



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tesis:

“ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LA GTPasa RhoA Y NIVELES DE EXPRESIÓN DE SUS MOLÉCULAS EFECTORAS ROCK1, ROCK2, PKN y Dia1 EN PLACENTAS DE MUJERES CON PREECLAMPSIA”

Que Presenta para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

BIOL. ERIKA GABRIELA OROZCO HERNÁNDEZ

ASESOR: DOCTOR EN BIOLOGÍA SALVADOR MANZO AVALOS

CO-ASESOR: DOCTOR EN BIOLOGÍA ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

Octubre 2013

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 asesoría del D.C. Salvador Manzo Avalos y con la co-asesoría del D.C. Alfredo Saavedra Molina.

Tesis apoyada por el Programa de Investigación

Coordinación de la Investigación Científica

Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología

CONACyT

HOSPITAL GENERAL Dr. Miguel Silva

INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Preeclampsia	6
1.2. La placenta	10
1.2.1 Anatomía general de la placenta	12
1.2.2. Placentación	13
2. ANTECEDENTES	
2.1. Proteínas G	16
2.1.1. Proteínas Rho	17
2.1.2. Tipos de proteínas Rho	19
2.1.3. Efectores de las proteínas Rho	21
2.2. Proteína RhoA y su papel en la hipertensión	24
2.3. Proteína RhoA, moléculas efectoras y su relación en el embarazo y la preeclampsia	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos específicos	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1. Recolección del material biológico	29
6.2. Obtención de las muestras	29
6.3. Tinción con hematoxilina-eosina	29
6.4. Técnica de inmunohistoquímica	30
6.5. Observación en el microscopio	31
6.6. Lisis del tejido	31
6.7. Determinación de la concentración de proteína	31
6.8. Inmunodetección de la proteína RhoA total y sus moléculas efectoras	32
6.9. Ensayo de “pull-down”	33
7. RESULTADOS	
7.1. Recolección del material biológico	33
7.2. Diferencias en los datos clínicos entre las pacientes normales y las preeclámpticas	34
7.3. Evaluación histológica de los tejidos placentarios	35
7.4. Evaluación histológica de las placetas de embarazos con PE	36
7.5. Inmunohistoquímica de la proteína RhoA en los tejidos placentarios	37
7.6. Localización celular de la proteína RhoA en el cordón umbilical y el cotiledón de placentas normales y con PE	38
7.7. Expresión y estado de activación de la proteína RhoA en el cotiledón, en la vena y en la arteria umbilical de placentas con PE	40
7.8. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora Dia1 en muestras	42

de placentas con PE	
7.9. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora PKN en muestras de placentas con PE	43
7.10. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK2 en muestras de placentas con PE	44
7.11. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK1 en muestras de placentas con PE	45
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS	53
11. LITERATURA CITADA	54
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Factores de riesgo y patogénesis de la PE	7
Figura 2. Factores que causan disfunción endotelial durante la PE	9
Figura 3. Estructura y función de la placenta en mamíferos	11
Figura 4. Estructura de la placenta a término	12
Figura 5. Remodelación de las arterias espirales durante la placentación normal y con PE	14
Figura 6. Modelo de regulación de las proteínas Rho	18
Figura 7. Regulación de la contracción de las células musculares lisas vasculares por la Rho-cinasa (ROCK)	23
Figura 8. Expresión de la proteína RhoA en arterias de tejido de pulmón	25
Figura 9. Niveles de activación de RhoA en células de músculo liso de ratas	25
Figura 10. Inmunodetección de la proteína RhoA en muestras de placentas de mujeres sanas (N) y con PE (P)	26
Figura 11. Expresión de ROCK2 en homogenados de placenta humana de embarazos normales y con PE	27
Figura 12. Niveles de expresión de las proteínas RhoA, PKN y Dia en el miometrio (MYO) y placenta (PLA)	27
Figura 13. Diferencias en los datos clínicos entre las pacientes normales y con PE	34
Figura 14. Tinción con hematoxilina-eosina de las muestras de placenta de embarazos normales	36
Figura 15. Tinción con hematoxilina-eosina de las muestras de placenta de embarazos con PE	37
Figura 16. Distribución de la proteína RhoA en las muestras de placenta de embarazos normales	37
Figura 17. Distribución de la proteína RhoA en las muestras de placenta de embarazos con PE	38
Figura 18. Localización de la proteína RhoA a nivel celular en el endotelio de los vasos sanguíneos del cordón umbilical de muestras normales y con PE	39
Figura 19. Localización de la proteína RhoA a nivel celular en el músculo liso de los vasos sanguíneos del cordón umbilical de muestras normales y con PE	39
Figura 20. Localización de la proteína RhoA a nivel celular en cortes de cotiledón de	40

placentas normales y con PE	
Figura 21. Niveles del estado de activación de la proteína RhoA en placentas de mujeres con PE	41
Figura 22. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora Dia1 en las muestras de placentas normales y con PE	42
Figura 22. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora PKN en las muestras de placentas normales y con PE	44
Figura 22. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK2 en las muestras de placentas normales y con PE	45
Figura 22. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK1 en las muestras de placentas normales y con PE	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los miembros de la superfamilia de Ras	16
Tabla 2. Valores de inclusión de las muestras placentarias	29
Tabla 3. Datos clínicos de las pacientes con preeclampsia y normotensas	33

1. INTRODUCCION

1.1.Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es universalmente definida como la hipertensión y proteinuria significativa desarrollada en o después de 20 semanas de embarazo (Milne y col., 2005). Se produce en un 3-8% de los embarazos y es responsable de generar 60,000 muertes maternas anuales en todo el mundo (Redman y Sargent, 2005). La importancia de la PE radica en que constituye la primera causa de muerte materna en países en desarrollo y pese a los múltiples avances en medicina, aún no existen estrategias eficientes para prevenir esta patología, siendo la interrupción del embarazo el único tratamiento efectivo actualmente disponible (Rodríguez y col., 2012).

La PE también puede presentar hemólisis, bajo conteo de plaquetas y elevación de enzimas hepáticas, como parte del síndrome de HELLP (Stennett y Khalil, 2006). La PE severa es una causa importante de morbilidad materna, así como efectos adversos perinatales, tales como el parto prematuro y la restricción del crecimiento intrauterino (Lykke y col.,2009).

Durante muchos años se ha considerado a este síndrome como la enfermedad de las teorías, porque las múltiples hipótesis no han logrado explicar el cuadro clínico en su totalidad(Rodríguez y col., 2012). Se han implicado varios factores de riesgo en la PE entre los que se incluyen la edad materna, hipertensión crónica, nacimientos múltiples, polimorfismo genético, factores ambientales y dietéticos, la obesidad y la diabetes antes del embarazo y factores inmunológicos(Lykke y col., 2009). Estos factores pueden causar el desarrollo anormal de la placenta, induciendo un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS)y un desequilibrio en la circulación de factores angiogénicos y antiangiogénicos y llevar a un daño general del endotelio. El daño endotelial a nivel vascular contribuye al desarrollo de la hipertensión y el daño a nivel glomerular produce la proteinuria, esto conduce al desarrollo de la PE. Por otro lado se puede generar también un daño vascular a nivel cerebral lo que conduce a problemas visuales, dolor de cabeza intenso y convulsiones, provocando la eclampsia(Figura 1)(Maynard y col., 2008).

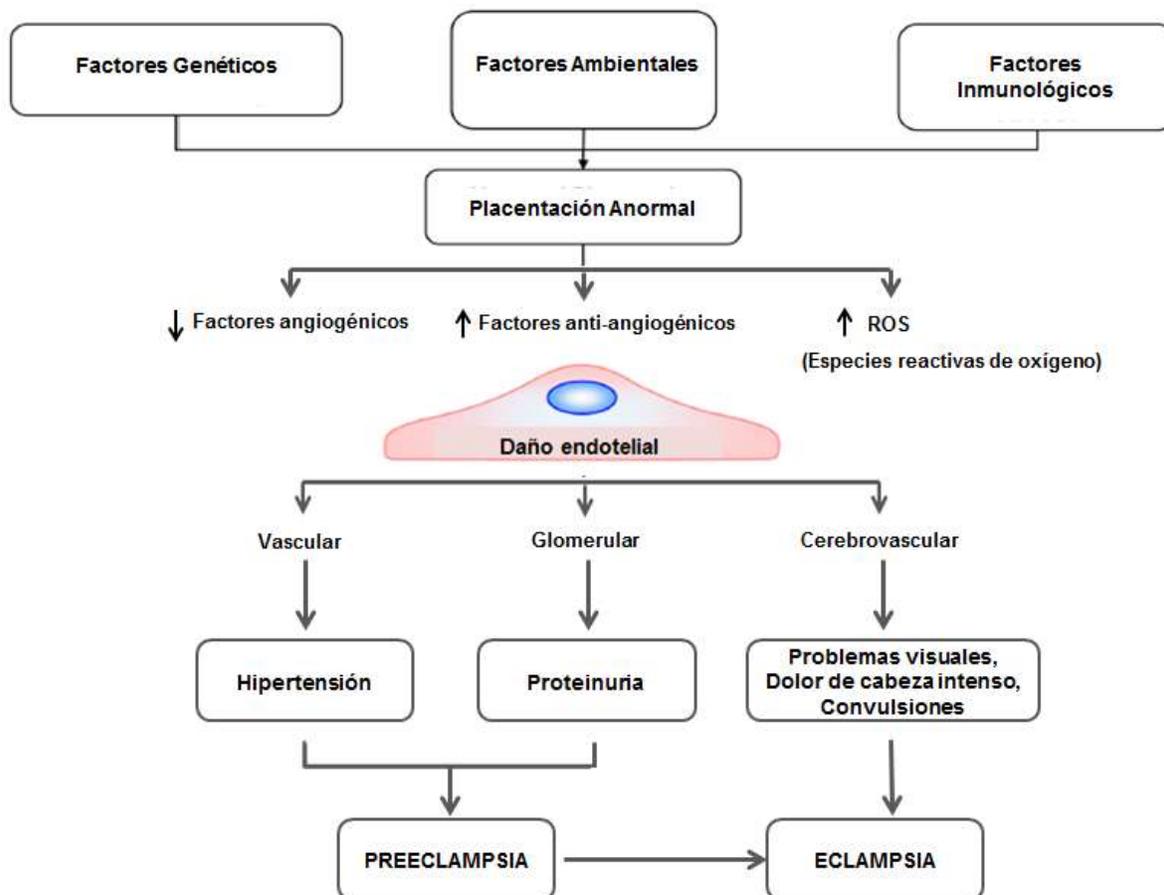


Figura 1. Factores de riesgo y patogénesis de la PE. Algunos factores genéticos, ambientales e inmunológicos causan una placentación anormal y se desencadena un desbalance entre los factores angiogénicos y anti-angiogénicos y la elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual afecta a los vasos sanguíneos sistémicos y se genera una vasoconstricción generalizada, aumento de la resistencia vascular y la hipertensión en el embarazo. Los factores bioactivos pueden lesionar el riñón, llevando a un aumento del volumen plasmático y una hipertensión severa, así como endoteliosis glomerular y proteinuria. El aumento de la permeabilidad vascular cerebral origina problemas visuales, dolor de cabeza intenso y convulsiones, generándose la eclampsia poniendo en peligro la vida. Modificada de Ossama y col.(2010).

En el síndrome materno de la PE y eclampsia hay compromiso del endotelio de todos los sistemas maternos, como lo son: a) en cerebro; b) en hígado; c) en riñón; d) en pulmón; e) en sangre y f) en páncreas (Pacora, 2006). El síndrome fetal se manifiesta por alteraciones vasculares en la placenta, restricción del crecimiento fetal, desprendimiento prematuro de la placenta, muerte fetal, anomalías anatómicas congénitas, parto prematuro e hipoxia fetal (Pacora, 2006).

No se conoce la causa del síndrome pero existen varias hipótesis entre las que se incluyen: la insuficiencia placentaria, la reacción autoinmune, el estrés oxidativo, liberación de fragmentos apoptóticos de células de trofoblasto, disminución en la síntesis de aldosterona, sustancias antiangiogénicas y una inadecuada invasión de las arterias espirales por el trofoblasto durante la implantación embrionaria que alteran el desarrollo de la vasculatura materno fetal, por consecuencia un defecto en la implantación fetal, resultando en una reducción de la perfusión uterina y una placenta isquémica (Chaddha y col., 2004). La patogénesis de la PE señala que este síndrome clínico materno-fetal es una enfermedad vascular. Con frecuencia, en la placenta de embarazos con PE, existen anomalías morfológicas de las vellosidades placentarias (Pacora y col., 2004).

La placenta isquémica puede inducir la liberación de factores bioactivos en la circulación que causan la disfunción de las células endoteliales observada en la PE, mediante la alteración de los niveles circulantes de los factores angiogénicos y antiangiogénicos (Levine y col., 2006). Debido a esto, la PE ha sido descrita recientemente como un estado de desbalance entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos. Los principales factores que promueven la angiogénesis en la placenta pertenecen a la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) (Pacora, 2006). Además de los miembros de la familia VEGF, en la placenta normal se expresan abundantemente las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2) y sus receptores endoteliales tipo tirosina cinasa, que actúan en las etapas finales de la angiogénesis (Dunk y col., 2000).

Una proteína antiangiogénica que se ha implicado recientemente en la génesis de la PE es la sFlt-1 (siglas en inglés de soluble fms-like tyrosine kinase 1), la cual es producida en cantidades excesivas por la placenta en la PE (Maynard y col., 2003). Se sugiere que las propiedades antiangiogénicas del suero de mujeres con PE se debe al bloqueo de las proteínas angiogénicas de la familia VEGF y del factor de crecimiento placentario (PlGF, por sus siglas en inglés) por el exceso de sFlt-1 circulante (Maynard y col., 2003). Todo esto sugiere que sFlt-1 se une a PlGF y VEGF; por lo tanto, causa un cambio hacia un estado antiangiogénico, el cual causa daño al endotelio materno y ocurre el cuadro clínico de la PE (Figura 2) (Pacora, 2006).

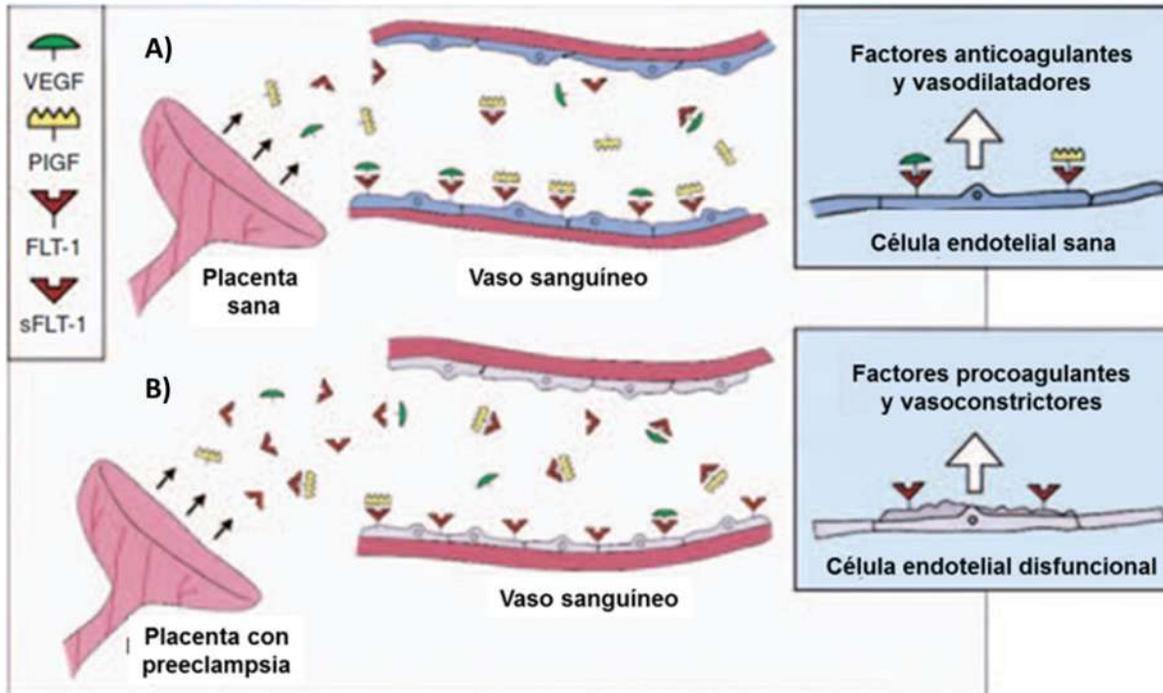


Figura 2. Factores que causan disfunción endotelial durante la PE. El sFLT-1 (forma soluble del receptor FLT-1) ocasiona disfunción endotelial debido a que bloquea la función del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y al factor de crecimiento placentario (PIGF). A: en el embarazo normal, la placenta produce factores anticoagulantes y vasodilatadores generando concentraciones modestas de VEGF, PIGF y sFLT-1. B: en la PE, la placenta produce factores procoagulantes y vasoconstrictores, esto conduce a que el exceso de sFLT-1 placentario se una al VEGF y PIGF circulante e impide su interacción con los receptores FLT-1 de las células del endotelio. Esto resulta en una disfunción de las células del endotelio. Modificada de Ananth y col.(2005).

Las mujeres con PE pueden desarrollar daño al endotelio, inflamación glomerular y depósitos de fibrina entre las células endoteliales y las células mesangiales que pueden causar daño renal (Suzuki y col., 1997). La microalbuminuria es una importante manifestación de la disfunción endotelial renal y dos tercios de las mujeres con PE pueden presentarla 2-4 meses después del parto (Bar y col., 1999). En la PE, la disminución de los niveles de VEGF puede ser en parte responsable de daño al endotelio glomerular. El VEGF es producida en el glomérulo por los podocitos y es esencial para la preservación de la salud del endotelio. Además el VEGF también juega un papel importante en la formación de fenestras, los pequeños poros en las células endoteliales que permiten la transferencia de moléculas de los capilares glomerulares hacia el espacio urinario. En mujeres con PE, la producción excesiva de sFlt-1 inhibe la señalización de VEGF y la falta de fenestras causa la

reducción de la tasa de filtración glomerular, y finalmente conduce a la proteinuria (Stillman y Karumanchi, 2007).

El daño al endotelio de los vasos sanguíneos puede causar el aumento de la resistencia vascular y la hipertensión. El daño vascular en el cerebro puede afectar la barrera hematoencefálica y conducir a dolor de cabeza severo, disturbios visuales y convulsiones. El daño en los vasos hepáticos también puede conducir al desarrollo del síndrome HELLP (Ossama y col., 2010).

El óxido nítrico presente en el endotelio vascular es un potente antioxidante, con propiedades vasodilatadoras, antiagregante plaquetario, modulador de la apoptosis y de la permeabilidad endotelial. En la PE se encuentra disminuido, debido a una disminución de la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS, por sus siglas en inglés), la cual es la enzima responsable de su síntesis (Ossama y col., 2010).

El síndrome de la PE está asociado con la placenta, ya que se requiere la presencia del tejido trofoblástico para su desarrollo. El síndrome se resuelve después del nacimiento, un hecho que pone como papel principal a la placenta en la etiología de la enfermedad. La presencia del feto no es necesaria para que se desarrolle la PE, ya que esto ocurre en embarazos molares y la remoción del trofoblasto resuelve la enfermedad y se normaliza la sintomatología, por lo tanto es la base para el estudio de la PE (Myatt, 2002).

1.2. La placenta

La placenta es el primero de los órganos fetales en desarrollarse y tiene funciones críticas. Ésta media la implantación y establece la interfase para el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos entre la circulación materna y fetal (Figura 3), así como ser el primer reconocimiento materno del embarazo, alterando el ambiente inmune local y alterando funciones maternas cardiovasculares y metabólicas a través de la producción de hormonas parácrinas y endócrinas. Las anomalías en cualquiera de estas funciones pueden estar asociadas con enfermedades en el embarazo, las cuales incluyen muerte embrionaria, restricción de crecimiento fetal y preeclampsia (Cross, 2006).

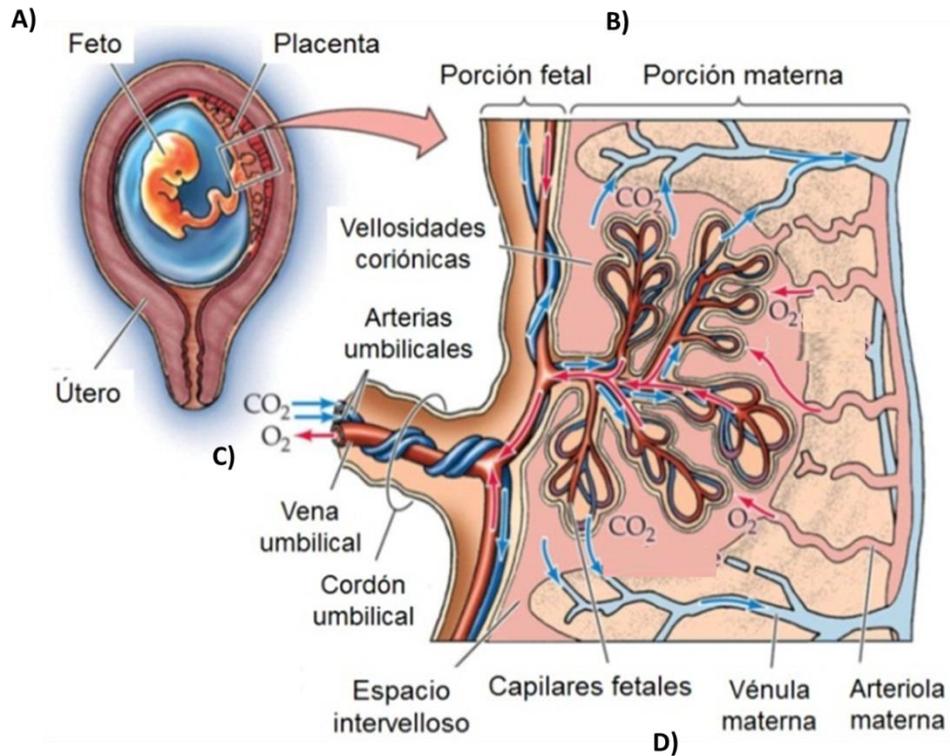


Figura 3. Estructura y función de la placenta en mamíferos. Se muestra: A) relación del feto con la placenta; B) relación de la porción fetal con la porción materna de la placenta; C) circulación placentaria fetal y D) circulación placentaria materna. Obsérvese que las arterias umbilicales llevan sangre fetal poco oxigenada (en azul) a la placenta y que la vena umbilical lleva sangre oxigenada (en rojo) al feto. Modificada de Sadava y col. (2006).

La placenta se forma a partir de la capa externa del blastocisto llamada trofoblasto durante la implantación embrionaria (Mutter y col., 2008). Su función al principio del embarazo es mediar la implantación del embrión en el útero. Después de la implantación, la principal función de la placenta es regular el transporte de nutrientes hacia el feto. Por otro lado también la población trofoblástica invasiva produce factores angiogénicos y vasodilatadores e invaden las arterias espirales para incrementar el flujo sanguíneo al sitio de implantación (Cross, 2006).

Funcionalmente la placenta está dividida en dos porciones:

Porción fetal: está compuesta de múltiples unidades funcionales llamadas vellosidades o vasos coriónicos. La superficie se halla cubierta por el annios transparente o membrana amniótica (Figura 4 A) (Moore y Persaud, 2004).

Porción materna: está conformada de cotiledones irregulares divididos por surcos producidos por los tabiques placentarios (Figura 4 B)(Moore y Persaud, 2004).

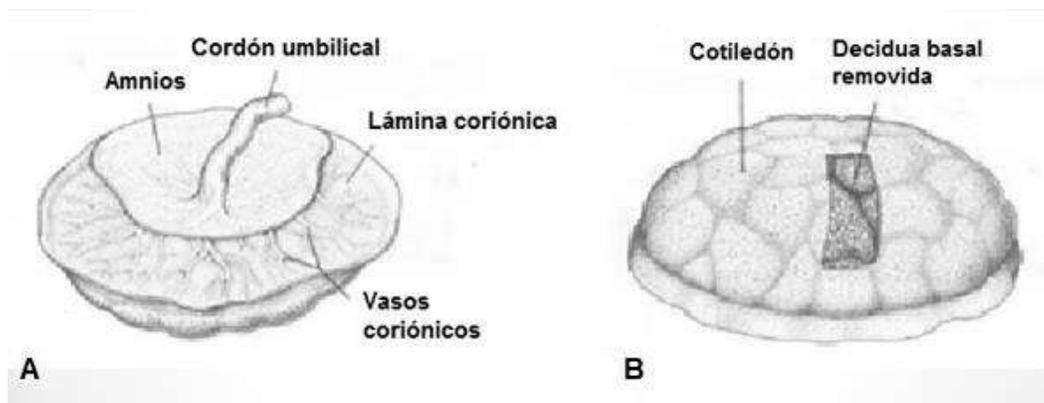


Figura 4. Estructura de la placenta a término. A. Placenta vista por el lado fetal, se observa la lámina coriónica, los vasos coriónicos y el cordón umbilical que están cubiertos por el amnios. B. Placenta vista por el lado materno mostrando los cotiledones con la decidua basal removida. Sadler(2009).

1.2.1. Anatomía general de la placenta

Vellosidades coriónicas: son las unidades anatómico funcionales de la placenta. Transfieren productos metabólicos cuando la sangre materna desemboca en los espacios intervillosos y el intercambio con la sangre fetal tiene lugar a medida que la sangre materna circula alrededor de las vellosidades (Moore y Persaud, 2004).

Cotiledones placentarios: en la placenta, vista desde la superficie materna, existe un número variable (10-38) de áreas convexas un poco elevadas denominadas cotiledones. Las vellosidades se ramifican de manera repetida y forman subdivisiones cada vez más finas. Cada una de las vellosidades del tallo principal y sus ramificaciones constituyen un cotiledón. Cada cotiledón está abastecido por una rama de la arteria coriónica; así mismo, para cada cotiledón existe una vena, lo que resulta en una relación 1:1:1 de la arteria a vena a cotiledón (Moore y Persaud, 2004).

Tabiques placentarios: los cotiledones están separados de manera incompleta por surcos de profundidad variable que se denominan tabiques placentarios, compuestos de tejido fibroso con pocos vasos confinados principalmente a sus bases. Estos tabiques de base

ancha no alcanzan ordinariamente la placa coriónica, por lo que producen sólo compartimientos incompletos (Moore y Persaud, 2004).

Cordón umbilical: es una estructura que une un embrión en vías de desarrollo o feto a su placenta. Su exterior es blanco y opaco, húmedo y revestido por el amnios, a través del cual pueden verse sus dos arterias y una vena. Su diámetro es de 0.8-2.0 cm, con una longitud promedio de 55 cm. La matriz extracelular, que es un tejido conectivo gelatinoso especializado, consta de gelatina de Wharton. Las dos arterias tienen un diámetro más reducido que el de la vena. Los vasos que contiene el cordón se caracterizan por ser espirales o retorcidos (Moore y Persaud, 2004).

Dado que casi todo el aporte nutricional requerido para el desarrollo y la maduración fetal se realiza desde la placenta por la vena umbilical, la circulación fetal tiene que diferir respecto a la del adulto. La vena umbilical transporta sangre oxigenada y nutrientes desde la placenta al feto. La sangre no oxigenada retorna a la placenta a través de las dos arterias umbilicales (Moore y Persaud, 2004).

1.2.2. Placentación

Normalmente en la implantación del blastocisto, el trofoblasto invade las arterias espirales uterinas (Master y col., 2004). Esto lleva a un remodelado de las arterias espirales en donde se modifican todas las capas de estos vasos sanguíneos y pierden la capa muscular y el endotelio para convertir los vasos sanguíneos de pequeño calibre en arterias útero-placentarias de gran capacidad para una adecuada perfusión sanguínea al feto. Esto genera una disminución en la resistencia vascular y la consiguiente dilatación y aumento del flujo sanguíneo (Del Monaco y col., 2008). La falla en esta transformación, ocasiona un abastecimiento sanguíneo insuficiente para la placenta en crecimiento, hipoxia y un cambio en la secreción de factores angiogénicos (Pacora, 2006).

En la PE, hay una invasión endovascular limitada y superficial de las arterias espirales por parte del trofoblasto y no sufren la transformación vascular adecuada (Figura 5). Alrededor del 30 a 50% de las arterias espirales escapan a la remodelación del trofoblasto

endovascular y por lo tanto hay una disminución de la perfusión sanguínea hacia el espacio intervelloso, ocasionando isquemia placentaria (Huppertz, 2008).

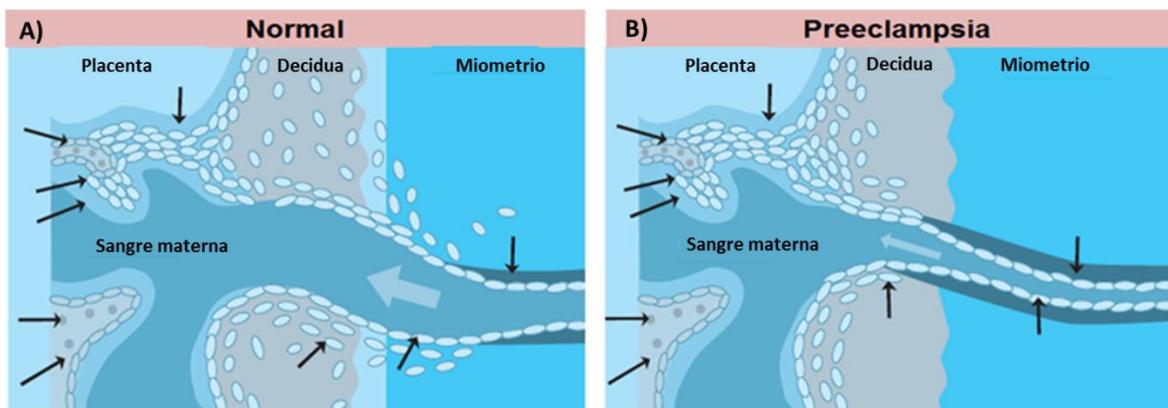


Figura 5. Remodelación de las arterias espirales durante la placentación normal y con PE. Durante la placentación normal (panel A), las arterias espirales maternas en el miometrio cambian de vasos de pequeño calibre a vasos de mayor calibre y mayor capacitancia, favoreciendo el mayor suministro de sangre materna y nutrientes al feto. Durante el proceso de invasión vascular, el trofoblasto se transforma de un fenotipo epitelial a un fenotipo endotelial (seudovasculogénesis). En la PE (panel B), las arterias espirales conservan un calibre disminuido y mayor resistencia al flujo sanguíneo, con sus paredes musculares bajo control del sistema nervioso autónomo. Esto favorece la isquemia placentaria y la enfermedad vascular del embarazo. Las flechas muestran la invasión por trofoblastos durante la implantación embrionaria. Modificada de Karumanchi y col.(2005).

Se ha propuesto que en la PE, la isquemia placentaria es un evento temprano, la cual ocasiona la producción de factores solubles que causan la disfunción endotelial materna, produciendo el cuadro clínico de la enfermedad (Genbacev y col., 1999).

La disfunción endotelial se caracteriza por una respuesta endotelial alterada, adhesión celular y coagulación. La regulación de la barrera de células endoteliales es absolutamente dependiente de los componentes del citoesqueleto y su alteración aumenta la disfunción de la barrera endotelial (Rolfe y col., 2005).

En el embarazo se produce estrés oxidativo caracterizado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el embarazo normal, la producción de ROS se ve contrarrestada por las defensas antioxidantes abundantes. Sin embargo, en la PE la producción excesiva de ROS domina las defensas antioxidantes, conduciendo a un

aumento del estrés oxidativo, incluyendo radicales hidroxilo ($-OH$) y peroxinitrito ($ONOO-$) (Takagi y col., 2004).

El embarazo normal se asocia con un aumento en el ritmo cardiaco, volumen plasmático y gasto cardiaco, así como la disminución a mediados de la gestación de la resistencia vascular y la presión sanguínea. Estos cambios hemodinámicos garantizan la suficiente sangre y el suministro de nutrientes al feto en desarrollo. En cambio durante la PE el flujo sanguíneo útero-placentario está disminuido y la resistencia vascular uterina se incrementa generando la hipertensión arterial (Ossama y col., 2010).

La hipertensión en el embarazo continúa siendo un gran problema de salud en todo el mundo. Es una de las mayores causas de parto prematuro, mortalidad perinatal y figura además entre las primeras causas de muerte materna, tanto en países industrializados como aquellos en desarrollo (Saftlas y col., 1990). Su prevalencia es del 5-10% de los embarazos (Roberts y Gammill, 2005).

La hipertensión arterial que se presenta en la PE es un trastorno cardiovascular caracterizado por la alteración del tono vascular con un aumento de la contractilidad vascular, que se acompaña de proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares y de diversos grados de infiltración de la pared arterial, lo que se denomina como remodelado vascular. La angiotensina II contribuye al remodelado vascular mediante la activación de señales que promueven la vasoconstricción, el crecimiento celular y la inflamación (Jalila y col., 2005).

Las proteínas Rho, han sido implicadas en una amplia gama de trastornos vasculares del músculo liso incluyendo hipertensión, aterosclerosis y el daño al miocardio por isquemia, ya que tienen un papel importante en la contracción vascular generando vasoconstricción en la hipertensión arterial y debido a esto pueden participar en la patogénesis de la PE (Wareing y col., 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1. Proteínas G

Existen 2 clases de proteínas G dependiendo del peso y estructura molecular: las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G monoméricas (de bajo peso molecular). Se conocen como proteínas G debido a que unen nucleótidos de guanina y ciclan entre un estado inactivo cuando tienen unido GDP y un estado activo cuando tienen unido GTP. Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades (α , β y γ) que funcionan como transductores de ciertos receptores conocidos como receptores acoplados a proteínas G (GPCR), localizados en la membrana plasmática (Kaziro y col., 1991).

Las proteínas G monoméricas pertenecen a la superfamilia de Ras, éstas son importantes ya que sus miembros son reguladores maestros de muchos procesos celulares que se detallan en la Tabla 1 (Manneville y Hall, 2002). La superfamilia Ras se agrupa en función de la homología de su composición de aminoácidos en las siguientes subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Wennerberg y col., 2005). La familia Rho es de interés especial ya que regula vías de transducción de señales intracelulares según cambios en el medio (Sagi y Hall, 2000).

Tabla 1. Funciones de los miembros de la superfamilia de Ras. Menna y col. (2010).

Subfamilia	Funciones Principales	Miembros representativos
Ras	Control de la expresión génica, proliferación celular, diferenciación, supervivencia	Ras, Rap, R-Ras, Ral, Rheb (36 miembros)
Rho	Reorganización del citoesqueleto, progresión del ciclo celular, expresión génica	Rac, Rho, Cdc42 (20 miembros)
Rab	Tráfico vesicular, vías endocíticas y secretorias	Rab1, Rab5 (61 miembros)
Ran	Transporte nucleoplasmático de ARN y proteínas	Ran
Arf	Regulación de tráfico vesicular	Arf1, Arf6 (35 miembros)

2.1.1. Proteínas Rho

La familia Rho incluye proteínas clave en la transducción de señales provenientes del exterior de la célula hacia los efectores intracelulares tanto citoplasmáticos como nucleares. Estas proteínas monoméricas contienen entre 190 y 250 residuos y presentan pesos moleculares que van de 20 a 30 kDa (Lartey y López, 2009).

Las proteínas pertenecientes a la familia Rho desempeñan un papel importante en varias funciones celulares, especialmente en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y por lo tanto en la morfogénesis de la célula, así como en la capacidad de las células para migrar e invadir los tejidos circundantes, incluyendo además el crecimiento celular, la diferenciación, la motilidad, la citocinesis, el transporte intracelular, regulación de la transcripción de genes, entre otras funciones (Sorokina y Chernoff, 2005).

La alternancia entre los estados de activación de las proteínas Rho está altamente regulada por las proteínas que regulan la actividad de GTPasa o el intercambio de nucleótidos. Existen tres clases de proteínas reguladoras: (a) los factores intercambiadores de guanina (GEF, por sus siglas en inglés), que activan a las GTPasas incrementando la tasa de liberación del nucleótido unido y por lo tanto facilitando el intercambio de GDP por GTP, de los cuales se han identificado más de 60 GEFs; (b) las proteínas activadoras de la actividad de la GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés) que estimulan la actividad de GTPasa endógena y así facilitan la hidrólisis de GTP a GDP, de las cuales se han identificado cerca de 70 proteínas (Manneville y Hall, 2002); (c) los inhibidores de la disociación de nucleótidos GDP (GDI, por sus siglas en inglés), que inhiben la disociación del GDP previniendo su reemplazo por GTP (Figura 6) (Coleman y col., 2004).

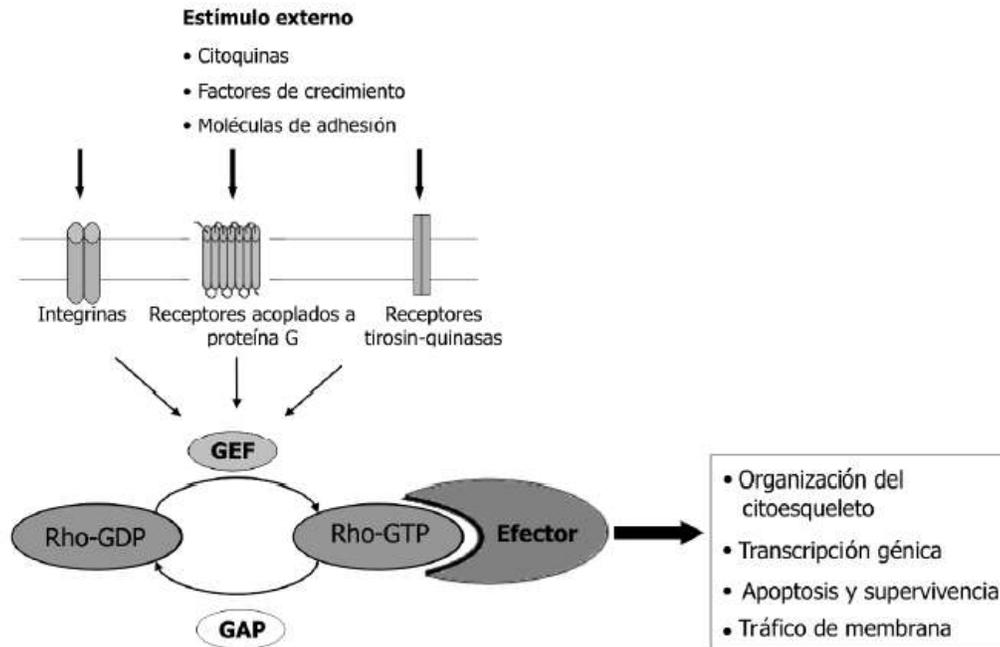


Figura 6. Modelo de regulación de las proteínas Rho. Las proteínas actúan como transductores de señales al ser activadas por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que responden a una gran variedad de estímulos extracelulares a través de la activación de diferentes receptores de membrana. La conformación activa de Rho es capaz de unirse a diversas moléculas efectoras, regulando así variadas funciones celulares como pueden ser la organización del citoesqueleto, transcripción génica, apoptosis y tráfico de membrana entre otras. Las proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (GAP) aceleran la hidrólisis del GTP inactivando la proteína Rho. Menna y col. (2010).

Los cambios morfológicos inducidos por las formas activadas de la familia Rho comparten muchos aspectos: incremento en la polimerización de actina, agrupamiento de integrinas y ensamblaje de complejos de proteínas del citoesqueleto (contactos focales).

Todas las proteínas Rho han conservado los residuos de Gly14, Thr19, Phe30 y Gln63 que son necesarios para la unión al GTP. Su estructura central incluye un dominio efector, el cual cambia la conformación entre los estados de unión a GTP y GDP; 4 regiones separadas de unión al nucleótido; una región hipervariable, la cual es la región de mayor diversidad entre los distintos miembros de la familia Rho y un motivo denominado caja CAAX, la cual actúa como señal para tres modificaciones postraduccionales secuenciales: prenilación, proteólisis y metilación (Lartey y López, 2009).

2.1.2 Tipos de proteínas Rho

La familia Rho en mamíferos se puede dividir en 8 subgrupos que componen 22 miembros, de los cuales Rho, Rac y Cdc42 son considerados los miembros “clásicos” y son los tres miembros más extensamente caracterizados de la familia. Estas proteínas son estructuralmente muy parecidas (de 40 a 95% de identidad en su composición aminoacídica), además de tener un tamaño muy similar (190-195 aminoácidos) (Ellenbroek y Collard, 2007).

Además de la regulación del citoesqueleto, las proteínas Rho, Rac y Cdc42 están involucradas en una gran variedad de funciones celulares, mediando la transcripción de determinados genes. La proteína Rac, por ejemplo, estimula la cascada de cinasas del amino terminal de c-Jun (JNK) y transmite así información al núcleo para regular la expresión de un gran número de genes (Ellenbroek y Collard, 2007). En las células de mamíferos, la proteína Rac es crucial para la generación de lamelipodios induciendo la polimerización de actina, que conduce a la protrusión de la membrana y es esencial para la migración de todas las células examinadas hasta ahora. La inhibición de Rac impide completamente el movimiento (Heasman y Anne, 2008).

La proteína Cdc42 ha sido implicada en la quimiotaxis, induce la curvatura de la membrana, así como el control de las señales de polaridad que se requieren para la migración dirigida e induce filopodios, los cuales funcionan como sondas sensoriales durante la migración dirigida. En ausencia de Cdc42, los macrófagos ya no reconocen un gradiente quimioatractivo y se mueven al azar. El aumento en la actividad de Cdc42 puede estimular la velocidad de migración. También esta proteína se requiere para la generación del axón, las dendritas y las neuritas (Heasman y Anne, 2008).

Las proteínas Rac y Cdc42 desempeñan un papel regulador esencial durante la fagocitosis en los macrófagos. Son necesarios para la internalización de los microorganismos por inmunoglobulinas. Además, la fagocitosis está acompañada por un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa que genera radicales superóxido como parte del mecanismo de muerte bacteriana, y la proteína Rac es un regulador alostérico de esta

enzima, además que estimula la extensión de la membrana durante la fagocitosis (Manneville y Hall, 2002).

Hay tres isoformas de Rho: RhoA, RhoB y RhoC, las cuales son altamente homólogas y todas inducen la formación de fibras de estrés, adhesiones focales y se requieren durante el movimiento para generar las fuerzas de retracción. La repulsión requiere la activación de Rho, mientras que el avance celular está asociado con la activación de Rac (Heasman y Anne, 2008).

RhoB se localiza en endosomas y regula el tráfico de vesículas. También se ha propuesto que funciona como supresor tumoral ya que su expresión se reduce en los tumores y su sobreexpresión inhibe el crecimiento celular, supervivencia, invasión y metástasis. En cambio, la expresión de RhoC se relaciona con la metástasis para varios tipos de cáncer (Heasman y Anne, 2008).

Entre las tres isoformas de Rho, RhoA es la más ubicua y abundante. Es un miembro importante de la familia Rho ya que regula muchas actividades vitales de las células eucariontas tales como la formación de adhesiones focales, fibras de estrés, activación transcripcional, crecimiento celular, cambio en la permeabilidad del tejido endotelial, la regulación del ciclo celular, la contracción celular y regulando diversos procesos relacionados con la hipertensión, inflamación y trombosis (Shigetatsu y col., 2002).

En las células musculares lisas de los vasos sanguíneos se estimula la fosforilación de la cadena ligera de miosina a través de la proteína RhoA que promueve la contracción de actina y miosina de esta manera regula la contracción del músculo liso (Zhao y col., 2006).

Se ha reportado que varios factores activan a la proteína RhoA en las células vasculares entre las que se incluyen la trombina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), la angiotensina II, el ácido lisofosfatídico y la endotelina 1, las cuales generan la contracción vascular involucrada en la hipertensión arterial (Rolfe y col., 2005).

Los efectos biológicos de las proteínas Rho son mediados por un número de proteínas efectoras río abajo. Varias proteínas efectoras de Rho han sido aisladas, entre ellos se encuentra la Rho cinasa (ROCK) que ha sido muy estudiada y se ha sugerido que es uno de los principales efectores de Rho que median la reorganización del citoesqueleto de actina, además está involucrada en la fisiología de la hipertensión(Thumkeo y col., 2003).

2.1.3. Efectores de las proteínas Rho

Las proteínas efectoras de Rho se definen como proteínas que se unen selectivamente a las proteínas Rho activas. Hay más de 70 efectores identificados para los miembros de la familia Rho, las cuales incluyen serina-treoninacinasas, tirosina cinasas, lípido cinasas, lipasas, oxidasas y proteínas de andamiaje (scaffold proteins). El grupo de proteínas efectoras más conocidas es el que está involucrado en la reorganización del citoesqueleto de actina como ROCK, PKN, Dia, entre otros(Jaffe y Hall, 2005).

Las diferencias conformacionales de unión a GDP y GTP se limitan principalmente a 2 regiones en la superficie llamadas regiones interruptoras o switch I y II (Ihara y col., 1998). Las proteínas efectoras utilizan estas diferencias para discriminar entre las formas activas e inactivas, a pesar de que también interactúan con otras regiones de las GTPasas (Bishop y Hall, 2000).El mecanismo más común de la activación del efector por las proteínas Rho, parece ser la alteración de sus interacciones autoinhibitorias, exponiendo dominios funcionales dentro de la proteína efectora (Bishop y Hall, 2000).

Se conocen dos moléculas efectoras de RhoA, la ROCK y la formina Dia, los cuales se requieren para el ensamblaje de fibras de estrés, la formación de adhesiones focales y la unión de actina a la membrana. Por otra parte, las proteínas efectoras de Cdc42 tales como WASP y N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome proteins) están involucradas en la formación de filopodios. A su vez, estas proteínas se unen directamente a monómeros de actina y activan al complejo Arp2/3, el cual actúa como un sitio de nucleación para comenzar la polimerización del citoesqueleto. Por su parte, Rac también es capaz de activar el complejo Arp2/3 mediante la interacción con WAVE (WASP-like prolin-homologous protein) provocando la formación de lamelipodios. Otro de los efectores

importantes de Rac es la familia de PAK (p21-activated kinase) que son capaces de activar a LIM cinasa y así modular la longitud de los microfilamentos (Bishop y Hall, 2000).

Además de su efecto sobre el citoesqueleto, las proteínas Rho regulan diferentes vías de transducción de señales que llevan a cambios en la expresión génica. Regulan factores de transcripción entre los que se incluyen SRF (serum response factor) y NFκB, además de diferentes vías de señales como JNK (c-jun N-terminal kinase) y p38 MAP cinasa (Jaffe y Hall, 2005).

Por otra parte, las proteínas Rho son capaces de influenciar diferentes actividades enzimáticas. Uno de los primeros efectores de Rac identificados fue p67phox, un componente estructural del complejo NADPH oxidasa que se encuentra en las células fagocíticas. A partir de estos datos, se reportó que Rac promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), actividad posiblemente mediada por la familia de oxidasas Nox (Bishop y Hall, 2000).

Las proteínas Rho controlan múltiples aspectos de la progresión de la fase G1 y de la fase M en el ciclo celular, ya que activan proteínas claves en la división celular y modulan la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular como la ciclina D1 (Bishop y Hall, 2000).

Las proteínas ROCK, efectores de RhoA, fosforilan varios sustratos, dando lugar a diversas respuestas celulares tales como la contracción del músculo liso, la migración celular y el crecimiento de las neuritas (Blumenstein y Ahmadian, 2004).

RhoA en su forma activa eleva la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), a través de su efector río abajo ROCK, el cual fosforila e inhibe la fosfatasa MLC (MLCP), aumentando la actividad contráctil del músculo liso. Esto produce un mayor nivel de fosforilación de la MLC resultando en la sensibilización al Ca^{2+} (Figura 7) (Rolfe y col., 2005).

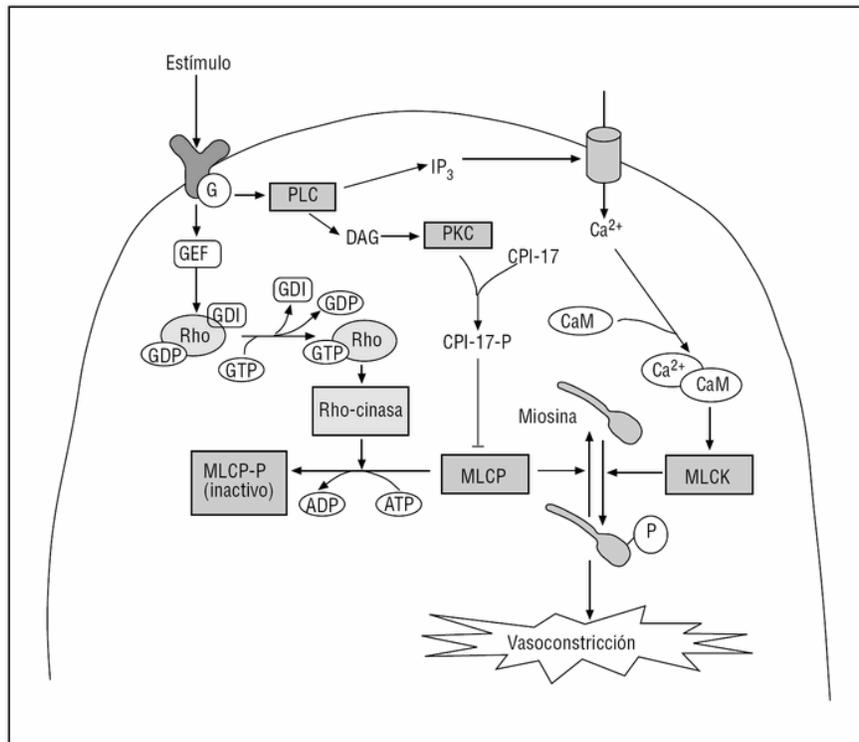


Figura 7. Regulación de la contracción de las células musculares lisas vasculares por la Rho-cinasa (ROCK).

Los reguladores de la contracción de las células musculares activan 3 mecanismos independientes. 1) El mecanismo tradicional involucra la activación de la fosfolipasa C (PLC), producción de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃), aumento del calcio intracelular por activación de un canal de calcio, y activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La fosforilación de la miosina induce y mantiene la contracción permanente de la fibra de actina-miosina. 2) El segundo mecanismo cursa a través de la activación de la proteína cinasa C (PKC) mediada por PLC, que a su vez se activa por fosforilación de CPI-17. CPI-17 inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), manteniéndola fosforilada y contraída. 3) El tercer mecanismo involucra la activación del factor intercambiador de guanina (GEF), RhoA y la activación de Rho-cinasa. Rho-cinasa fosforila la MLCP, inactivándola. Jalil y col.(2005).

Los neutrófilos liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden activar la vía RhoA/ROCK para mejorar la reactividad muscular. Las arterias de mujeres con PE tienen una extensa infiltración de neutrófilos y una mayor reactividad a la angiotensina II, esto se asocia con la inflamación vascular (Mishra y col., 2011). Por otro lado también la vía de señalización de RhoA/ROCK media la migración endotelial y angiogénesis por medio del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)(Zhao y col., 2006).

La molécula Dia (Diáfana con homología a formina en humanos) es un efector de la proteína RhoA que promueve la polimerización, nucleación y ramificación de los

filamentos de actina por la interacción con profilina (Ishizaki y col., 2001). RhoA unida a GTP activa a Dia para transformar las fibras de actina en fibras de estrés inducidas por ROCK (Watanabe y col., 1999).

La proteína cinasa N (PKN), al igual que ROCK, también aumenta la contracción vascular por la fosforilación de la proteína PPP1R14A (antes conocida como CPI-17), la cual inhibe la subunidad PPP1c de la fosfatasa de miosina, para permitir la fosforilación de la miosina y así generar la contracción del músculo liso (Watanabe y col., 1996).

Las proteínas ROCK, Dia y PKN son las moléculas efectoras de la proteína RhoA que operan en las células del músculo liso regulando la reorganización del citoesqueleto y por lo tanto su contracción (Larsson y col., 2007). Debido a esto, podrían estar involucradas en la contracción vascular observada en la PE.

2.2. Proteínas RhoA y su papel en la hipertensión

Las proteínas RhoA tienen un papel central en la regulación de diversos procesos celulares, por lo que su alteración o desbalance puede ser la causa molecular de diversas enfermedades del ser humano incluyendo al cáncer, desórdenes neurodegenerativos, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias crónicas, hipertensión, entre otras. Por ello, se han convertido a las proteínas RhoA en blancos de diferentes estrategias terapéuticas a nivel molecular (Menna y col., 2010).

La proteína RhoA es comúnmente activada en las arterias de varios modelos de hipertensión, indicando que RhoA muestra ser un interruptor molecular en la hipertensión. Se ha demostrado que hay sobreexpresión de la proteína RhoA en las arterias de pulmón de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática (IPAH) en comparación de los pacientes sanos (Figura 8) (Laumanns, 2009).

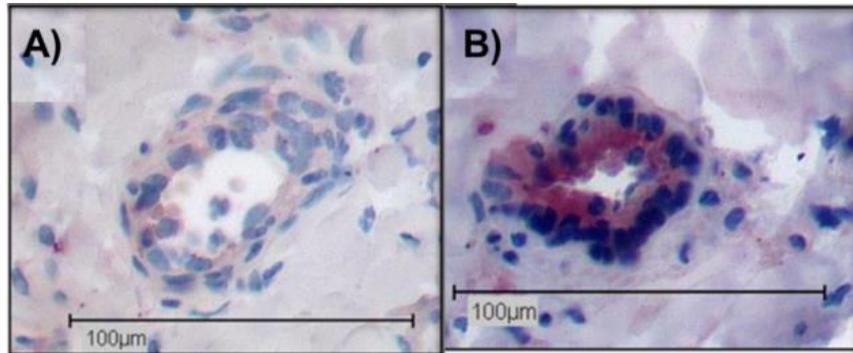


Figura 8. Expresión de la proteína RhoA en arterias de tejido de pulmón.A) Tejido de voluntarios sanos B) Tejido de pacientes con hipertensión arterial pulmonar. Donde se muestra que hay una sobre expresión de la proteína RhoA en arterias de pacientes con hipertensión arterial pulmonar. Laumanns y col.(2009).

Por otro lado, Moriki y colaboradores estudiaron el estado de activación de la proteína RhoA en células de músculo liso de ratas hipertensas por medio de la técnica de “pull-down”, la cual consiste en la separación de la fracción de RhoA unida a GTP de la muestra en estudio. Se observó que hay un aumento significativo del estado de activación de la proteína RhoA en ratas hipertensas en comparación de las normales, mientras que los niveles de la proteína RhoA total no cambiaron. Con esto, ellos concluyen que una alta activación de RhoA en ratas hipertensas puede ser el mecanismo por el cual RhoA puede estar involucrada en la hipertensión (Figura 9) (Moriki y col., 2004).

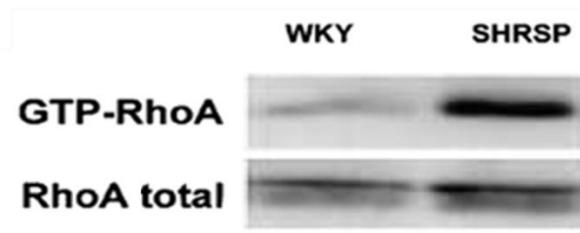


Figura 9. Niveles de activación de RhoA en células de músculo liso de ratas.Se observa un aumento en el nivel de activación de la proteína RhoA en células de músculo liso de ratas SHRSP a comparación de las WKY. WKY: ratas Wistar-Kyoto normales y SHRSP: ratas espontáneamente hipertensas. Moriki y col. (2004).

2.3. Proteína RhoA, moléculas efectoras y su relación en el embarazo y la preeclampsia

Las proteínas RhoA han sido implicadas en una amplia gama de trastornos vasculares del músculo liso incluyendo la hipertensión, la aterosclerosis y el daño al miocardio por isquemia, debido a esto, RhoA pudiera estar involucrada en la hipertensión asociada a la PE. En nuestro antecedente directo del laboratorio realizado por Campos-Arroyo (2009), se identificó a la proteína RhoA en muestras de cotiledón, cordón umbilical, arteria y vena umbilical de placentas de mujeres sanas y con PE, en donde se observa que no hay una diferencia en cuanto al nivel de expresión de la proteína RhoA total (Figura 10). Cabe destacar que no se han realizado estudios sobre el estado de activación de la proteína RhoA en placentas de mujeres con PE.

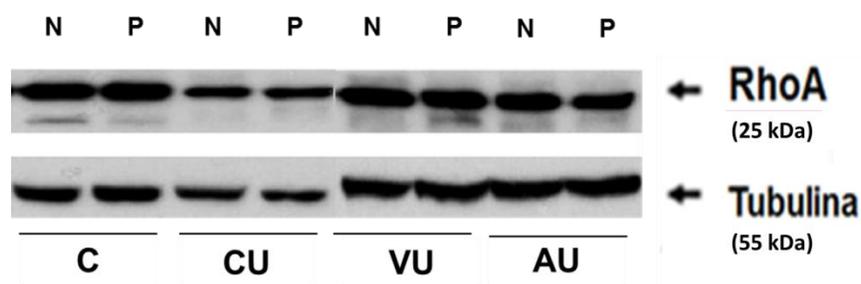


Figura 10. Inmunodetección de la proteína RhoA en muestras de placentas de mujeres sanas (N) y con PE (P). C: cotiledón; CU: cordón umbilical; VU: vena umbilical; AU: arteria umbilical. Campos-Arroyo (2009).

Las proteínas ROCK son la familia de proteínas mejor caracterizado en las células del músculo liso. Aunque los niveles de ROCK no se alteran con el embarazo o el parto, los niveles de RhoA activa son elevados en el parto y parece que los cambios río arriba de ROCK controlan la fosforilación de la MLC y la contracción en el parto (Lartey y López, 2009).

La expresión alterada de ROCK puede dar lugar a las patologías observadas en la PE. En un estudio realizado por Ark y col. (2005) por medio de inmunohistoquímica y Western blot, revelan que ROCK2 se localiza principalmente en las células del trofoblasto de las vellosidades coriónicas de la placenta y aumenta en la PE. Lo anterior sugiere que el

aumento de la expresión de ROCK2 en placentas con PE puede contribuir a la etiología de la patogénesis de este síndrome (Figura 11).

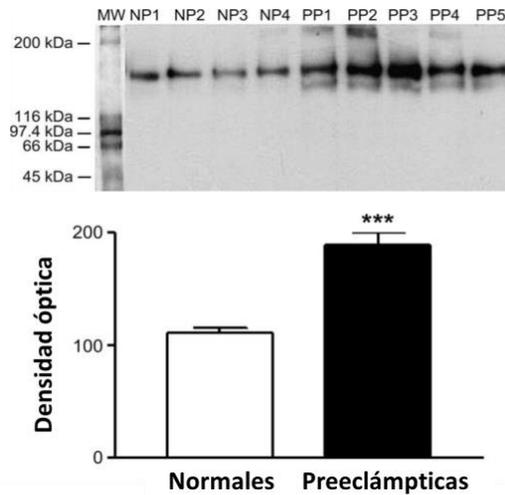


Figura 11. Expresión de ROCK2 en homogenados de placenta humana de embarazos normales y con PE. panel superior: Western blot; panel inferior: densitometría. MW: marcador de peso molecular; NP: paciente normal; PP: paciente con PE. obsérvese un aumento en la expresión de ROCK2 en muestras de pacientes con PE a diferencia de las voluntarias sanas. Ark y col.(2005).

Hasta la fecha, en la placenta humana normal sólo se han identificado los siguientes efectores de Rho: ROCK, PKN y Dia como lo muestra el estudio realizado por Lartey y col. en 2007 (Figura 12). En cambio, en placentas de pacientes con PE sólo de ha identificado el efector ROCK2 de la proteína RhoA(Lartey y col., 2007).

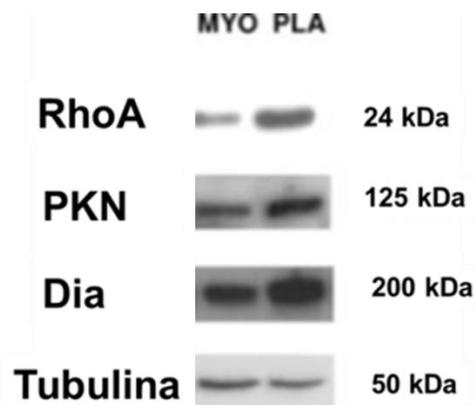


Figura 12. Niveles de expresión de las proteínas RhoA, PKN y Dia en el miometrio (MYO) y la placenta (PLA).Lartey y col.(2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la preeclampsia es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y fetal en el mundo y a que la proteína RhoA juega un papel en la hipertensión es necesario determinar la localización *in situ* de RhoA en los vasos sanguíneos de la placenta y el cordón umbilical, así como su estado de activación. Además, es importante determinar la expresión de sus moléculas efectoras, ya que sería de gran ayuda para comprender mejor la patogénesis de esta enfermedad.

4. HIPÓTESIS

En las placentas preeclámpticas existe una variación en la localización *in situ* y el estado de activación de RhoA así como los niveles de expresión de sus moléculas efectoras.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Analizar la localización *in situ* y el estado de activación de la proteína RhoA y la expresión de sus proteínas efectoras en las placentas de mujeres con preeclampsia.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la localización *in situ* de la proteína RhoA en las placentas de mujeres con preeclampsia.
- Evaluar el estado de activación de la proteína RhoA en las placentas de mujeres con preeclampsia.
- Determinar la presencia y los niveles de expresión de las moléculas efectoras de RhoA (ROCK1, ROCK2, PKN y Dia) en las placentas de mujeres con preeclampsia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las placentas de pacientes con preeclampsia y normotensas fueron proporcionadas por el Hospital General Dr. Miguel Silva de Morelia Michoacán. Las placentas de mujeres con preeclampsia se obtuvieron de pacientes con presión sanguínea sistólica ≥ 140 mm Hg o presión sanguínea diastólica ≥ 90 mm Hg, junto con un resultado positivo de proteinuria en la orina (Tabla 2). Las placentas de mujeres normotensas y con PE fueron colectadas inmediatamente después del parto, se les agregó PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) y se colocaron en un contenedor especial con hielo para el traslado al Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para su posterior procesamiento.

TABLA 2. Valores de inclusión de las muestras placentarias.

	Presión sanguínea	Proteinuria
Pacientes normales	120/80 mmHg	-----
Pacientes Preeclámpticas	> 140/90 mmHg	POSITIVO

6.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de cotiledón, vena y arteria del cordón umbilical de cada placenta. Los tejidos se seccionaron empleando un bisturí sin hacer presión sobre ellos. Se realizaron cortes de 10 mm de longitud de un grosor de 5 mm.

6.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

Las diferentes muestras de cada placenta se lavaron con una solución de PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) para eliminar los restos de sangre. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) (pH 7.4) al 4% en PBS

0.1M durante 24 horas. Posteriormente se les agregó una solución de sacarosa al 30% en PBS al 0.1M. Por último los tejidos se colocaron en los compartimentos del criomolde y se agregó el medio O.C.T. (Optimum Cutting Temperature, Sakura, Japón) como medio de preservación. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Se realizaron cortes de 14 µm a los tejidos preservados en O.C.T. en un criostato (Leica DM300) a una temperatura de -25°C. Estos cortes se colocaron en porta objetos gelatinizados al 1% y secadas a temperatura ambiente durante 20 min y almacenadas a 4°C.

Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina para observar la estructura del tejido. Los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina por 5 minutos y se lavó con agua por 2 minutos. Posteriormente se tiñó el citoplasma celular con eosina Y por 10 segundos y los cortes se deshidrataron progresivamente en etanol al 50%, 70%, 96% y 100% por un minuto en cada uno. Posteriormente se deshidrataron en xilol por 5 minutos y se montó el cubreobjeto con la solución Cytoseal (mounting medium).

6.2. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% por 10 min. Después se bloquearon los sitios de unión no específicos, incubando los cortes con una solución PBT-SBF 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron los cortes de las diferentes muestras con el anticuerpo primario anti-RhoA a una concentración 1:150 (Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4°C. Para retirar el exceso de anticuerpo que no se unió se realizaron 5 lavados con PBT por 5 minutos. Posteriormente, se incubaron los cortes durante una hora con el anticuerpo secundario IgG a una dilución de 1:500 por 2 horas. A continuación, se realizaron 15 lavados cada minuto con PBT para eliminar el exceso del segundo anticuerpo que no se unió al primer anticuerpo. Después de esto se incubó con avidina y biotina durante una hora. Finalmente, se reveló con diaminobenzidina (DAB). Al control negativo no se agregó el anticuerpo primario.

6.3. OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

Las inmunotinciones fueron observadas mediante el microscopio de fluorescencia (Leica), y las imágenes se digitalizaron. Posteriormente se identificaron y compararon las distintas muestras tanto normales como preeclámpticas, para determinar la localización de la proteína RhoA, empleando los objetivos 2.5x, 5x, 10x y 100x.

6.4. LISIS DEL TEJIDO

Las muestras de cotiledón, vena y arteria umbilical de mujeres normotensas y con preeclampsia se homogenizaron en buffer de lisis (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, $MgCl_2$ 10 mM, Glicerol 10%, pH 7.5) sobre hielo usando un homogenizador mecánico. Las proteínas fueron separadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos a $-4^{\circ}C$. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a $-80^{\circ}C$ hasta su uso.

6.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante el método de Lowry y col. (1951), el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. El reactivo Folin forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. El estudio 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 PE, se colocaron 10 μl de muestra en 190 μl de agua desionizada. Tanto para la curva de calibración como para las diferentes muestras se les adicionó 1 ml 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 Folin (1:1) y se dejó reposar por 30 minutos. Después, se leyó la muestra a una absorbancia de 660 nm en un espectrofotómetro UV/vis (Pekin-Elmer Lambda 18), usando un blanco para ajustar el aparato y se registraron las lecturas obtenidas. La curva de calibración se graficó en Excel y

por interpolación se estimó la concentración de proteína de las muestras, empleando la línea de interpolación.

6.6. INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RhoA TOTAL Y SUS MOLÉCULAS EFECTORAS

La inmunodetección se realizó de acuerdo al protocolo de Laemmli y col. (1970) y Towbin y col. (1979). Se tomaron 40 µg de proteína del homogenado total de cada una de las diferentes muestras y se mezclaron con 6 µl de buffer de solubilización (Tris/HCl 0.5M pH 6.8, SDS 8%, glicerol 40%, 2-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 100 µl y H₂O cbp 5 ml) y se hirvieron a 95°C durante 3 minutos. Posteriormente, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 13%) a 100V durante 2 h aproximadamente. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinildieno) a 100V durante 1 h empleando una solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). 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 la noche para bloquear sitios inespecíficos. Transcurrido este tiempo las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T, pH 7.6, durante 10 minutos cada lavado. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-RhoA, anti-ROCK1, anti-ROCK2, anti-PKN y anti-Dia (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución 1:2000 en 10 ml de TBST-leche al 5% durante 90 minutos en agitación moderada. Posteriormente, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T pH 7.6 durante 10 minutos 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 minutos. 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. El análisis densitométrico se realizó determinando la intensidad de las bandas empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ®).

6.7. ENSAYO DE “PULL-DOWN”

Para la evaluación del estado de activación de RhoA en las muestras de tejido, se incubaron 500 µg de proteína de los homogenados de cada muestra con 400 µg de GST-RBD (glutathion S transferasa etiquetado con el dominio de unión a rotecina) unido a la resina glutatión. Se dejó incubando por 1 Hr a 4°C con agitación suave. Posteriormente, las muestras se lavaron 2 veces con 400 µl de buffer de lavado y se centrifugaron a 6,000 xg por 30 segundos. Las proteínas unidas se eluyeron con 50 µl de buffer de muestra reductor para cada reacción de “pull-down”, mediante la mezcla de 1 parte de β-mercaptoetanol a 20 partes de buffer de muestra SDS 2x y se dejó incubando por 12 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 6,000 xg por 2 minutos y se calentaron las muestras eluidas durante 5 minutos a 95-100°C. Las proteínas se inmunodetectaron por SDS-PAGE y Western bloty se utilizó el anticuerpo anti-RhoA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución 1:2000.

7. RESULTADOS

7.1. Recolección del material biológico

Las placentas se obtuvieron de 9 mujeres embarazadas, de las cuales fueron 5 los controles normotensos y 4 las diagnosticadas con preeclampsia (Tabla 3).

Tabla 3. Datos clínicos de las pacientes con preeclampsia y normotensas

Muestras obtenidas	Presión sanguínea	Proteinuria	Edad gestacional	Peso del recién nacido	Peso de la placenta
Placenta 1- NORMOTENSA	110/70 mmHg	-----	39 semanas	3.560 Kg	501 grs
Placenta 2- NORMOTENSA	120/80 mmHg	-----	39 semanas	2.930 Kg	370 grs
Placenta 3- NORMOTENSA	120/70 mmHg	-----	39 semanas	2.950 Kg	481 grs
Placenta 4- NORMOTENSA	110/80 mmHg	-----	37 semanas	2.290 Kg	402 grs
Placenta 5- NORMOTENSA	120/80 mmHg	-----	37 semanas	2.910 Kg	450 grs

Placenta 6- PREECLÁMPTICA	160/100 mmHg	POSITIVO	29 semanas	1.500 Kg	163.5 grs
Placenta 7- PREECLÁMPTICA	140/90 mmHg	POSITIVO	39 semanas	2.950 Kg	340 grs
Placenta 8- PREECLÁMPTICA	150/98 mmHg	POSITIVO	36.5 semanas	1.700 Kg	201 grs
Placenta 9- PREECLÁMPTICA	160/98 mmHg	POSITIVO	35 semanas	1.450 Kg	160 s

7.2. Diferencias en los datos clínicos entre las pacientes normales y las preeclámpticas

Para observar las diferencias en las características clínicas documentadas durante la recolección de las placentas, se procedió a analizar la edad gestacional, el peso del recién nacido y el peso de la placenta en los grupos normales y con preeclampsia. Los datos analizados mostraron un menor peso del recién nacido en el grupo con PE ($P=0.017$) (Figura 13A) y también un periodo gestacional más corto ($P=0.081$) (Figura 13B).

En cuanto al peso de las placentas, se observó una disminución significativa en las placentas que pertenecen al grupo con PE en comparación con el grupo normal ($P<0.001$) (Figura 13 C). Esto sugiere que el proceso patológico interfiere con el desarrollo normal de la placenta, así como el suministro insuficiente de sangre y de nutrientes.

Con estos resultados se obtiene evidencia de la diferencia entre las placentas de mujeres con preeclampsia con respecto al grupo de placentas de mujeres normotensas.

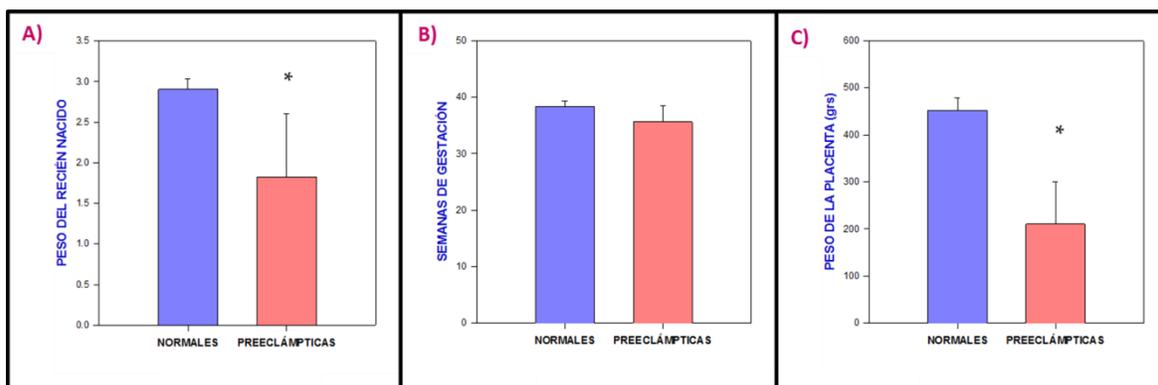


Figura 13. Diferencias en los datos clínicos entre las pacientes normales y con PE. a) peso del recién nacido, * $P = 0.017$; b) semanas de gestación, $P = 0.081$ y c) peso de las placentas, * $P = <0.001$. $n=4-5$.

7.3. Evaluación histológica de los tejidos placentarios

Cordones umbilicales normales

El cordón umbilical conecta al feto con la placenta. Todos los cordones umbilicales normales presentaron 2 arterias que llevan la sangre desde el feto hacia la placenta con un curso helicoidal alrededor de una vena única que conduce la sangre de retorno hacia el feto.

· Arterias

Todas las arterias umbilicales de los embarazos normales mostraron buen desarrollo de las capas íntima, media y adventicia (Figura 14A). La lámina media fue gruesa, organizada en dos capas: una longitudinal interna mostrando una capa de células de músculo liso longitudinales de forma fusiforme, con núcleos únicos y alargados y una circular externa de células de músculo liso. Los lúmenes de las arterias mostraron una forma ramificada y delineada por células endoteliales poligonales alargadas con núcleos prominentes. La gelatina de Wharton muestra fibras colágenas y fibroblastos en forma de uso distribuidos uniformemente con largas extensiones.

· Vena

La pared de la vena umbilical, al igual que la arteria, está constituida por 3 capas: adventicia, media e íntima (Figura 14B). La túnica adventicia está formada por tejido conectivo. La túnica íntima y media fue más delgada que en las arterias la cual presenta fibras musculares. El lumen se delinea por endotelio.

Cotiledón

La unidad anatómico funcional de la placenta consiste en las vellosidades coriónicas de diferentes tamaños contenidas en cotiledones. Estas vellosidades surgen de la placa coriónica como troncos vellosos grandes que se ramifican en vellosidades cada vez más pequeñas. En los cortes teñidos con hematoxilina-eosina se observan las vellosidades coriónicas, las cuales presentan vasos sanguíneos y células de trofoblasto (Figura 14C).

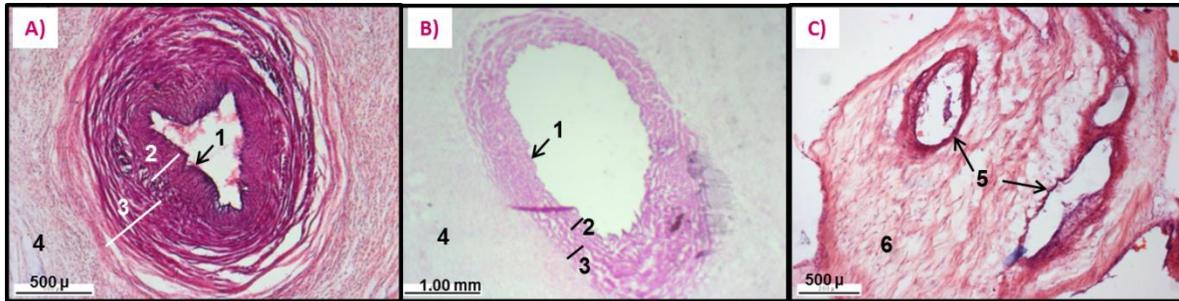


Figura 14. Tinción con hematoxilina-eosina de las muestras de placenta de embarazos normales. A) arteria umbilical, 5x; B) vena umbilical, 2.5x; C) cotiledón, 10x. 1- Endotelio; 2- túnica media; 3- túnica adventicia; 4- gelatina de Wharton; 5- vasos sanguíneos; 6- células de trofoblasto, n=5.

7.4. Evaluación histológica de las placentas de embarazos con PE

El cordón umbilical es el nexo entre el feto y la placenta, por lo tanto la configuración de los vasos umbilicales puede ser un indicador del estado fetal en la PE. Se supone que en la PE puede cambiar la estructura de los vasos del cordón umbilical, ya que la PE se acompaña de alteraciones significativas funcionales y morfológicas de las paredes arteriales.

En los cortes de las venas y las arterias umbilicales con PE, se observan grandes espacios intercelulares debido a la poca compactación del tejido, generándose una alteración de la arquitectura de las capas de estos vasos sanguíneos, sobre todo en la lámina media, en comparación con las venas y arterias umbilicales de placentas normales (Figura 15 A y B).

Las vellosidades coriónicas contienen vasos sanguíneos que controlan el volumen de sangre en la placenta que posteriormente nutrirá al feto. En la PE se sabe que hay menor suministro de sangre al feto y por lo tanto se sufre de hipoxia placentaria. En los cortes histológicos de cotiledón en placentas de embarazos con PE se observó que los vasos sanguíneos en las vellosidades coriónicas son menores con respecto al cotiledón de embarazos normales (Figura 15C). Con esto se apoya el hecho que la PE se caracteriza por una pobre perfusión de las circulaciones materno y fetal de la placenta, ya que la reducción en el lumen de los vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas en la placenta genera una reducción del flujo sanguíneo que nutre al feto y a la placenta.

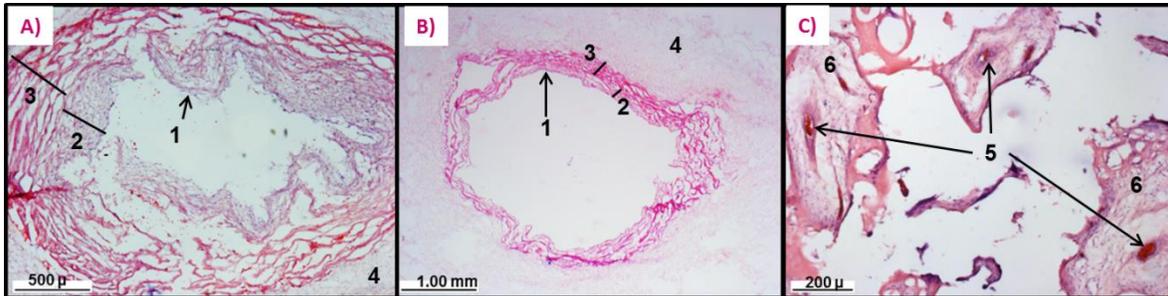


Figura 15. Tinción con hematoxilina-eosina de las muestras de placenta de embarazos con PE. A) arteria umbilical, 5x; B) vena umbilical, 2.5x; C) cotiledón, 10x. 1- Endotelio; 2- túnica media; 3- túnica adventicia; 4- gelatina de Wharton; 5- vasos sanguíneos; 6- células de trofoblasto, n=4.

Con lo observado se corrobora que en la PE puede cambiar la estructura de los vasos sanguíneos del cordón umbilical, así como de las vellosidades coriónicas de la placenta.

7.5. Inmunohistoquímica de la proteína RhoA en los tejidos placentarios

La inmunohistoquímica fue empleada para determinar la presencia y la distribución de la proteína RhoA en el cordón umbilical y en cotiledón de las placentas de mujeres normotensas y con PE. La inmunotinción de la proteína RhoA se observó en todas las muestras estudiadas y generalmente se distribuyó en los vasos sanguíneos del cordón umbilical y de los cotiledones. En la arteria y la vena umbilical de las muestras normales la tinción fue alta en todas las capas (endotelio, túnica media y adventicia) en comparación de la gelatina de Wharton que mostró menor tinción (Figura 16 A y B). En el cotiledón de las muestras normales se observa mayor tinción sobre todo en el endotelio y en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos. Las células de trofoblasto mostraron una alta tinción (Figura 16 C).

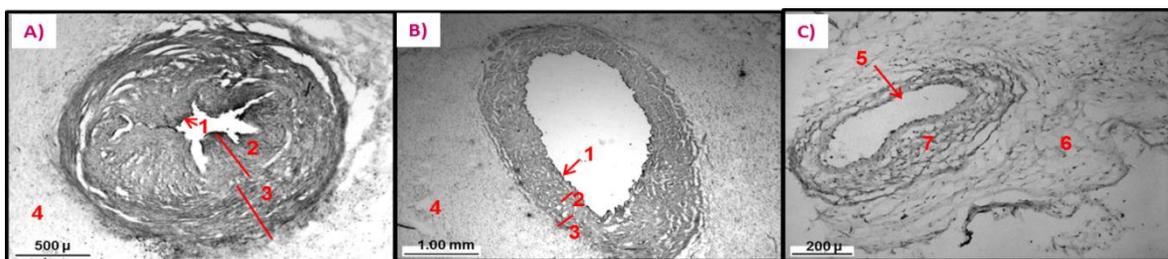


Figura 16. Distribución de la proteína RhoA en las muestras de placenta de embarazos normales. A) arteria umbilical, 5x; B) vena umbilical, 2.5x; C) cotiledón, 10x. 1- Endotelio; 2- túnica media; 3- túnica adventicia; 4- gelatina de Wharton; 5- vaso sanguíneo; 6- células de trofoblasto; 7- células musculares lisas, n=5.

La tinción inmunohistoquímica de la proteína RhoA en embarazos con PE muestra grandes diferencias en cuanto a la intensidad de tinción y de su distribución con respecto a las placentas de mujeres normotensas. En la arteria y la vena umbilical con preeclampsia se observa una menor intensidad de la tinción de la proteína RhoA en las capas de la túnica media y adventicia, así como de la gelatina de Wharton, en cambio la capa del endotelio muestra una mayor tinción (Figura 17A y B). En el cotiledón de las placentas con PE se observa una mayor tinción de la proteína RhoA en el endotelio y en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, así como en la capa del sincitiotrofoblastos. Además las células de trofoblasto mostraron una alta tinción (Figura 17 C).

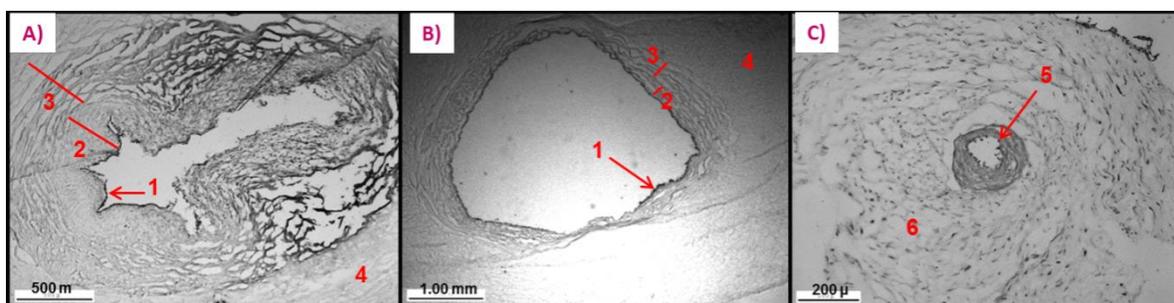


Figura 17. Distribución de la proteína RhoA en las muestras de placenta de embarazos con PE. A) arteria umbilical, 5x; B) vena umbilical, 2.5x; C) cotiledón, 10x. 1- Endotelio; 2- túnica media; 3- túnica adventicia; 4- gelatina de Wharton; 5- vaso sanguíneo; 6- células de trofoblasto, n=4.

Los datos anteriores demuestran que la proteína RhoA cambia su distribución en la arteria y la vena de cordón umbilical de placentas con PE con respecto a las placentas de embarazos normales.

7.6. Localización celular de la proteína RhoA en el cordón umbilical y el cotiledón de placentas normales y con PE.

Posteriormente se estudió la localización celular de la proteína RhoA en la arteria y la vena umbilical y en el cotiledón en embarazos normales y con preeclampsia para determinar si existen diferencias a nivel celular. Primeramente para observar la morfología celular se realizaron tinciones con hematoxilina eosina, tiñéndose de color morado el núcleo y de color rosa el citoplasma. Se pudo observar en los vasos sanguíneos del cordón umbilical que en la capa del endotelio se observan las células alargadas de 13 a 15 μm con

núcleos aplanados elípticos (Figura 18 A). La localización de RhoA a nivel celular en el endotelio en la arteria y la vena umbilical de las placentas normales y con PE mostró una misma distribución general en toda la célula, observándose en el citoplasma y en el núcleo (Figura 18 B y C).

La tinción con hematoxilina eosina de las células de músculo liso que componen los vasos sanguíneos mostraron un tamaño de 30 μm , delgadas y aguzadas en los extremos en forma de capas, rodeadas de tejido conjuntivo (Figura 19 A). La localización de RhoA a nivel celular en las células del músculo liso en la arteria y la vena umbilical de las placentas normales y con PE mostró una misma distribución general en toda la célula (Figura 19 B y C). Por otro lado se observa gran cantidad de espacios intercelulares en el tejido de músculo liso y en el endotelio de las muestras con PE sugiriendo un daño a nivel endotelial.

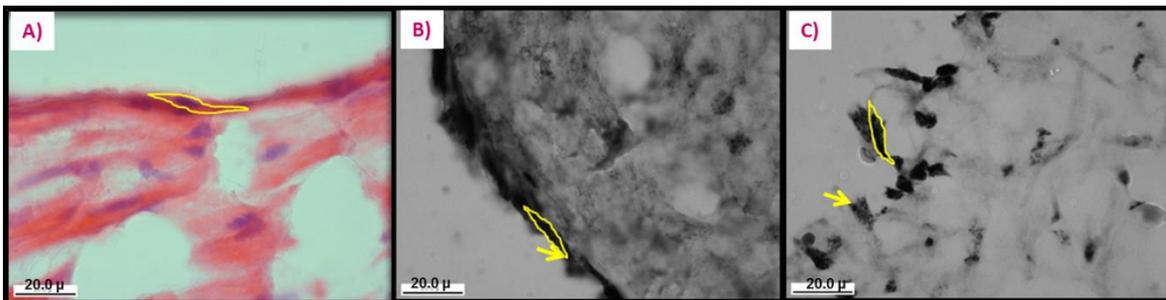


Figura 18. Localización de la proteína RhoA a nivel celular en el endotelio de los vasos sanguíneos del cordón umbilical de muestras normales y con PE. A) Tinción con hematoxilina-eosina en donde se observa la morfología de las células endoteliales; B) Inmunotinción de RhoA en el endotelio del cordón umbilical de embarazos normales y C) Inmunotinción de RhoA en el endotelio del cordón umbilical de embarazos con PE, objetivo 100x, n=4-5.

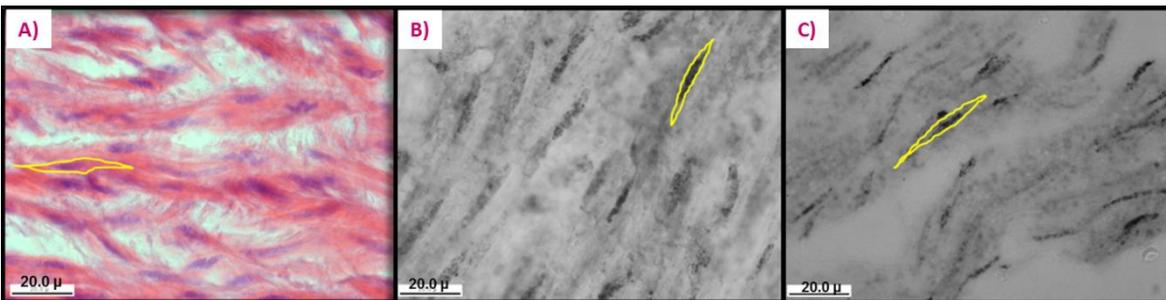


Figura 19. Localización de la proteína RhoA a nivel celular en el músculo liso de los vasos sanguíneos del cordón umbilical de muestras normales y con PE. A) Tinción con hematoxilina-eosina en donde se observa la morfología de las células del músculo liso; B) Inmunotinción de RhoA en el músculo liso del cordón

umbilical de embarazos normales y C) Inmunotinción de RhoA en el músculo liso del cordón umbilical de embarazos con PE, objetivo 100x, n=4-5.

En las muestras de cotiledón, las células del trofoblasto teñidas mediante la técnica de hematoxilina-eosina mostraron una forma alargada, en forma de huso, similares a los fibroblastos (Figura 20 A). La localización de la proteína RhoA en las células del trofoblasto en el cotiledón de las placentas normales y con PE mostraron una distribución en toda la célula, es decir, su distribución es tanto citoplasmática y como nuclear (Figura 20 B y C).

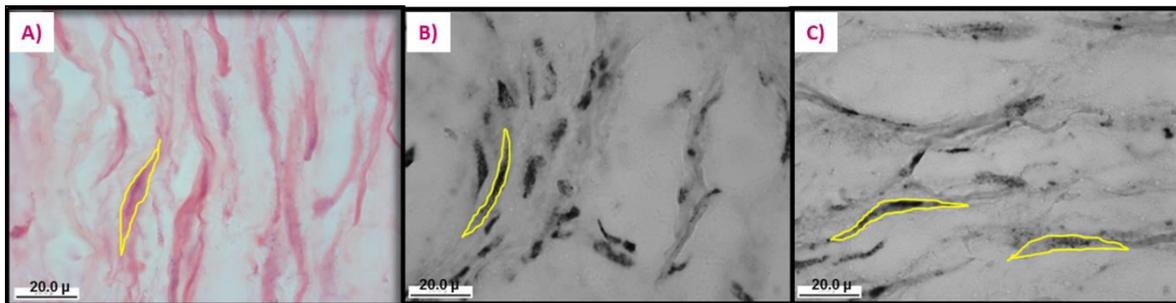


Figura20. Localización de la proteína RhoA a nivel celular en cortes de cotiledón de placentas normales y con PE.A) Tinción con hematoxilina-eosina en donde se observa la morfología de las células de trofoblasto; B) Inmunotinción de RhoA en el cotiledón de embarazos normales y C) Inmunotinción de RhoA en el cotiledón de embarazos con PE, objetivo 100x, n=4-5.

Los datos anteriores sugieren que no hay diferencias en cuanto a la localización subcelular de la proteína RhoA en las diferentes muestras de placentas de mujeres con embarazos normales y con PE.

7.7. Expresión y estado de activación de la proteína RhoA en el cotiledón, en la vena y en la arteria umbilical de placentas con PE

Al observar una diferencia en la distribución y la intensidad de inmunotinción de la proteína RhoA en las diferentes muestras placentarias, se utilizó el ensayo de Western blot para determinar los niveles de expresión total de la proteína RhoA en todas las muestras de placentas provenientes de embarazos normales y con PE. Se determinaron los niveles de actina para asegurar la misma carga de proteínas en los dos grupos. El anticuerpo anti-RhoA detectó bandas de 24 kDa, tanto en las muestras normales como con PE (Figura 21).

No hubo diferencias significativas en los niveles de expresión total de RhoA tanto en la vena y la arteria umbilical y el cotiledón en los dos grupos.

Posteriormente, para determinar el estado de activación de la proteína RhoA, se determinó la cantidad de RhoA unido a GTP en las diferentes muestras de placentas realizando el ensayo de “pull-down”. Nuestros datos demuestran un aumento significativo de los niveles de RhoA activa en todas las muestras de placenta analizadas de embarazos con PE en comparación de las normales (Figura 21, paneles superiores). Esto sugiere que mientras los niveles de RhoA total no varíen entre las muestras normales y con PE, el incremento en el estado de activación de la proteína RhoA en las muestras con PE pudiera estar involucrada en la contracción vascular observada en la hipertensión asociada a la PE. Al observar un aumento del estado de activación de la proteína RhoA en las muestras de placentas de embarazos con PE, se investigó la presencia y los niveles de expresión de moléculas efectoras conocidas de RhoA (Dia1, PKN, ROCK1 y ROCK2) en las diferentes muestras de embarazos con PE a comparación de las normales.

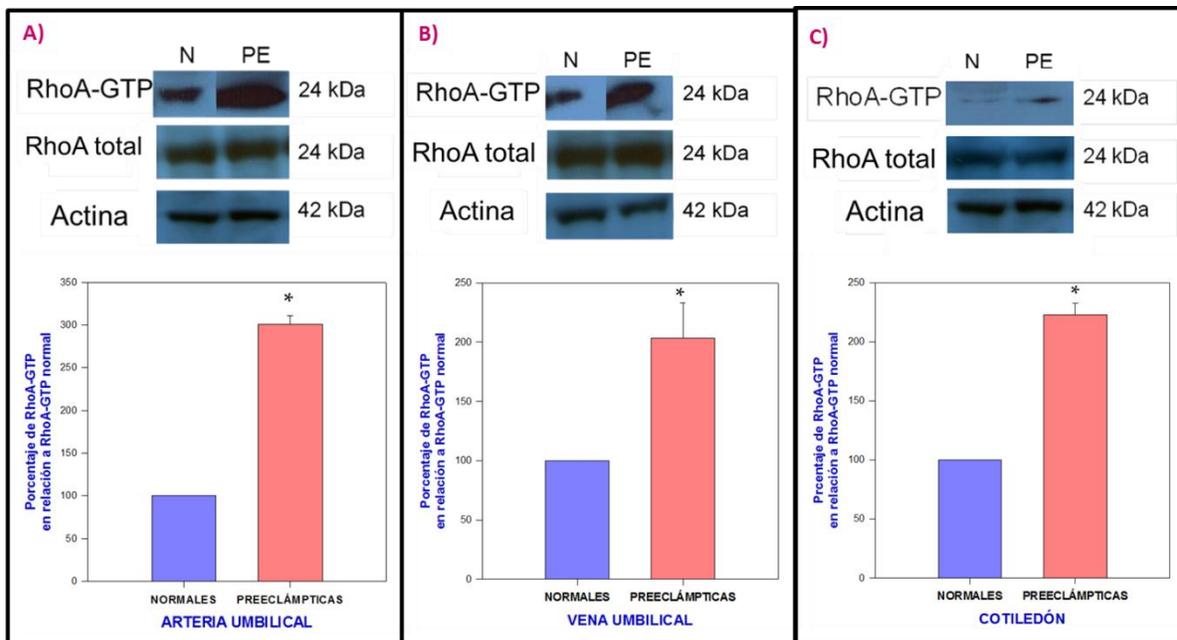


Figura 21. Niveles del estado de activación de la proteína RhoA en placentas de mujeres con PE. A) Arteria umbilical; B) Vena umbilical y C) Cotiledón. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student. Panel superior: Western blot; panel inferior: densitometría. El valor de $*P < 0.001$ fue estadísticamente significativo. $n=3$.

7.8. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora Dia1 en muestras de placentas con PE

Evidencias recientes sugieren que la proteína Dia1 (diaphanous con homología a formina en humanos) coopera con ROCK1 en la reorganización del citoesqueleto de actina inducida por la proteína RhoA. Se empleó Western blot para determinar la presencia y los niveles de expresión de la proteína Dia1 en las muestras de placentas de embarazos normales y con PE. El anticuerpo anti-Dia1 detectó una banda de 200 kDa. Se observó un aumento significativo en la expresión de Dia1 en las muestras de la arteria umbilical de embarazos con PE ($P=0.032$), mientras que no se observaron diferencias significativas en las muestras de la vena umbilical ($P=0.542$) y el cotiledón ($P=0.185$) de los embarazos con PE comparados con las muestras de las placentas de embarazos normales (Figura 22). Estos datos, junto con el aumento del estado de activación de RhoA en la arteria umbilical de embarazos con PE, nos sugieren que Dia1 al ser activada por RhoA podría estar involucrada en la reorganización de los filamentos de actina en las fibras de estrés contráctiles, participando en la contracción de las células del músculo liso vascular durante la PE.

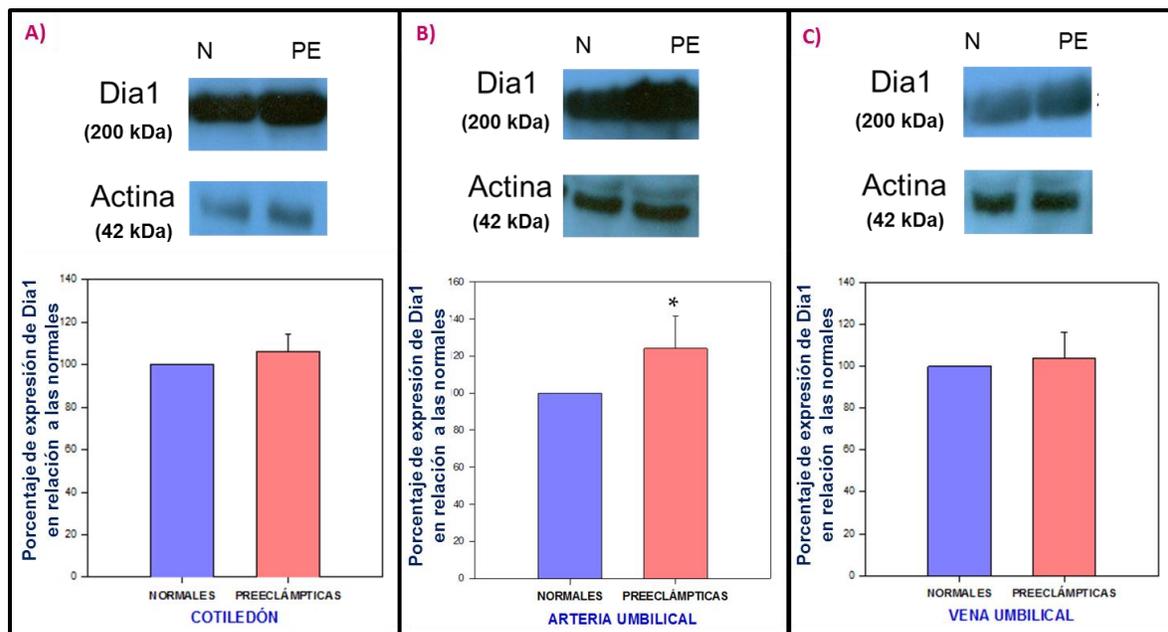


Figura 22. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora Dia1 en las muestras de placentas normales y con PE. A) Cotiledón, $P= 0.185$; B) Arteria umbilical, $*P= 0.032$ y C) Vena umbilical, $P= 0.542$. El

análisis estadístico se realizó mediante la t de Student. Panel superior: Western blot; panel inferior: densitometría. n=4.

7.9. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora PKN en muestras de placentas con PE

La familia PKN de serina/treonina cinasas fue inicialmente descubierta como una familia de potentes efectores de RhoA. Las vías de sensibilización al calcio involucran no solamente a RhoA/ROCK, sino también a la proteína PPP1R14A (anteriormente conocida como CPI-17). La proteína PKN fosforila a PPP1R14A, lo que aumenta su efecto inhibitorio en la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. Se utilizó Wester blot para determinar la presencia y los niveles de expresión de PKN en las muestras de placentas de embarazos normales y con PE. El anticuerpo anti-PKN detectó una banda de 125 kDa. Se observó un aumento significativo en la expresión de PKN en las muestras de la arteria ($P=0.007$) y de la vena umbilical ($P<0.001$) de embarazos con PE, mientras que no se observaron diferencias significativas en las muestras de cotiledón ($P=0.310$) de los embarazos con PE comparados con las muestras de las placentas de embarazos normales (Figura 23). Estos datos, junto con el aumento del estado de activación de RhoA en la arteria y la vena umbilical de embarazos con PE, nos sugieren que PKN podría estar involucrada en la inactivación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, mediante la fosforilación de PPP1R14A, permitiendo que se fosforile la miosina y se genere contracción de las células del músculo liso vascular durante la PE.

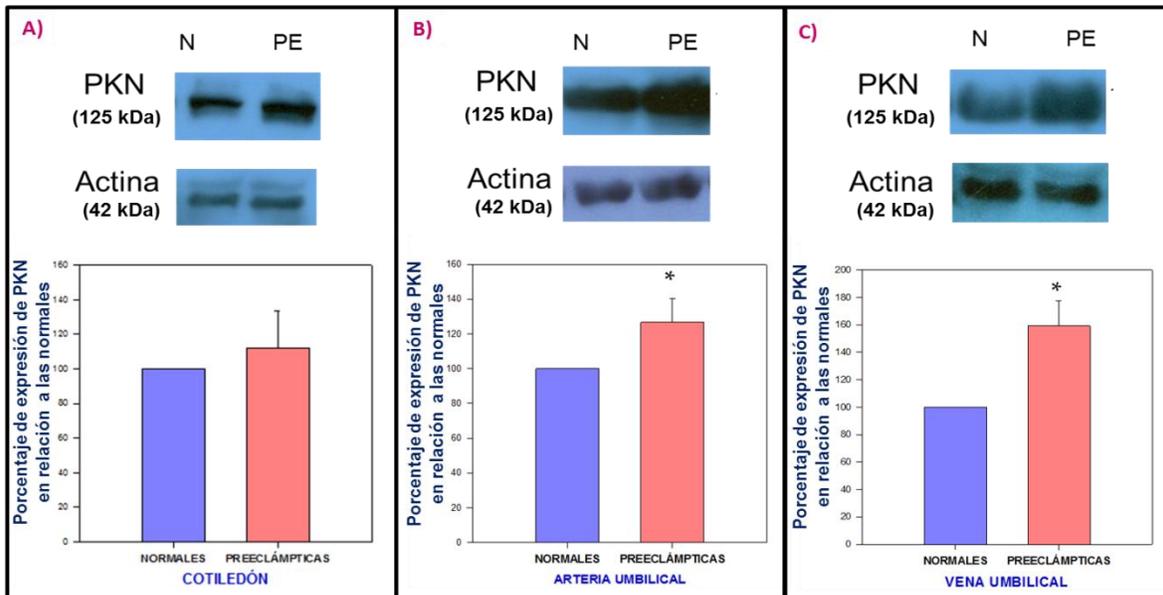


Figura 23. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora PKN en las muestras de placentas normales y con PE. A) Cotiledón, $P= 0.310$; B) Arteria umbilical, $*P= 0.007$ y C) Vena umbilical, $*P= <0.001$. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student. Panel superior: Western blot; panel inferior: densitometría. $n=4$.

7.10. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK2 en muestras de placentas con PE

Se ha sugerido una asociación entre la hipertensión general y la proteína ROCK2, por lo que se la pudiera asociar con la PE. Se empleó Western blot para determinar la presencia y los niveles de expresión de ROCK2 en las muestras de placentas de embarazos normales y con PE. El anticuerpo anti-ROCK2 detectó una banda de 161 kDa. Se observó un aumento significativo en la expresión de ROCK2 en las muestras de cotiledón ($P=<0.001$) y la arteria umbilical ($P=0.010$) de embarazos con PE, mientras que no se observaron diferencias significativas en las muestras de la vena umbilical ($P=0.843$) de los embarazos con PE comparados con las muestras de las placentas de embarazos normales (Figura 24). Estos datos nos sugieren que ROCK2 podría ser uno de los factores que son responsables de la etiología y la patogénesis de la PE, debido a que se la ha involucrado con el desarrollo de la hipertensión general.

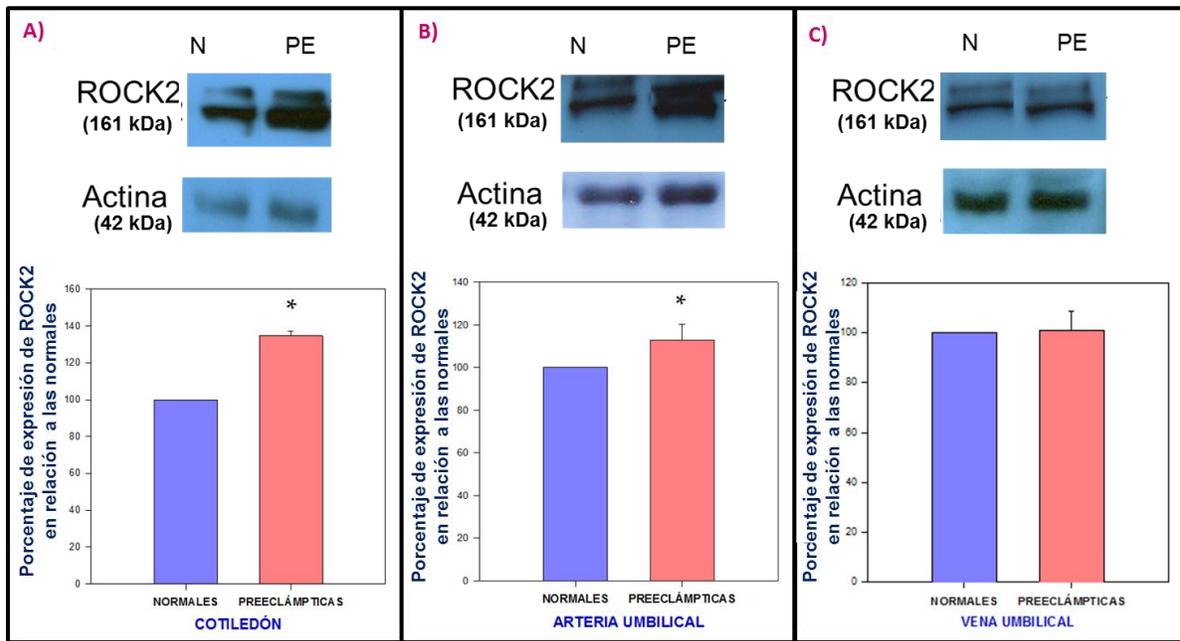


Figura 24. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK2 en las muestras de placentas normales y con PE. A) Cotiledón, * $P < 0.001$; B) Arteria umbilical, * $P = 0.010$ y C) Vena umbilical, $P = 0.843$. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student. Panel superior: Western blot; panel inferior: densitometría. $n = 4$.

7.11. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK1 en muestras de placentas con PE

La proteína RhoA activa se une a su efector ROCK1, el cual fosforila a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina inhibiendo su actividad para generar la contracción vascular. Se empleó Western blot para determinar la presencia y los niveles de expresión de ROCK1 en las muestras de placentas de embarazos normales y con PE. El anticuerpo anti-ROCK1 detectó una banda de 150 kDa. No se observaron diferencias significativas en las muestras de la arteria ($P = 0.857$) y la vena umbilical ($P = 0.813$) de los embarazos con PE comparados con las muestras de las placentas de embarazos normales, mientras que sólo se detectó la banda para ROCK1 en las muestras de cotiledón de los embarazos con PE a diferencia de las normales ($P < 0.001$) (Figura 25). Estos datos nos sugieren que ROCK1 podría estar participando en la vasoconstricción de los vasos sanguíneos del cotiledón en la PE.

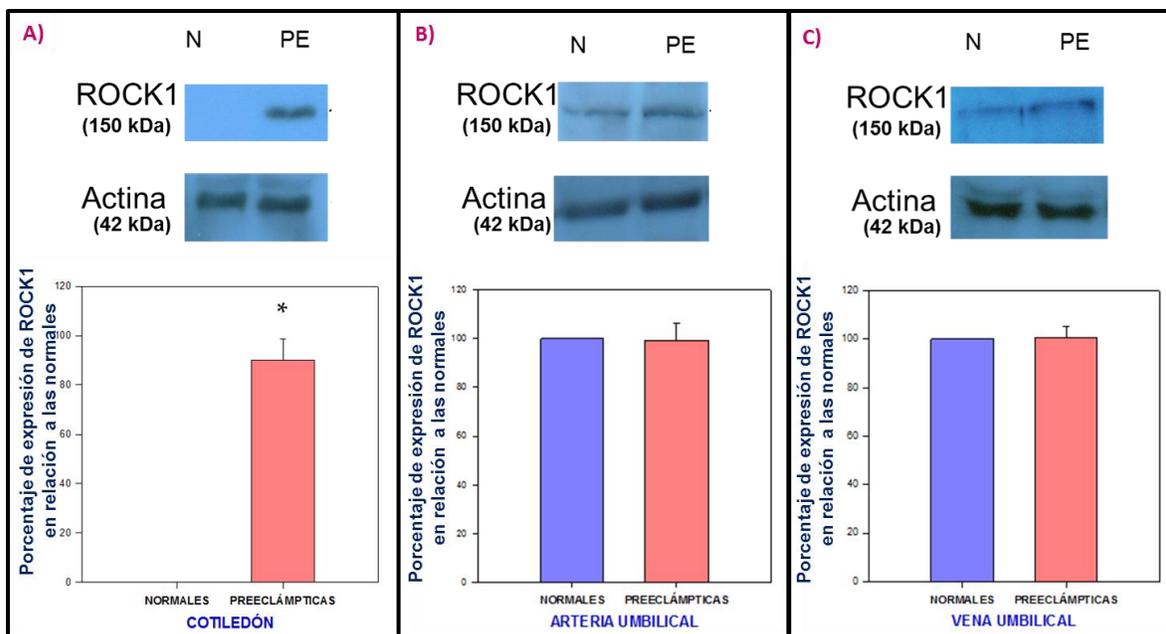


Figura 25. Presencia y niveles de expresión de la molécula efectora ROCK1 en las muestras de placentas normales y con PE. A) Cotiledón, *P= <0.001; B) Arteria umbilical, P= 0.857 y C) Vena umbilical, P= 0.813. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student. Panel superior: Western blot; panel inferior: densitometría.n=4.

8. DISCUSIÓN

La PE es una de las enfermedades hipertensivas inducidas por el embarazo, la cual representa un problema de salud pública mundial. En México, la incidencia de la PE varía entre el 2 y 6% de las mujeres embarazadas (Ceron-Mireles y col., 2001). Esta enfermedad es comúnmente diagnosticada con la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria (Milne y col., 2005). La hipertensión que se presenta en la PE se asocia con un aumento en la resistencia vascular y disminución del flujo útero-placentario (Boura y col., 1994). Lo anterior puede explicar la disminución de la biodisponibilidad de nutrientes en la unidad feto-placentaria, lo que lleva un bajo peso, tanto de la placenta como del recién nacido (Halhali y col., 2004). De acuerdo con nuestros resultados, los embarazos con PE presentaron una disminución significativa en los pesos del recién nacido, así como de los pesos de las placentas, además de lesiones en las arterias y venas de los vasos del cordón umbilical y una reducción en el área del lumen de los vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas en la placenta. Esto sugiere que las alteraciones vasculares pueden ser

consideradas como causas concurrentes y consecuencias de la fisiopatología de la PE y que el proceso patológico interfiere con el crecimiento normal de la placenta, así como la insuficiente sangre que se suministra en la PE. Con estos datos se obtiene evidencia de la gran diferencia entre el grupo de placentas de mujeres con PE con respecto al grupo de mujeres normotensas.

El cordón umbilical es el nexo entre el feto y la placenta, por lo tanto la configuración de los vasos umbilicales puede ser un indicador del estado en que se encuentre el feto. Los autores hipotetizan que en la PE puede cambiar la estructura de los vasos sanguíneos del cordón umbilical (Blanco y col., 2011). En nuestra evaluación histológica de las muestras placentarias con hematoxilina-eosina se observó que en la vena y la arteria umbilical de placentas con PE hay una alteración en la arquitectura del tejido en todas las capas de estos vasos sanguíneos, en comparación de los tejidos normales. Esto pudiera deberse a las grandes presiones a las que se someten durante la PE, perdiéndose de esta manera los medios de unión intercelulares y la arquitectura normal del tejido se ve comprometida por lo que puede cambiar el fenotipo de los vasos del cordón umbilical, ya que la PE se acompaña de alteraciones significativas tanto funcionales como morfológicas de las paredes arteriales del útero y la placenta (Romanowicz y Ban, 2010).

La unidad anatómico-funcional de la placenta son las vellosidades coriónicas de diferentes tamaños contenidas en los cotiledones (Acevedo y col., 2008). Los vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas controlan el volumen de sangre en la placenta que posteriormente nutrirá al feto (Hirano y col., 2002). En la PE se sabe que hay menor suministro de sangre al feto y por lo tanto se sufre de hipoxia placentaria (Osama y col., 2010). En los cortes histológicos de cotiledón se observa principalmente que el lumen de los vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas en la PE es más reducido que en las normales. Con esto se corrobora que la PE se caracteriza por una pobre perfusión de las circulaciones materno y fetal de la placenta, ya que la reducción en el diámetro de estos vasos sanguíneos genera una reducción del flujo sanguíneo que nutre al feto y a la placenta.

La proteína RhoA es el miembro más estudiado de la familia Rho. Juega un papel importante en la transducción de señales y ha sido reportado que regula muchas actividades biológicas que incluyen la formación de fibras de estrés, transcripción génica, adhesiones focales y progresión tumoral (Kjoller y Hall, 1999). Las actividades de las proteínas Rho son reguladas por sus niveles de activación (Rho unida a GTP) (Riento y col., 2005). Los resultados del pull-down demuestran por primera vez que los niveles de RhoA activa aumentan en las muestras de placentas con PE, lo cual sugiere que la proteína RhoA es un importante modulador de la actividad contráctil durante la PE, probablemente regulando la actividad de sus moléculas efectoras involucradas durante este proceso fisiológico.

La etiología de la PE permanece desconocida, sin embargo, se reconoce que el desarrollo de la hipertensión en la PE resulta del daño endotelial generalizado y/o de la falta de equilibrio en la producción y/o acción de agentes vasoactivos, lo que conlleva al incremento en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), que resulta en la vasoconstricción y la disminución de la perfusión sanguínea en los órganos, tales como la unidad feto-placentaria (Redman y Sangent, 2005). La proteína RhoA activa la molécula efectora ROCK, la cual fosforila e inactiva la fosfatasa de la cadena ligera de miosina y subsecuentemente aumenta la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC). El nivel de la MLC fosforilada influye directamente sobre la función contráctil de las células del músculo liso (SMCs) y controla la polimerización de los microfilamentos de actina en las SMCs (Sun y Chen, 2004).

La formación de espacios entre las células endoteliales durante la inflamación, conduce a la salida de fluidos y macromoléculas y puede causar edema. La trombina induce una alteración de la función de la barrera endotelial (Moy y col., 1996). Esto está asociado con una reorientación del citoesqueleto de F-actina, una prolongada fosforilación de la MLC y la formación de espacios intercelulares (Amerongen y col., 1998). La fosforilación de la MLC juega un papel importante en la iniciación de la interacción actina-miosina y en el desarrollo de la disfunción de la barrera endotelial. RhoA contribuye a la fosforilación de la MLC por medio de ROCK1 (Gong y col., 1996). Se ha demostrado que la trombina

induce una activación rápida y constante de RhoA en las células endoteliales de las venas umbilicales en humano (Geerten y col., 2000). Además de la disfunción endotelial, RhoA y ROCK1 contribuyen en la regulación de la expresión génica de la sintasa del óxido nítrico (eNOS) y la inhibición de la fosforilación de la eNOS y por lo tanto en la producción del óxido nítrico (NO) celular (Ming y col., 2002). En nuestro estudio, se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína RhoA activa en la vena y en la arteria umbilical en la PE a comparación de las normales, así como de la molécula ROCK1 en el cotiledón. Esto nos lleva a suponer que el aumento de trombina que se da durante la PE, así como la reducción de los niveles del NO pueden estar involucrados en el incremento de la actividad de RhoA y de ROCK1 en el tejido placentario llevando a la disfunción de la barrera endotelial de los vasos sanguíneos del cordón umbilical y del cotiledón. Por otro lado, también se observó una inmunotinción de RhoA predominantemente en el endotelio de los vasos sanguíneos del cordón umbilical con PE, esto nos lleva a suponer la acción de RhoA en la disfunción endotelial.

La proteína RhoA ha sido implicada en muchos aspectos de la biología vascular, influenciando la biología de las células endoteliales, células de músculo liso vascular, leucocitos y plaquetas, además de regular diversos procesos como el tono vascular e hipertensión, inflamación y trombosis. RhoA al estar abundantemente expresada en el músculo liso vascular aumenta la contracción independientemente del calcio intracelular (Hirata y col., 1992). Se ha reportado que diversos factores activan a la proteína RhoA en las células vasculares, incluyendo la trombina (Seasholtz y col., 1999), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kishi y col., 2000), la angiotensina II (Funacoshi y col., 2001) y la endotelina 1 (Yamamoto y col., 2000). Por otro lado también las proteínas Rho se requieren para la expresión génica de la pre-pro-endotelina-1 (Hernández y col., 2000) y por lo tanto regulan el tono vascular y la respuesta proliferativa a la endotelina-1. Debido a que la PE es un trastorno en el cual hay un incremento en los factores vasoconstrictores del músculo liso, podemos suponer que en la PE hay un aumento en la activación de RhoA por el papel de los agonistas en dicha enfermedad.

La patogénesis compleja y multifactorial de la hipertensión pulmonar involucra la constricción, remodelación y trombosis *in situ* de los vasos sanguíneos. Tanto la serotonina (5-HT) y la señalización de RhoA puede contribuir a estas alteraciones. Guilluy y col.(2009) demostraron que la 5-HT se internaliza en las SMCs vasculares a través del transportador de 5-HT (5-HTT), el cual es covalentemente ligado a RhoA por la transglutaminasa tipo 2 intracelular (TG2), conduciendo a una activación constitutiva de RhoA. Puesto que las plaquetas son la principal fuente de serotonina circulante, el aumento de la agregación plaquetaria en la PE origina un aumento de las concentraciones de serotonina (Bolte y col., 2001). En base a nuestros resultados y a que en la PE hay un aumento en la serotonina podemos suponer que esto también contribuye al aumento del nivel de activación de RhoA en las muestras de placentas con PE.

Es bien conocido que la PE es un síndrome clínico caracterizado por espasmos del músculo liso vascular y aumento en la presión sanguínea. Aunque la patogénesis de la PE es diferente a la hipertensión, los cambios patológicos son los mismos. La activación anormal de RhoA puede ocasionar una alteración de la función vasomotora (Master y col., 2004). Estos datos, en conjunto con los nuestros, nos sugieren que RhoA juega un papel importante en la patogénesis de la PE debido a su influencia en la función vasomotora del músculo liso vascular, resultando en un espasmo del músculo liso vascular.

En la PE hay una inadecuada oxigenación en la placenta, lo cual genera hipoxia. Los cambios en el contenido de oxígeno placentario puede estar correlacionado con la patogénesis de la PE. El HIF-1 α (factor inducible por hipoxia 1 α) medía la regulación de genes bajo hipoxia, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), endotelina 1, leptina, factor de necrosis tumoral α e interleucina-1. La expresión anormal de estos factores puede estar correlacionado con el desarrollo de la PE. Los mecanismos no están claros de cómo las células convierten la señal de hipoxia a un aumento de la actividad de HIF-1 α . Hayashi y col. (2005) descubrieron que en condiciones de bajo oxígeno inducen un aumento en la activación de RhoA,teniendo un papel importante en la regulación de la expresión de HIF-1 α . Muchos estudios muestran que la expresión de HIF-1 α aumenta en las placentas con PE. Este estudio descubre que los niveles de RhoA activo en las muestras

con PE fue significativamente mayor a los embarazos normales. Con estos resultados asumimos que RhoA puede participar en la patogénesis de la PE por la regulación de la expresión de HIF-1 α .

Las moléculas efectoras Dia y PKN1 están significativamente expresadas en la vena y la arteria umbilical. Dia es un miembro rico en prolina, la cual se une a la proteína profilina de unión a G-actina, que causa un aumento en la polimerización de actina (Lammers y col., 2005). Esta proteína es principalmente regulada por autoinhibición y es activada por la proteína RhoA activa. Ha sido implicada en una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la regulación de las funciones ováricas (Bione y col., 1998). Dia activada por RhoA puede organizar los filamentos de actina inducidos por ROCK en fibras de estrés contráctiles (Watanabe y col., 1999). Por lo tanto, la elevada expresión de Dia en el tejido placentario, sugiere la potenciación de la actividad de RhoA a través de la cooperación Dia-ROCK.

La activación de PKN1 por RhoA puede resultar de la regulación de una serie de eventos celulares que abarcan la adhesión celular con E-cadherina en los queratinocitos, transporte de glucosa estimulada por insulina y la regulación de la meiosis en los oocitos de estrellas de mar. Por otro lado también PKN1 puede inactivar la fosfatasa de la cadena ligera de miosina por medio de la proteína PPP1R14A (proteína fosfatasa 1 reguladora de la subunidad 14A) (Hamaguchi y col., 2000) y se ha sugerido que el nivel potencial de fosforilación de PKN1 en PPP1R14A es similar al de ROCK (Koyama y col., 2000). Por lo tanto, la expresión significativa de PKN1 en las muestras de placentas con PE indican fuertemente que la vía RhoA/PKN1 puede cooperar con RhoA/ROCK para regular el equilibrio MLC/MLC-P en la placenta de mujeres con PE. Debido a esto se cree que la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina es influenciada por dos vías: la inhibición de la subunidad PPP1R12A por RhoA/ROCK y la fosforilación de PPP1R14A regulada por PKN1.

En resumen, la proteína RhoA puede participar regulando varios procesos durante la PE, tales como en la regulación de la invasión trofoblástica, reacción hipóxica y función

vasomotora. No se evaluó si el aumento en la actividad de RhoA es una causa o consecuencia de la PE. Sin embargo, investigaciones futuras de la vía de señalización de RhoA se necesitan, para elucidar la patogénesis de la PE y establecer una nueva estrategia terapéutica.

Los datos proporcionan evidencias de la presencia de las moléculas efectoras de RhoA, Dia y PKN1 en placentas de mujeres con PE. Nuestros resultados también demuestran que los niveles de las moléculas efectoras Dia, PKN1 y ROCK aumentan en las muestras de placentas con PE y parecen estar involucradas en la regulación de las interacciones actina-miosina durante la vasoconstricción en la hipertensión observada en la PE. Además se observó un aumento en el estado de activación de la proteína RhoA en la PE.

El aumento de la activación de RhoA junto con la elevada expresión de Dia, PKN1 y ROCK en la placenta con PE pudiera ser un mecanismo patológico durante la PE. Investigaciones futuras necesitan determinar si RhoA forma complejos con ROCK, PKN1 y Dia, así como investigar los papeles de otras GTPasas relacionadas a Rho y sus moléculas efectoras durante la PE.

9. CONCLUSIONES

- El aumento en el estado de activación de RhoA en la arteria y la vena umbilical sugiere que la proteína RhoA podría estar participando en los procesos patológicos que generan la contracción vascular en los vasos sanguíneos durante la hipertensión asociada a la preeclampsia.
- Además de las moléculas efectoras Dia1, PKN y ROCK2, la molécula efectora ROCK1 probablemente tiene un papel importante en la etiología de la preeclampsia.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar la interacción de la proteína RhoA con sus moléculas efectoras en cotiledón, vena y arteria umbilical en embarazos con PE.
- Determinar la actividad de las moléculas efectoras ROCK2, Dia1, PKN y ROCK1 en cotiledón, vena y arteria umbilical en embarazos con PE.

11. LITERATURA CITADA:

Acevedo G, Espino Y, Gallardo G, Velásquez T, Camargo M, Guzmán H. 2008. La placenta humana: Revisión. *Perinatol Reprod Hum.* **22**, 230-245.

Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, Hinsbergh VWM. 1998. Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA. *Circ Res.* **83**, 1115–1123.

Ark M, Yılmaz N, Yazıcı G, Kubat H, Aktas S. 2005. Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta.* **26**, 81-84.

Bar J, Kaplan B, Wittenberg C, Erman A, Boner G, Ben-Rafael Z, Hod M. 1999. Microalbuminuria after pregnancy complicated by pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant.* **14**, 1129–1132.

Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. 2004. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: newer insights. *Semin Nephrol.* **24**, 548-556.

Bione S, Sala C, Manzini C, Arrigo G, Zuffardi O, Banfi S, Borsani G, Jonveaux P, Philippe C, Zuccotti M, Ballabio A, Toniolo D. 1998. A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet.* **62**, 533–541.

Bishop A, Hall A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* **348**, 241-255.

Blanco M, Vega H, Giuliano R, Grana D, Azzato F, Lerman J, Milei J. 2011. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. *J Clin Hyperten.* **13**, 30-34.

Blumenstein L., Ahmadian M. 2004. Models of the cooperative mechanism for rho effector recognition. *J Biol Chem.* **279**, 53419-53426.

Bolte A, Geijn H, Dekker G. 2001. Fisiopatología de la preeclampsia y papel de la serotonina. *J Obstet Gynecol Reproduc Biol.* **1**, 322-332.

Boura AL, Walters WA, Read MA, Leitch IM. 1994. Autacoids and control of humanplacental blood flow. *Clin Exp Pharmacol Phisyol.* **21**, 737-748.

Campos-Arroyo. 2009. Proteínas G monoméricas Rho y Rac y el estrés oxidativo y nitrosativo en placentas humanas en la preeclampsia. UMSNH. Instituto de investigaciones químico biológicas.

Ceron-Mireles P, Harlow SD, Sanchez-Carrillo CI, Núñez RM. 2001. Risk factors for pre-eclampsia/eclampsia among working women in México city. *Paediatr Perinat Epidemiol.* **15**, 40-46.

Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. 2004. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med.* **9**, 357–369.

Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. 2004. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.***5**, 355-366.

Cross J. 2006. Placental function in development and disease. *Reprod Fert Develop.* **18**, 71-76.

Cui X-L, Brockman, Campos B, Myatt L. 2006. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: Involvement in Preeclampsia. *Placenta.* **27**, 422-431.

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

Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B. 2000. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol.***156**, 2185-2199.

Ellenbroek SIJ, Collard JG. 2007. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis.* **24**, 657-672.

Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H. 2001. Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.***38**, 100-104.

Geerten P, Amerongen N, Sanne D, Vermeer M, Collard J, Hinsbergh V. 2000. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res.* **87**, 335-340.

Genbacev O, DiFederico E, McMaster M, Fisher SJ. 1999. Invasive cytotrophoblast apoptosis in preeclampsia. *Hum Reprod.* **14**, 59-66.

Gong MC, Iizuka K, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, Sugai M, Kobayashi S, Somlyo AV, Somlyo AP. 1996. Role of guanine nucleotide-binding proteins—ras-family or trimeric proteins or both—in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci.***93**, 1340-1345.

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

Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, Guignabert C, Izikki M, Tu L, Savale L, Humbert M, Fadel E, Adnot S, Loirand G, Pacaud P. 2009. RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension. *Am J Resp Crit Care Med.* **179**, 1151-1158.

Halhali A, Wimalawansa SJ, Berentsen B, Avila E, Thota CS, Larrea F. 2001. Calcitonin gene- and parathyroid hormone-related peptides in preeclampsia: effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol.* **97**, 893-897.

Hamaguchi T, Ito M, Feng J, Seko T, Koyama M, Machida H, Takase K, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. 2000. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochem Biophys Res Commun.***274**, 825-830.

- Hayashi M, Sakata M, Takeda T. 2005. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression through RhoA activation in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.***90**, 1712-1719.
- Heasman S, Anne J. 2008. Ridley. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.***9**, 690-701.
- Hernández O, Perez D, Soria E, Lamas S. 2000. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res.* **87**, 616–622.
- Hirano H, Imai Y, Ito H. 2002. Spiral Artery of Placenta: Development and pathology - immunohistochemical, microscopical, and electron-microscopic study. *J Med Sci.* **48**, 13-23.
- Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T. 1992. Involvement of Rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem.* **267**, 8719–8722.
- Huppertz B. 2008. Placental origins of preeclampsia. Challenging the current hypothesis. *Hypertension.***51**: 970-975.
- Ihara K, Muraguchi S, Kato M, Shimizu T, Shirakawa M, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T. 1998. Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem.* **273**, 9656-9666.
- Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol.* **3**, 8–14.
- Jaffe AB, Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **21**, 247-269.
- Jalila J, Lavandero S, Chiong M, Ocaranza M. 2005. La vía de señalización Rho/Rho-cinasa en la enfermedad y el remodelado cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* **58**, 951-961.
- Jin L, Ying Z, Webb RC. 2004. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **287**, 1495–1500.
- Karumanchi S, Maynard S, Stillman I, Epstein F, Sukhatme V. 2005. Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int.* **67**: 2101-2113.
- Kaziro T, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. 1991. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem.***60**, 349-400.
- Kishi H, Bao J, Kohama K. 2000. Inhibitory effects of ML-9, wortmannin, and Y-27632 on the chemotaxis of vascular smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor-BB. *J Biochem (Tokyo).***128**, 719–722.
- Kjoller L, Hall A. 1999. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res.***253**, 166-179.

- Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ, Nakano T. 2000. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS*. **475**, 197–200.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259): 680-685.
- Lammers M, Rose R, Scrima A, Wittinghofer A. 2005. The regulation of mDia by autoinhibition and its release by Rho GTP. *EMBO J*. **24**, 4176–4187.
- Larsson E, Zhou X, Akyürek L. 2007. RhoA-dependent vascular smooth muscle cell-specific transcription: adding diaphanous formins to the puzzle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **27**, 448-449.
- Lartey J, López Bernal A. 2009. RHO protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction*. **138**, 407–424.
- Lartey J, Gampel A, Mellor H, Bernal AL. 2006. Expression of RND Proteins in Human Myometrium. *Biol Reprod*. **75**, 452-461.
- Lartey J, Smith M, Pawade J, Strachan B, Mellor H, López Bernal A. 2007. Up-regulation of myometrial RHO effector proteins (PKN1 and DIAPH1) and CPI-17(PPP1R14A) phosphorylation in human pregnancy is associated with increased GTP RHOA in spontaneous preterm labor. *Biol Reprod*. **76**, 971–982.
- Laumanns I. 2009. The noncanonical WNT pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **40**, 683–691.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*. **355**, 992–1005.
- Lykke JA, Langhoff-Roos J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. 2009. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension*. **53**, 944–951.
- Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. **420**, 629-635.
- Master MT, Zhou Y y Fisher SJ. 2004. Abnormal placentation and the syndrome preeclampsia. *Semin Nephrol*. **24**, 540–547.
- Maynard S, Epstein F, Karumanchi SA. 2008. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med*. **59**, 61–78.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. **111**, 649-658.

Menna P, Cardama G, Comin M, Alonso D, Gomez D. 2010. Rho Gtpasas Como Blancos Terapéuticos Relevantes en Cáncer y otras Enfermedades Humanas. *Medicina*.**70**, 555-564.

Milne F, Redman C, Walker J. 2005. The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ*.**330**, 576–580.

Ming XF, Viswambharan H, Barandier C. 2002. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol*. **22**, 8467–8477.

Mishra N, Nugent W, Mahavadi S, Walsh S. 2011. Mechanisms of enhanced vascular reactivity in preeclampsia. *Hypertension*. **58**, 867-873.

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

Moriki N, Ito M, Seko T, Kureishi Y, Okamoto R, Nakakuki T, Kongo M, Isaka N, Kaibuchi K, Nakano T. 2004. RhoA activation in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. **27**, 263-270.

Moy AB, Engelenhoven J, Bodmer J, Kamath J, Keese C, Giaever I, Shasby S, Shasby DM. 1996. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest*. **97**, 1020–1027.

Mutter Walter P, Karumanchi S Ananth. 2008. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc res*. **75**: 1-8.

Myatt. 2002. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*.**19**, 103–111.

Ossama M, Khalil A. 2010. Molecular and vascular targets in the pathogenesis and management of the hypertension associated with preeclampsia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. **8**, 204–226.

Pacora P, Oyarzun E, Belmar C, Huiza L, Santivañez A, Romero R. 2004. La toxemia del embarazo (preeclampsia-eclampsia) es un síndrome materno-fetal multifactorial. *Rev Per Ginecol Obstet*. **50**, 223-231.

Pacora P. 2006. El origen de la preeclampsia y la eclampsia: la placentación. *Rev Per Ginecol Obstet*. **52**:4, 202-212.

Pollheimer J, Knofler M. 2005. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*.**26**, Supplement A.

Redman CW, Sargent IL. 2005. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, **308**, 1592–1594.

- Riento K, Totty N, Villalonga P, Garg R, Guasch R, Ridley AJ. 2005. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J.***24**, 1170–1180.
- Roberts JM, Gammill HS. 2005. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension.* **46**, 1243-1249.
- Rodríguez G, Couve P, Egaña U, Chamy P. 2011. Apoptosis placentaria: mecanismos moleculares en la génesis de la preeclampsia. *Rev Chil Obstet Ginecol.***76**, 431–438.
- Rodríguez G, Egaña U, Márquez A, Bachmann M, Soto A. 2012. Preeclampsia: mediadores moleculares del daño placentario. *Rev Chil Obstet Ginecol.* **77**, 72–78.
- Rolfe B, Worth N, World C, Campbell J, Campbell G. 2005. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis.***183**, 1–16.
- Romanowicz L, Ban´kowski E. 2010. Sphingolipids of human umbilical cord vein and their alteration in preeclampsia. *Mol Cell Biochem.***340**, 81–89.
- Saftlas AE, Olson DR, Frank AL, Atrash HK, Pokras R. 1990. Epidemiology in preeclampsia and eclampsia in the United States. *Am J Obstet Gynecol.* **163**, 460–465.
- Sagi D, Hall A. 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell.***103**, 227-238.
- Sahai E, Marshall CJ. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.***2**, 133-142.
- Sadler T.W. 2009. Langman embriología médica. Lippincott Williams & Wilkins. Onceava edición.
- Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. 1999. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res.* **84**, 1186–1193.
- Shigetatsu S, Mitsutoshi I, Akimoto Y, Nagamatsu S, Sakai K, Hideki H, Maryam K, Nakamura Y, Uehata M, Yoshimura Y. 2002. Small guanosine triphosphatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration. *J Clin Endocrinol Metab.* **87**, 5808–5816.
- Sorokina E, Chernoff J. 2005. Rho-GTPases: new members, new pathways. *J Cell Biochem.***94**, 225–231.
- Stennett A, Khalil R. 2006. Neurovascular mechanisms of hypertension in pregnancy. *Curr Neurovasc Res.* **3**, 131–148.
- Stillman IE, Karumanchi SA. 2007. The glomerular injury of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* **18**, 2281–2284.
- Sun H, Chen RH. 2004. Rho-Rock mediated pathway signal transduction and pathophysiology. *Foreign Med Sci.* **31**, 162-164.
- Suzuki S, Gejyo F, Ogino S, Maruyama Y, Ueno M, Nishi S, Kimura H, Arakawa M. 1997. Postpartum renal lesions in women with pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant.***12**, 2488–2493.

- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Ohira S, Konishi I. 2004. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch.* **444**, 49–55.
- Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Hirose M, Nonomura K, Oshima K, Oshima M, Taketo M, Narumiya S. 2003. Targeted disruption of the mouse Rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Biol.* **23**, 5043–5055.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* **76**, 4350-4354.
- Wareing M, O'Hara M, Seghier F, Baker PN, Taggart MJ. 2005. The involvement of Rho-associated kinases in agonist-dependent contractions of human maternal and placental arteries at term gestation. *Am J Obstet Gynecol.* **193**, 815–824.
- Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S. 1996. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science.* **271**, 645–648.
- Watanabe N KT, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* **1**, 136–143.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* **118**, 843-846.
- Winter-Vann AM, Casey PJ. 2005. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* **5**, 405–412.
- Yamamoto Y, Ikegaki I, Sasaki Y, Uchida T. 2000. The protein kinase inhibitor fasudil protects against ischemic myocardial injury induced by endothelin-1 in the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* **35**, 203–211.
- Yung HW, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, Burton GJ. 2008. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am J Pathol.* **173**, 451–462.
- Zhao L, Xu G, Zhou J, Xing H, Wang S, Wu M, Ping L, Ding M. 2006. The effect of RhoA on human umbilical vein endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Oncol Rep.* **15**, 1147-1152.