe a una carga inadecuada de la muestra.

Los resultados obtenidos nos indican la presencia de la proteína RhoA en las muestras de placentas de mujeres sanas y con preeclampsia y además que los niveles disminuidos de la proteína RhoA en las muestras de placentas de pacientes con PE probablemente se deba a una respuesta compensatoria al aumento de la presión sanguínea observada en esta patología debido a que la proteína RhoA está implicada en la contracción de las células del músculo liso vascular asociado con la hipertensión. El mismo caso sucede con la proteína RhoB, sugiriéndonos que esta proteína puede estar participando también en la regulación de la contracción de las células del músculo liso vascular en la PE.

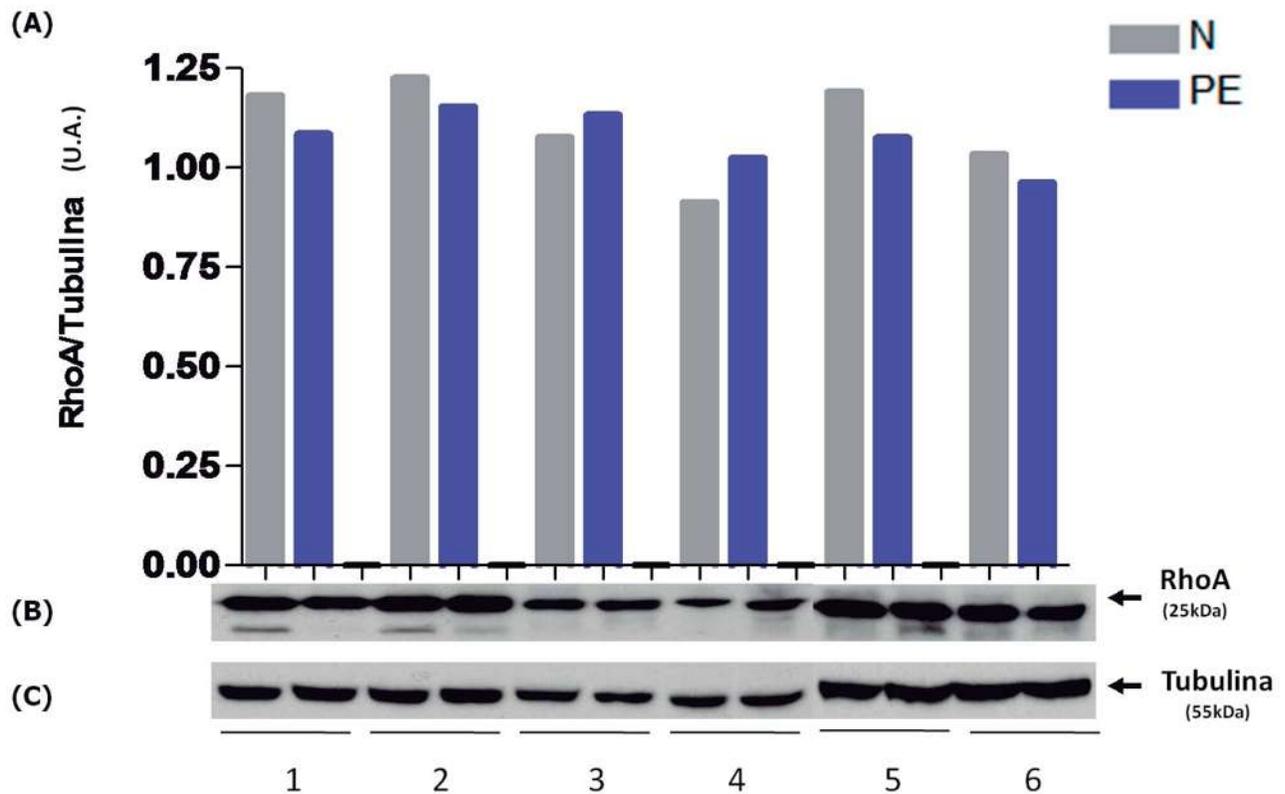


Figura 23. Inmunodetección de la proteína RhoA en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Análisis densitométrico correspondiente a la inmunodetección de la proteína RhoA. (B) Inmunodetección de los niveles de la proteína RhoA en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE y (C) niveles de la tubulina como Control de carga. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

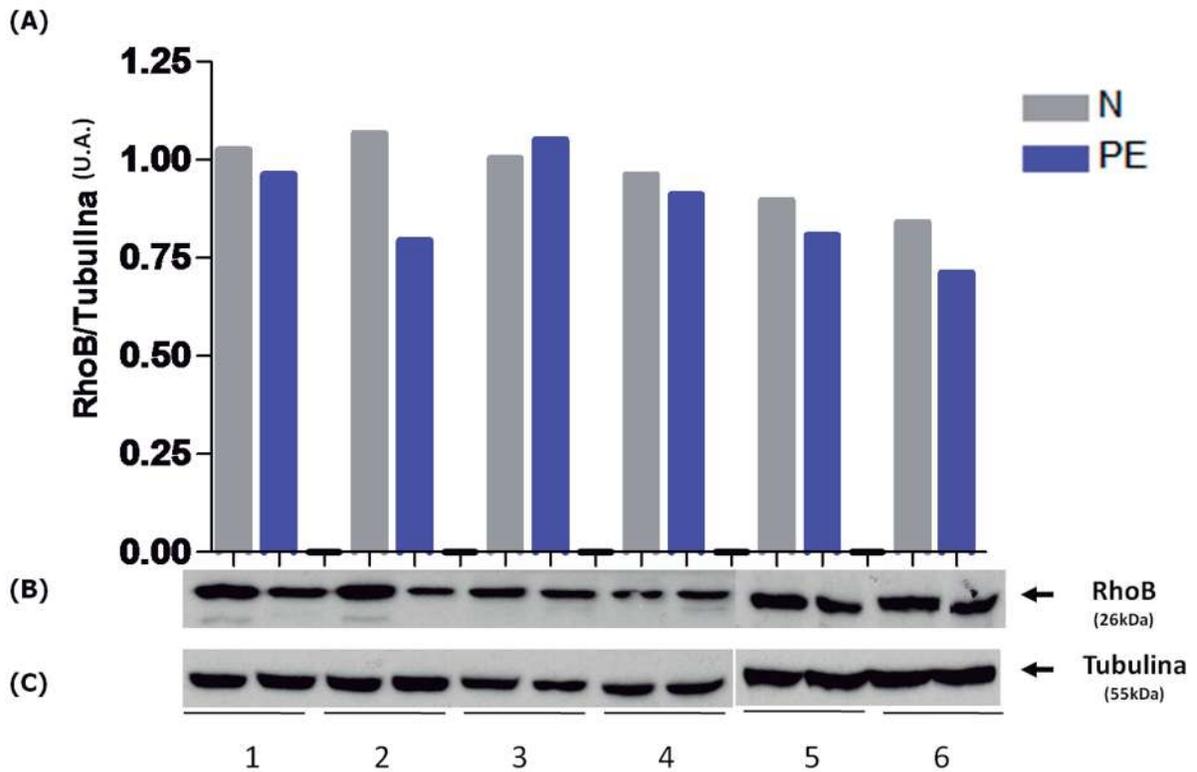


Figura 24. Inmunodetección de la proteína RhoB en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Análisis densitométrico correspondiente a la inmunodetección de la proteína RhoB. (B) Inmunodetección de los niveles de la proteína RhoB en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE y (C) niveles de la tubulina como Control de carga. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

7.4.2. Inmunodetección de la proteína Rac

Con la finalidad de observar la posible relación de la proteína Rac en la PE, se determinaron sus niveles mediante Western blot en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 25. En el panel (A) se muestra el análisis densitométrico correspondiente de la inmunodetección de la proteína Rac, en el cual podemos observar que existe una tendencia a disminuir los niveles de la proteína Rac en las muestras de cotiledón porción materna y fetal, cordón umbilical porción materna y fetal, vena y arteria umbilical de placentas de pacientes con PE, comparados con sus respectivos controles. En el 25 panel (B) se aprecia una banda con un peso esperado de 24 kDa correspondiente a la proteína RhoA en las muestras de cotiledón porción materna y fetal, cordón umbilical porción materna y fetal, vena y arteria umbilical de placentas de pacientes normales y con PE. En el panel (C) se muestra una banda de aproximadamente 55 kDa correspondiente a la tubulina, utilizada como control de carga, observándose que la carga para las diferentes muestras de placentas de pacientes normales y con PE es aproximadamente homogénea lo que garantiza que la inmunodetección de nuestras proteínas no se debe a una carga inadecuada de la muestra.

Los resultados obtenidos nos indican la presencia de la proteína Rac en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. Además, nos sugiere que los niveles disminuidos de la proteína Rac probablemente favorezcan la disminución de las especies reactivas de oxígeno provenientes de la NADPH oxidasa, contrarrestando así el aumento del estrés oxidativo en la preeclampsia.

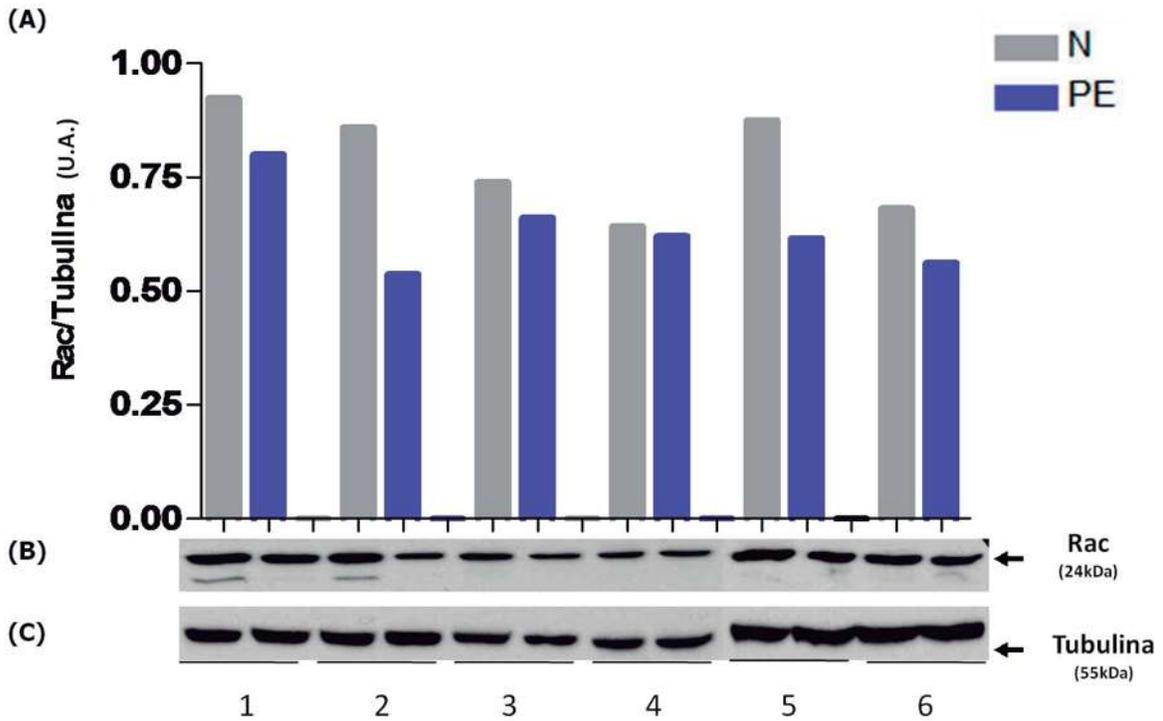


Figura 25. Inmunodetección de la proteína Rac en muestras de placentas de mujeres sanas y con PE. (1) Cotiledón porción materna, (2) cotiledón porción fetal, (3) cordón umbilical porción materna, (4) cordón umbilical porción fetal, (5) vena umbilical y (6) arteria umbilical. (A) Análisis densitométrico correspondiente a la inmunodetección de la proteína Rac. (B) Inmunodetección de los niveles de la proteína Rac en las diferentes muestras de placentas de mujeres sanas y con PE y (C) niveles de la tubulina como Control de carga. En barras grises se representan las muestras de placentas de pacientes normales (N) y en barras azules de pacientes con preeclampsia (PE). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

VIII. DISCUSIÓN

La preeclampsia (PE) es la principal causa de muerte materna en México (<http://www.spps.gob.mx>), y en Michoacán las principales causas de muerte materna están asociadas a hemorragias obstétricas y a la preeclampsia-eclampsia (Michocan.gob.mx, 2009). En la actualidad no se conoce con certeza cuál es la causa específica que conlleva a la PE, sin embargo se sabe que algunos factores fisiopatológicos como la disfunción endotelial, el sistema renina angiotensina y el estrés oxidativo y nitrosativo han sido implicados en la etiología de la misma (Dinesh, 2005).

En este trabajo se estudio el estrés oxidativo y nitrosativo, así como la presencia de las proteínas RhoA, RhoB y Rac en la etiología de la PE.

El óxido nítrico es un factor importante de relajación del miometrio debido a que controla el flujo sanguíneo en el útero y la placenta (Hudicek-Martincinc y col., 2004). En el presente trabajo de investigación, encontramos que existe un aumento significativo en los niveles del óxido nítrico en muestras de cordón umbilical porción materno y fetal, vena y arteria umbilical de placentas de mujeres con PE, comparadas con sus respectivos controles (Fig. 17). Estos resultados están en concordancia con varios investigadores, quienes han reportado un incremento en la producción del NO[•] en la circulación placentaria, fetal y/o materna en estados de PE. Además de que este aumento probablemente se deba a una respuesta a la elevada presión arterial, por el papel del NO[•] como vasodilatador. A pesar de ello, no se está generando una respuesta vasodilatadora por el NO[•] en la PE, por lo que probablemente hay un daño en el endotelio en las pacientes con esta patología (Aleman y col., 2008).

Existen evidencias de que el NO[•] es inactivado por el anión superóxido limitando su actividad y biodisponibilidad. Esta interacción produce peroxinitrito, un poderoso oxidante de una gran variedad de biomoléculas (Beckman y col., 1994). Algunas evidencias de su presencia *in vivo* han sido indirectamente por la formación de

lípidos nitrados, nucleótidos nitrados y residuos de nitrotirosina en proteínas (Pacher y col., 2007). La nitración de proteínas ha sido ampliamente reportada en estados patológicos asociados con inflamación, en enfermedades neurodegenerativas, así como en la placenta en embarazos complicados por preeclampsia y diabetes pregestacional (Webster y col., 2008).

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que existen algunas tendencias a aumentar los niveles de nitrosilación en algunas muestras de placentas de mujeres con PE, comparadas con sus respectivos controles. Además, se puede observar que algunas muestras son más susceptibles a la nitrosilación entre las que se encuentran el cotiledón porción materna y cordón umbilical porción materna y fetal (Fig. 18). Estos resultados nos indican que efectivamente, el óxido nítrico está reaccionando con el anión superóxido para la formación de peroxinitrito, y que además esta interacción afecta a algunos tejidos placentarios alterando así su función, por medio del estrés nitrosativo. También, nuestros resultados concuerdan con otras investigaciones, en las que se ha observado un aumento en la inmunotinción de tejidos placentarios a partir de embarazos complicados con preeclampsia, especialmente en el endotelio vascular, comparados con embarazos normales (Myatt y col., 1996).

En el perfil de nitrosilación (Fig. 18) observamos que existe una gran variedad de proteínas nitradas de diferentes pesos moleculares tal es el caso de una banda de un peso aproximado de 45, 31 y 14 kDa sugiriéndonos que probablemente algunas de ellas puedan estar participando en condiciones patológicas como en la PE.

El aumento en la nitración de proteínas (estrés nitrosativo) se ha observado en la vasculatura materna (Roggensack y col., 1999) y se ha considerado como un factor etiológico en la PE, esto podría ser debido al estrés nitrosativo preexistente como resultado de una vasculatura materna previamente comprometida por una enfermedad cardíaca o síndrome metabólico (Ray, 2006).

Muchas proteínas nitradas han sido detectadas en varios componentes del sistema cardiovascular, en el plasma (fibrinógeno, plasmina, Apo-1), pared basal (Apo-B, ciclooxigenasa, prostaciclina sintasa, MnSOD) y en el miocardio (creatinina cinasa miofibrilar, alfa-actinina, Ca^{+2} ATPasa sarcoplasmática) (Peluffo y Radi, 2007).

Algunos blancos potenciales para la nitración con funciones críticas en la placenta incluyen a los receptores de membranas, transportadores, canales, moléculas que participan en las cascadas de transducción de señales, enzimas, proteínas estructurales, etc. Un ejemplo de esto se ha mostrado con la p38 MAPK, una molécula de señalización, la cual aumenta su nitración en la placenta con PE, y resulta en una pérdida de la actividad catalítica de la cinasa, alterando la función placentaria (Webster y col., 2006). Se ha observado también un aumento en la nitración del receptor purinérgico P2X4 en placentas con PE, la nitración de ese ligando dependiente de canales iónicos puede alterar la vasodilatación dependiente del endotelio o la contracción del músculo liso (Roberts y col., 2007).

La nitración de tirosinas también puede funcionar como un mecanismo de retroalimentación inhibitoria por el ONOO^- inhibiendo la actividad de la iNOS y la xantina oxidasa y de este modo la producción del O_2^- (Lee y col., 2000). Se ha reportado *in vivo* la nitración de la iNOS en músculo esquelético de pacientes con sepsis (Lanone y col., 2002). Potencialmente la óxido nítrico sintasa puede ser nitrada en la placenta resultando en una inhibición por retroalimentación. Tal disminución de la actividad de la NOS podría tener un papel en la vasoconstricción observada en la PE.

El óxido nítrico en la circulación fetoplacentaria es derivado principalmente de la actividad de la eNOS (Lyall y col., 2000). En el presente trabajo de investigación, se ha mostrado un aumento en los niveles de la eNOS en muestras de cotiledón tanto en la porción materna como la fetal, comparado con las demás muestras (Fig. 19). Y existen pequeñas tendencias a aumentar los niveles de la eNOS en muestras como cotiledón porción materna y arteria umbilical de placentas de

mujeres con PE. Estos resultados concuerdan con otros reportes donde se ha encontrado un aumento en la expresión de la eNOS en el endotelio vascular con PE (Myatt y col., 1997) quizás como una respuesta compensatoria al aumento de la vasoconstricción inducida por estrés por roce en las células endoteliales con esta patología.

Sin embargo, el hecho de que nuestros niveles de óxido nítrico (Fig. 17) y nuestros niveles de la proteína eNOS (Fig. 19) no concuerden, puede deberse a que el óxido nítrico que se está generando no derive en su totalidad de la eNOS y que otras NOS participen en la síntesis del NO[•]. Algunos reportes apoyan estos resultados, en donde se observa que la actividad de la NOS fetoplacentaria en la PE y las concentraciones del NO[•] en la circulación umbilical están alterados (Schiessl y col., 2005), mostrando que la actividad de la NOS no cambia ó existe una disminución de los niveles en la PE (Lee y col., 1997).

Estudios recientes indican que los niveles de la proteína eNOS no necesariamente reflejan el estado funcional de la enzima. Los cambios en la producción de NO[•] pueden surgir a partir de modificaciones postraduccionales de la eNOS sin cambios en los niveles de la proteína (Dudzinski y Michel, 2007). La biodisponibilidad del NO[•] endotelial es regulada por mecanismos de regulación postrasduccional de la eNOS (Musicki y col., 2010), tales como fosforilación, interacción de proteínas, estabilización de dímeros, localización subcelular, modificación de ácidos grasos (miristoilación y palmitoilación) y regulación por especies reactivas de oxígeno. Estos mecanismos regulan respuestas mediadas por la eNOS bajo circunstancias fisiológicas y proporcionan diversos mecanismos por los cuales la disponibilidad del NO[•] puede ser alterada en estados de disfunción vasculogénica (Musicki y col., 2009). Futuras investigaciones son requeridas para confirmar la relevancia fisiológica de las modificaciones postraduccionales de la eNOS.

Por otro lado, se ha observado que el estrés oxidativo ha sido implicado en la etiología de la preeclampsia alterando el endotelio vascular materno. Además, los

radicales libres liberados a partir de la pobre perfusión en la unidad fetoplacentaria inician una peroxidación lipídica atacando a los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular, convirtiéndolos en peróxidos lipídicos (LPOs) y una variedad de metabolitos secundarios (Fiore y col., 2005).

En el presente trabajo determinamos los niveles de lipoperoxidación como medida indirecta del estrés oxidativo y observamos que en muestras de cordón umbilical porción materna y arteria umbilical hay un aumento de los niveles de lipoperoxidación de mujeres con PE comparadas con sus respectivos controles (Fig. 20). Algunos reportes apoyan estos resultados, encontrando un aumento en los niveles plasmáticos de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en estados de hipertensión y preeclampsia (Rhian, 2004). Las reacciones originadas por los radicales libres promueven un ciclo de eventos que comprometen el funcionamiento defensivo del endotelio vascular en este tipo de patologías.

Otros estudios indican que los niveles del 4-Hidroxineonanal e isoprostano, marcadores de estrés oxidativo que inducen vasoconstricción, son más altos en placentas de mujeres con PE que en embarazos normales. Pero también existen reportes en donde los niveles de 4-hidroxineonanal no presentan diferencias significativas entre embarazos complicados con PE y embarazos normales, sugiriendo que el estado de hidroperoxidación lipídica no es elevada en la placenta preecláptica y que el daño oxidativo parece ocurrir principalmente en las células de crecimiento rápido, como las células trofoblásticas de la columna celular, donde la peroxidación lipídica ocurre principalmente en la membrana plasmática, así como en los sincitiotrofoblastos. Esos resultados sugieren que el estrés oxidativo puede influenciar en la placenta o células trofoblásticas de diferente manera entre el daño al DNA y la peroxidación lipídica (Takagi y col., 2004).

Se ha propuesto que la disminución de la actividad antioxidante puede contribuir al estrés oxidativo. En la preeclampsia algunos marcadores de estrés oxidativo aumentan en el plasma materno, mientras que los niveles de los sistemas

antioxidantes disminuyen, de tal manera que se origina un daño endotelial vascular (Roberts y Hubel, 1999). Un ejemplo específico de la disminución de la protección antioxidante en la PE es la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Roggensack y col., 1999).

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que existe una tendencia a disminuir los niveles de SOD2 en algunas muestras como cotiledón porción materna y fetal y arteria umbilical de placentas de mujeres con PE, sin embargo también se aprecia que existen tendencias a aumentar los niveles de la proteína SOD en muestras de cordón umbilical porción materna y fetal y arteria umbilical de placentas de mujeres con PE comparados con sus respectivo control (Fig. 21), indicándonos una expresión diferencial de los niveles de la SOD2 en esta patología.

Una consecuencia de la disminución de la SOD puede ser que al no tenerse una adecuada protección contra el anión superóxido en el embarazo complicado con PE, implicaría un mayor daño oxidativo expresado por otros mecanismos diferentes a la lipoperoxidación, uno de estos mecanismos puede ser la producción de peroxinitrito. También puede proponerse que se necesitaría disponer de otros sistemas antioxidantes que compensen a la SOD, para no llegar a producir un mayor daño oxidativo.

Otro sistema antioxidante es la catalasa, esta promueve la conversión del peróxido de hidrógeno, el cual es un poderoso y potencial agente oxidante, a agua y oxígeno molecular (Suhail y col., 2008). Nuestros resultados muestran una tendencia a disminuir los niveles de la catalasa en todas las diferentes muestras de placentas con PE, comparadas con su respectivo control (Fig. 22). Estos resultados están en concordancia con lo reportado en la literatura en donde observan una disminución significativa de los niveles de la catalasa en el suero de mujeres con preeclampsia (Kolusari y col., 2008).

El conjunto de nuestros resultados hasta este momento, nos indican que la disminución de los niveles de la eNOS y la disminución de los sistemas

antioxidantes como la SOD y la catalasa en muestras de placentas de mujeres con PE, puede favorecer el aumento del estrés oxidativo generado por la peroxidación lipídica y la formación del anión peroxinitrito (mediante la interacción del elevado NO[•] y el anión superóxido). Los datos anteriores también nos sugieren que pueden pudiendo existir otros mecanismos que favorezcan la producción de estrés oxidativo y nitrosativo, que acompañan la etología de la PE.

Por otro lado, se sabe que las proteínas Rho tienen importantes funciones en la fisiología vascular en condiciones normales. Recientemente se ha señalado que la activación del sistema transduccional Rho/Rho-cinasa es uno de los nuevos y principales mecanismos de vasoconstricción en la hipertensión arterial con potencial terapéutico (Johns y col., 2000).

La PE se caracteriza por una constante y elevada resistencia vascular sistémica, donde la condición central son los mecanismos que regulan la contracción del músculo liso vascular, en donde las proteínas Rho participan de esta manera regulando la vasoconstricción en la circulación sistémica (Friel y col., 2006).

En el presente trabajo analizamos los niveles de la proteína RhoA y RhoB, con la finalidad de observar una posible relación de estas proteínas en estados hipertensivos como la preeclampsia, así como su posible relación con el estrés oxidativo y nitrosativo que acompaña a la PE.

Nuestros resultados nos arrojan datos novedosos acerca de la presencia de las proteínas RhoA y RhoB en las diferentes muestras de placentas de mujeres con PE y mujeres sanas. Donde se muestra una tendencia a disminuir los niveles de las proteínas RhoA y RhoB en muestras de cotiledón porción materna y fetal, vena y arteria umbilical de placentas de mujeres con preeclampsia comparadas con sus respectivos controles (Fig. 23 y 24 respectivamente). Estos resultados concuerdan con el hecho de que existen reportes donde se muestra una significativa reducción de los niveles del mRNA en arteria umbilical de embarazos complicados con PE. Sugiriendo que esta disminución pueda servir para contrarrestar la perfusión

disminuida asociada con la fisiopatología de la PE. Una posible interpretación de esto, es que la expresión disminuida del mRNA de RhoA probablemente disminuye la actividad de la vía de señalización RhoA/Rho cinasa, en asociación con la PE, lo que puede facilitar grandemente la vasodilatación o aumento del flujo sanguíneo fetal (Friel y col., 2006).

Los resultados obtenidos de la proteína RhoB son novedosos debido a que no existen reportes acerca de la presencia y de la posible relación de esta proteína en estados hipertensivos como la PE en este tipo de muestras. Sin embargo, se sabe que en células neuronales, RhoB es el principal regulador de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (Conway y col., 2004), lo que permitiría la posterior interacción actina-miosina para producir la contracción del músculo liso vascular. Este hecho nos podría sugerir que la proteína RhoB puede tener un papel importante en patologías como la PE.

Otra proteína importante que se considera un mediador central en la fisiología cardiovascular, reactividad vascular y regulación de la presión sanguínea (Nowicki y col., 2001) es la proteína Rac.

Existen pocos reportes de la presencia de la proteína Rac en la PE. Nuestros resultados obtenidos aportan más evidencias de la presencia de la proteína Rac en diferentes muestras de placentas de mujeres con PE. Observándose una tendencia a disminuir los niveles de la proteína Rac en muestras de placentas de mujeres con preeclampsia comparadas con su respectivo control (Fig. 25). Esto concuerda con lo reportado por Hannke-Lohmann y col. (2000), donde observan una disminución en la actividad de Rac en placentas de mujeres con preeclampsia.

Estos resultados en conjunto con lo observado para las proteínas RhoA y RhoB nos indican la presencia de dichas proteínas en muestras de placentas de mujeres con PE. Lo cual nos sugiere que estas proteínas pueden tener un papel importante en la etiología de la preeclampsia.

Por otro lado, se sabe que existe una fuerte relación entre la ruta de señalización de Rho y el óxido nítrico en la hipertensión, en donde Rho actúa regulando negativamente la expresión de la eNOS (Laufs y Liao, 1998) y de la iNOS en VSMC (células del músculo liso vascular) en ratas (Muniyappa y col., 2000), sugiriendo que la inhibición de la proteína Rho estimula la producción del óxido nítrico en las células del músculo liso vascular.

Así mismo, la proteína Rac, como componente de la NADPH oxidasa, juega un papel importante en la producción de especies reactivas de oxígeno. Algunos reportes muestran que la PE está asociada con una predisposición al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno mediadas por la NADPH oxidasa estimulada por agonistas, donde el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno puede ser importante en la disfunción endotelial observada en la PE (Lee y col., 2003).

Los niveles disminuidos de la proteína Rac nos sugiere que probablemente favorezcan la disminución de especies reactivas de oxígeno provenientes de la NADPH oxidasa, contrarrestando así el aumento del estrés oxidativo en la PE.

El conjunto de nuestros resultados nos proporcionan evidencia de la presencia y de la posible participación del estrés oxidativo y nitrosativo, así como de las proteínas RhoA, RhoB y Rac en la PE. Con nuestros resultados obtenidos no podemos establecer una relación estrecha entre las proteínas Rho y el estrés oxidativo y nitrosativo en la PE; sin embargo si nos proporcionan evidencia que existen niveles diferenciales de la presencia de estas proteínas en muestras de cotiledón porción materna y fetal, cordón umbilical porción materna y fetal, vena y arteria umbilical de mujeres con PE y nos da la pauta para realizar futuras investigaciones que nos permitan aportar un mayor entendimiento de la etiología de la PE.

IX. CONCLUSIÓN

El estrés oxidativo y nitrosativo aumenta en cordón, vena y arteria umbilical de placentas de pacientes con PE, probablemente como una respuesta a la disminución de la perfusión sanguínea observada en la misma, donde además las proteínas G: RhoA, RhoB y Rac podrían estar participando regulando el aumento de la presión arterial sanguínea en la PE.

X. LITERATURA CITADA

Agarwal A, Gupta S, y Sharma R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *RBEj*. **3**:28

Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall y Freeman B. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Asci USA*. **87**: 1620-1624.

Beckman J, Ye Y, Anderson P, Chen J, Accqvitti M, Trapey M y White C. 1994. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem*. **357**: 81-88.

Boggess A, Oury D, Kay H y Crapo JD. 1998. Extracellular superoxide dismutase localization and activity within the human placenta. *Placenta*. **19**(5-6):417-22.

Bustelo X, Sauzeau V y Berenjano I. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays*. **29**:356-370.

Cascales Maria. 2005. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. **42**: 365-386.

Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva. 2007. Secretaria de salud. Prevencion, Diagnostico y Manejo de la Preeclampsia/Eclampsia. Cuarta edición.

Chardin P, Bouquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin ES y Gill DM. 1989. The mammalian G-protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and effects microfilaments in Vero cells. *EMBO J*. **8**:1087-1092.

Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, Sasaki A, Hao L y Hiramatsu Y. 2006. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrosative stress. *Placenta*. **27**:225-233.

Conway A, James A, O'Kane E, Rakhit S y Morris B. 2004. Regulation of myosin light chain phosphorylation by RhoB in neuronal cells. *Exp Cell Res.* **300**: 35-42.

Dang PM, Cross AR y Babior BM. (2001) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67 phox and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 3001-3005.

Dechend R, Viedt C, Müller D, Ugele B, Brandes R, Wallukat G, Park J, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J y Luft F. 2003. AT₁ Receptor Agonistic Antibodies From Preeclamptic Patients Stimulate NADPH Oxidase. *Circulation.* **107**: 1632-1639.

DeLeo FR y Quinn MT. (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol.* **60**: 677-691

Del Monaco S, Marino G, Assef Y y Kotsias B. 2008. Preeclampsia, Migración celular y Canales iónicos. *MEDICINA.* **68**: 405-410.

Dinesh M. Shah. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol.* **288**: 614-625.

Dorado C, Rugerio C. y Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM.* **46**(6):229-235.

Dudzinski DM y Michel T. 2007. Life history of eNOS: Partners and pathways. *Cardiovasc Res.* **75**:247-60.

Dvorkin y Cardinali. 2003. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica.

Estrada-Altamirano, A., Hernández-Pacheco, J. A., Cisneros-Castolo, M. y García-Benitez, C. Q. 2002. Experiencia de la unidad de cuidados intensivos obstétricos del Instituto de Nacional de Perinatología, 1993-1998. *Perinatol Reprod Hum.* **16**:88-95.

Fiore G, Florio P, Micheli L, Nencini C, Rossi M, Cerretani D, Ambrosini G, Giorgi G. and Petraglia F. 2005. Endothelin-1 Triggers Placental Oxidative Stress Pathways: Putative Role in Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **90**(7):4205-4210.

Friel A, Sexton D, O'Reilly M, Smith T y Morrison J. 2006. Rho A/Rho Kinase: human umbilical artery mRNA expression in normal and pre eclamptic pregnancies and functional role in isoprostane-induced vasoconstriction. *REPRODUCTION*. **132**: 169-176.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow J and Fisher S. 1997. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Scienci*. **277**: 1669-1672.

Grewal S, Carver J, Ridley A, and Mardon H. 2008. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *PNAS*. **105**(42): 16189-16194.

Griendling K, Sorescu D y Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. **86**: 494-501.

Heneweer C., Kruse L. H., Kindhäuser F., Schmidt M., Jacobs K. H., Denker H-W., Thie M; 2002. Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: Rho protein regulation. *Mol Hum Reprod*. **8**:1014-1022.

Higashi M, Yu J, Tsuchiya H, Saito T, Oyama T, Kawana H, Kitagawa M, Tamaru J y Harigaya K. 2010. Visualization of the Activity of Rac1 Small GTPase in a Cell. *Acta Histochem. Cytochem*. **43** (6): 163–168.

Hudicek-Martincinc G, Kusan-Jukic M, Salihagic-Kadic A., 2004. Nitric oxide – an important signalling molecule in normal and pathological pregnancy. *Lijec Vjesn*. **126**:80-85.

Instituto Nacional de Salud Pública. 2006. Preeclampsia/eclampsia. Boletín de Práctica Médica Efectiva.

Jauniaux E, Poston L y Burton G. 2006. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Human Reproduction and Embriology*. **12**(6): 747-755.

Johns D, Dorrance A, Leite R, Weber D y Webb R. 2000. Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension. *J Biomed Sci*. **7**:431-43.

Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M y Satoh T. 1991. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 349-400.

Koeck T, Stuehr D y Aulak K. 2005. Mitochondria and regulated tyrosine nitration. *Biochem Soc Trans*. **33**: 1399-403.

Kolusari A, Kurdoglu M, Yildizhan R, Adali E, Edirne T, Cebi A, Demir H y Yoruk IH. 2008. Catalase activity, serum trace element and heavy metal concentrations, and vitamin A, D and E levels in pre-eclampsia. *J Int Med Res*. **36**(6):1335-41

Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D y Myatt L. 2000. Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **278**: H1311-H1319.

Lanone S, Manivet P, Callebert J, Launay J, Payen D y Aubier M. 2002. Inducible nitric oxide synthase (NOS2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: implications for enzymic activity. *Biochem J*. **366**: 399-404.

Lee C, Chang S, Cho N y Cho S. 1997. Nitrous oxide synthase expression in placenta of preeclampsia. *J Korean Med Sci*. **12**: 532-538.

Lee C, Liu X y Zweier J. 2000. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem*. **275**: 9369-76.

Lee V, Quinn P, Jennin S y Ng L. 2003. NADPH Oxidase Activity in Preeclampsia With Immortalized Lymphoblasts Used as Models. *Hypertension*. **41**: 925-931.

Laufs U, and Liao J. 1998. Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**(37): 24266-24271.

Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. 2000. Hemeoxygenase expression in human placenta y placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J*. **14**: 208-219.

Madamanchi N, Vendrov A, and Runge M. 2005. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **25**: 29-38.

Manes C. 2001. Human Placental NAD(P)H oxidase: solubilization and properties. *Placenta*. **22**: 58-63.

Madaule P, Axel R. 1985. Novel ras-related gene family. *Cell*. **41**:31-40.

Madalau P, Axel R, Myers AM. 1987. Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **84**:779-83.

Matos P, Collard J y Jordan P. 2003. Tumor-related Alternatively Spliced Rac1b Is Not Regulated by Rho-GDP Dissociation Inhibitors and Exhibits Selective Downstream Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(50): 50442-50448.

Mendez I de, Homayounpour N, Leto TL. (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol*. **17**: 2177-2185.

Mizrahi A, Berdichevsky Y, Ugolev Y, Molshanski-Mor S, Nakash Y, Dahan I, Alloul N, Gorzalczancy Y, Sarfstein R, Hirshberg M and Pick E. 2006. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *Journal of Leukocyte Biology*. **79**: 881-897.

Moldovan L, Mythreye K, Goldschmidt-Clermont P y Satterwhite L. 2006. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovascular Research*. **71**: 236–246

Moore Keith L y Persaud TVN; 2004. Embriología clínica, del desarrollo humano. ELSEVIER SAUNDERS. Séptima edición. Capítulo 1 y 2.

Mutter Walter P. and Karumanchi S. Ananth. 2008. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvascular Research*. **75**:1-8.

Musicki B, Ross A, Champion H, Burnett A y Bivalacqua T. 2009. Post-Translational Modification of Constitutive Nitric Oxide Synthase in the Penis. *J Androl*. **30**(4): 352-362.

Musicki B, Liu T, Strong T, Lagoda G, Bivalacqua T y Burnett A. 2010. Post-translational Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) by Estrogens in the Rat Vagina. *J Sex Med*. **7**(5): 1768-1777.

Myatt L and Cui X. 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. **122**:369-382.

Myatt L, Eis A, Brockman D, Greer I y Lyall F. 1997. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod*. **12**: 167-172.

Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I, Lyall F. 1996. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension*. **28**: 488-493.

Nowicki P, Flavahan S, Hassanain H, Mitra S, Holland S, Goldschmidt-Clermont P y Flavahan N. 2001. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res*. **89**: 114-116.

Pacaud P, Sauzeau V and Loirand G. 2005. Rho proteins and vascular diseases. *ARCHIVES DES MALADIES DU COEUR ET DES VAISSEAUX*. **98**(3):249-254.

Pacher P, Beckman J y Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* **87**: 315-424.

Paravicini T y Touyz R. 2006. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research.* **71**: 247 – 258.

Peluffo G y Radi R. 2007. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res.* **75**: 291-302.

Pollheimer J. and Knofler M. 2005. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta.* **26**:S21-S29.

Ray J. 2006. Metabolic syndrome and higher risk of maternal placental syndromes and cardiovascular disease. *Drug Dev Res.* **67**: 607-11.

Reshef R, Schwartz D, Ingbir M, Shtabsky A, Chernochovski T, Isserlin BA, Chernin G, Levo Y, Schwartz IF. 2008. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **294**:H1156-H1163.

Ridley AJ. 1995. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* **5**:24-30.

Roberts J y Hubel C. 1999. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia?. *Lancet.* **354**: 788-789.

Roberts J.M, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. 2003. Summary of the NHLBI working group on research on hypertension during pregnancy. *Hypertension.* **41**:437-445.

Roberts V, Webster R, Brockman D, Pitzer B y Myatt L. 2007. Post-translational modifications of the P2X(4) purinergic receptor subtype in the human placenta are altered in preeclampsia. *Placenta.* **28**: 270-7.

Roggensack A, Zhang Y y Davidge S. 1999. Evidence for Peroxynitrite Formation in the Vasculature of Women With Preeclampsia. *Hypertension.* **33**:83-89

Roland L, Beauchemin D, Acteau G, Fradette C, St-Pierre I y Bilodeau JF. 2010. Effects of labor on placental expression of superoxide dismutases in preeclampsia. *Placenta*. **31**(5): 392-400.

Romero G. Carmen. Estrés oxidativo y defensa antioxidante durante el ejercicio. 1990. *APUNTS*. **XXVII**: 221-231.

Rhian M. Touyz. 2004. Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo vascular, y señalización redox en la hipertensión. *Hypertension*. **44**: 248-252.

Sánchez D, Villanueva G, Sosa C, Orjuela D, Ortega J, Martínez C y Herrera N. 2004. Óxido nítrico en el sistema nervioso central. Neuronas nitrérgicas. *Revista Neurología, Neurología y Psiquiatría*. **37**(2): 73-78.

Schiessl B, Mylonas I, Hantschmann P, Kuhn C, Schulze S, Kunze S, Friese K, and Jeschke U. 2005. Expression of Endothelial NO Synthase, Inducible NO Synthase, and Estrogen Receptors Alpha and Beta in Placental Tissue of Normal, Preeclamptic, and Intrauterine Growth-restricted Pregnancies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **53**(12):1441-1449.

Seasholtz TM, Brown JH. 2004. RHO SIGNALING in vascular Diseases. *Molecular Interventions*. **4**: 348-357.

Suhail M, Faizul M y Khan H. 2008. Role of Vitamins C and E in Regulating Antioxidant and Pro-Oxidant Markers in Preeclampsia. *J. Chem. Biochem. Nutr.* **43**: 210-220.

Takai Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**: 153-208.

Telfer J, Thomson A, Cameron I, Greer L y Norman J. 1997. Expression of superoxide dismutase and xanthine oxidase in myometrium, fetal membranes and placenta during normal human pregnancy and parturition. *Human Reproduction*. **12**(10): 2306-2312.

Van L, and D'Souza-Schorey C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development*. **11**: 2295-2322.

Wang Y y Walsh SW. 1996. Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and preeclamptic placentas. *J Soc Gynecol Investig*. **3**(4):179-84.

Webster R, Brockman D y Myatt L. 2006. Nitration of p38 MAPK in the placenta: association of nitration with reduced catalytic activity of p38 MAPK in preeclampsia. *Mol Hum Reprod*.

Webster R, Roberts V, Myatt L. 2008. Protein nitration in placenta – Functional significance. *Placenta*. **29**:985-994.

Zhou L, Qiao F. 2006. Expression of RhoA in placenta of preeclampsia. *J Huazhong Uni Sci Technolog Med Sci*. **26**:744-746.

<http://www.spps.gob.mx/noticias/37-preeclampsia-principal-causa-de-muerte-materna-en-mexico.html>