

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**“FACULTAD DE MEDICINA”**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SECRETARIA DE SALUD DEL ESTADO DE GUERRERO**  
**HOSPITAL GENERAL DE ACAPULCO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA Y  
OBSTETRICIA**

**“EFECTO DEL PLASMA DE MUJERES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA SOBRE  
CULTIVOS DE CELULAS ENDOTELIALES. EN BUSQUEDA DE UN FACTOR SERICO  
INDUCTOR DE DAÑO ENDOTELIAL COMO MARCADOR TEMPRANO DE  
PREECLAMPSIA.”**

**PRESENTA:**

**DR. IVÁN ARTURO MORENO SANDOVAL**

**ASESOR DE TESIS:**

**DR. MARIANO MANZANAREZ CHAVEZ**

**ACAPULCO GUERRERO, 24 DE JUNIO DE 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACTULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**SECRETARIA DE SALUD DEL ESTADO DE GUERRERO  
HOSPITAL GENERAL ACAPULCO**

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA  
DE LA ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

**“EFECTO DEL PLASMA DE MUJERES EMBARAZADAS CON PREECLAMPSIA SOBRE  
CULTIVOS DE CELULAS ENDOTELIALES. EN BUSQUEDA DE UN FACTOR SERICO  
INDUCTOR DE DAÑO ENDOTELIAL COMO MARCADOR TEMPRANO DE  
PREECLAMPSIA.”**

**PRESENTA: DR IVÁN ARTURO MORENO SANDOVAL**

**ASESOR CONCEPTUAL : DR. MARIANO MANZANAREZ CHAVEZ**

**ASESOR METODOLOGICO: DRA. MARA IVETH BAZAN GUTIERREZ**

**ACAPULCO, GUERRERO. 24 DE JUNIO DEL 2013**

“ ”

---

**DR. LÁZARO MAZON ALONSO**

SECRETARIO DE SALUD DEL ESTADO DE GUERRERO.

---

**DR. JUAN ANTONIO GUEVARA NIEBLAS**

SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN DE LA SECRETARIA DE SALUD.

---

**DR. RICARDO GARIN ALVARADO**

DIRECTOR DEL HOSPITAL GENERAL ACAPULCO

---

**DRA. MARA IVETH BAZAN GUTIERREZ**

JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION HOSPITAL GENERAL ACAPULCO

---

**DR. MANUEL SAENZ CABRERA**

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIDAD EN GINECOLOGIA Y  
OBSTETRICIA  
HOSPITAL GENERAL ACAPULCO

---

**DRA. SILVIA ORTEGAS BARRIOS**

ASESOR DE TESIS CONCEPTUAL

---

**DRA. MARA IVETH BAZAN GUTIERREZ**

ASESOR DE TESIS METODOLÓGICO

## INDICE

1. INTRODUCCION.....	6
2. ANTECEDENTES.....	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
4. JUSTIFICACIÓN.....	8
5. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	9
6. METODOLOGÍA.....	10
• Tipo y diseño general del estudio.....	10
• Universo de estudio.....	10
• Procedimientos para la recolección de información.....	11
• Recursos .....	11
• Definiciones Operacionales .....	11
7. PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	13
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	25
9. RESULTADOS .....	26
10. DISCUSIÓN.....	32
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
12. CRONOGRAMA.....	35

## INTRODUCCION

Los desórdenes hipertensivos durante la gravidez, como la hipertensión gestacional, la preeclampsia/eclampsia, la hipertensión arterial crónica representan patologías con una alta incidencia y son causa de una importante morbimortalidad materno-infantil. La preeclampsia se define como la aparición de hipertensión *de novo* en la segunda mitad del embarazo (presión sistólica de más de 140 mm de Hg o presión diastólica de más de 90 mm de Hg), acompañada de proteinuria (>300 mg/24 hrs.) y severa cuando se asocia a daño a órgano blanco. La eclampsia ocurre cuando se agregan crisis convulsivas, que se presentan comúnmente en la última fase del embarazo, durante el parto o incluso 48 horas después del mismo. En general la hipertensión gestacional y la preeclampsia/eclampsia tienden a desaparecer después del parto y la paciente normaliza sus cifras tensionales dentro de las siguientes 12 semanas, por lo que si esto no ocurre puede sospecharse de una hipertensión crónica desconocida por la paciente, o debutar con posterior al estado hipertensivo gestacional. Los desórdenes hipertensivos en la gestación, alcanzan una frecuencia de hasta el 8% de todos los embarazos, se calcula que cerca del 15% de todos los nacimientos prematuros están relacionados con la preeclampsia, la prematurez a su vez está relacionada con una mayor morbimortalidad perinatal.

Se han desarrollado varias hipótesis con respecto al origen del síndrome preeclámtico, entre otras están: anomalías en la adaptación de la circulación materna durante el embarazo, disfunción endotelial materna secundaria a citocinas, sistemas eutacoides alterados deficiencias de vitaminas y minerales, agentes infecciosos similares a aquellos asociados a aterosclerosis, defecto en las barreras normales que impiden el paso de moléculas provenientes del feto o el trofoblasto a la circulación materna. Una teoría que intenta compaginar varias de éstas hipótesis postula que una implantación anormal del blastocisto y la mala perfusión placentaria, podrían inducir fenómenos inflamatorios por una desregulación de la respuesta inmune en el embarazo, esto podría originar diferentes procesos de autoinmunidad y rechazo al producto que condujeran a una lesión ó activación del endotelio. A favor de esta hipótesis existen trabajos en los que se ha demostrado que un gran número de moléculas relacionadas con la activación o el daño endotelial se encuentran incrementadas en la circulación de mujeres con preeclampsia desde semanas hasta meses antes de la aparición del cuadro hipertensivo, lo que hace pensar que el inicio de la hipertensión arterial sea resultado de la activación/lesión endotelial y no que la lesión sea consecuencia de la hipertensión.

Recientemente se ha demostrado que algunos factores como el factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF) y el factor soluble semejante a tirosin cinasa-1 (sFlt-1) también conocido como receptor del factor de crecimiento vascular endotelial soluble 1 (sVEGFR-1) muestran valores alterados en el plasma de mujeres embarazadas que posteriormente desarrollarán preeclampsia, así, el PIGF se observa disminuido mientras que el sFlt-1 se encuentra elevado. En un modelo en ratas se ha visto que el sFlt-1 actúa en conjunto con la endoglina (CD105) soluble produciendo en el animal experimental un síndrome semejante a la preeclampsia en las ratas embarazadas. Datos recientes obtenidos de mujeres embarazadas que desarrollan preeclampsia hacen pensar que la endoglina juega un papel importante en

la fisiopatogenia de la enfermedad y podría representar un marcador temprano de la misma. Sin embargo dado que una fuente importante de la endoglina soluble es la disfunción o el daño endotelial, persiste la incógnita de si otros factores son los responsables del daño/disfunción endotelial y la elevación de endoglina soluble es más bien una respuesta a otro factor, por ejemplo recientemente se ha reportado que la hipoxia incrementa los niveles de sFlt-1 (sVEGFR-1) pero no los de endoglina soluble proveniente del trofoblasto, esto hace pensar que los niveles elevados de endoglina observados en etapas previas al desarrollo de la hipertensión no son debidos a endoglina liberada por la placenta. Sin embargo no se ha descartado la posibilidad de que la endoglina soluble pudiera provenir de la propia vasculatura de la madre o el producto, y que ésta fuera liberada por la acción citotóxica de otros componentes liberados a la circulación materna, independientemente de si el origen de estos factores fuera placentario o materno. Por otra parte, en otros modelos se ha visto que la hipoxia si es capaz de inducir la liberación de endoglina soluble a partir del endotelio vascular y que la sobreexpresión de la endoglina por parte de las células endoteliales pudiera estar relacionada con un efecto protector anti apoptótico, esto es, ante la agresión de otros factores como el factor inducible por hipoxia 1alfa (hif-1), la célula endotelial respondería sintetizando mas endoglina en un intento por mantener la homeostasis del endotelio materno, sin embargo esta endoglina al ejercer su acción en el tejido placentario podría inducir defectos en su funcionamiento.

Se ha estudiado el efecto del suero o el plasma de las pacientes con preeclampsia severa sobre células endoteliales *in vitro* y se ha demostrado que contribuye a incrementar la permeabilidad del endotelio, la biosíntesis de glicosaminoglicanos, y alterar la distribución de la caderina 5 intracelular. Dada la alta frecuencia con la que se presenta la preeclampsia en el embarazo y sus efectos sobre la madre y el producto, resulta de una alta prioridad el poder identificar a las mujeres que se encuentran predisuestas o bien detectar tempranamente el inicio de esta patología. Se han realizado múltiples esfuerzos para determinar genes que confieran susceptibilidad (angiotensinógeno, Factor V, Metiltetrahidrofolato reductasa, y otros genes involucrados en el control de la presión sanguínea, del volumen vascular, trombofilia, metabolismo de lípidos, stress oxidativo, disfunción endotelial etc.) sin que hasta el momento se hayan demostrado resultados concluyentes. La preeclampsia también está caracterizada por una activación de la cascada de la coagulación, aunque las alteraciones son sutiles y únicamente en el 10% de las pacientes preeclámplicas las pruebas estándar se ven alteradas, el tamaño de las plaquetas es mayor en las pacientes preeclámplicas indicando una incremento en el recambio plaquetario.

## **ANTECEDENTES.**

Datos preliminares obtenidos en el actual estudio demuestran que el plasma pero no el suero de pacientes con preeclampsia severa induce lesión en cultivos de células endoteliales de venas de cordón umbilical humanas (HUVECs) esta diferencia podría estar relacionada con la activación plaquetaria comentada en el párrafo anterior. El grado de lesión es diferente si los cultivos de HUVECs provienen

de cordones de mujeres con preeclampsia comparados con aquellos que provienen de embarazos normales. Las HUVECs procedentes de mujeres con preeclampsia son más resistentes a los efectos citotóxicos del plasma y producen una menor cantidad de endotelina-1 (una molécula altamente vasopresora) en comparación con las células procedentes de embarazos normales, dando la apariencia de que las HUVECs provenientes de productos de mujeres con preeclampsia han echado a andar mecanismos de compensación para volverse más resistentes a los factores presentes en el plasma. Una observación interesante es que el plasma de las pacientes preeclámpticas pierde su actividad de inducir daño endotelial al congelar y descongelar las muestras a menos que sea preservada mediante la adición de una mezcla de inhibidores de proteasas, el o los factores responsables de la inducción del daño son termolábiles pues se inactivan si se incuban a 56°C durante 30 min. Los controles de plasma proveniente de mujeres con embarazos normales o no embarazadas así como los provenientes de personas del sexo masculino no hipertensos no tuvieron ningún efecto sobre los cultivos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Se ha observado un aumento en la incidencia de la preeclampsia de un 40%, por ende incrementando la necesidad de desarrollar mejores técnicas diagnósticas y a menor edad gestacional, de ésta manera prever los probables problemas a los que se tendrán que enfrentar y desarrollar mejores estrategias para asegurar el bienestar tanto de la madre como del feto. Por lo tanto el desarrollo de indicadores bioquímicos ayudará a realizar un diagnóstico certero y precoz, así como la clasificación de las pacientes con preeclampsia en diversas categorías de acuerdo a la severidad de sus síntomas y así mejorar su tratamiento médico. **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

## **JUSTIFICACIÓN**

A pesar de los esfuerzos por tratar de comprender la etiopatogenia de la preeclampsia, se ha dicho que la preeclampsia es “la enfermedad de las teorías ninguna de las cuales ha resistido la prueba del tiempo”<sup>28</sup> hasta el momento solo se cuenta con datos que demuestran el incremento de varios factores relacionados con el daño o activación endotelial en la circulación de las pacientes preeclámpticas, pero éstos parecen ser más bien el efecto que la causa de la lesión/activación del endotelio. Los pocos trabajos que han intentado demostrar la presencia de factores citotóxicos en el suero o plasma de pacientes con preeclampsia reportan datos controvertidos<sup>29,30</sup>.

Hasta donde sabemos no se han podido caracterizar adecuadamente él o los factores que pudieran ser responsables de la lesión/activación endotelial que precede a la aparición de la hipertensión en la preeclampsia, como se pretende realizar en el presente proyecto, sino mas bien se ha visto el efecto de los mismos medidos por el incremento de la endoglina soluble.

Las recientes técnicas de alta eficiencia como el análisis en doble dimensión y prometen dar mejores resultados que los obtenidos hasta la fecha en identificar diferencias en los patrones de proteínas al comparar muestras patológicas contra muestras control<sup>31</sup>.

La controversia que hay entre la existencia o no de estos factores pudiera explicarse, de acuerdo a nuestros datos preliminares, en el bloqueo eficaz de las proteasas presentes en la muestra, este paso que nosotros hemos encontrado es crítico para mantener la actividad tampoco ha sido empleado adecuadamente en los estudios reportados.

En este contexto el presente trabajo intenta caracterizar las diferencias que existen en los patrones protéicos en geles de doble dimensión de plasmas provenientes de mujeres que cursaron con embarazos normales, mujeres no embarazadas y personas del sexo masculino no hipertensas y compararlos con plasmas de mujeres con preeclampsia severa, tanto de plasmas completos como de aquellas fracciones obtenidas en pasos previos de purificación como la afinidad por el Cibacron 3GA.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar el ó los factores que inducen activación/daño endotelial presentes en el plasma de mujeres con preeclampsia severa a partir de comparar las diferencias que existen en los patrones de geles de doble dimensión de las proteínas presentes en el plasma de mujeres con preeclampsia severa, con embarazos normales, mujeres no grávidas y hombres no hipertensos, tanto de plasmas completos como de fracciones semipurificadas, empleando cultivos de HUVECs provenientes de recién nacidos con y sin antecedentes de preeclampsia. Caracterizar mediante la secuencia aminoterminal y bioinformática (comparación de la secuencia con bancos de datos como swissprot y gene bank) las proteínas con actividad.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Obtener plasma de mujeres con embarazos normales, con preeclampsia severa, mujeres no grávidas y hombres no hipertensos y adicionarles una mezcla de inhibidores de proteasas.
- 2.- Probar la capacidad de estos plasmas para inducir citotoxicidad o activación endotelial incubando los plasmas con cultivos de HUVECs provenientes de recién nacidos con y sin preeclampsia, empleando la prueba de cristal violeta y permeabilida al yoduro de propidio y midiendo a través de ELISA moléculas marcadoras de activación/daño endotelial como ICAM-1, P-selectina, E-selectina, VCAM-1, Endotelina-1, endogлина<sup>32</sup>.
- 3.- Semipurificar los plasmas empleando su afinidad por colorantes como Cibacron 3GA.
- 4.- Probar la actividad inductora de activación/daño endotelial en cada una de las fracciones.
- 5.- Separar los componentes presentes en las muestras completas ó fraccionadas empleando geles de doble dimensión (isoelectroenfoque-SDS).
- 6.- Analizar los patrones obtenidos y establecer las diferencias entre los grupos de estudio empleando un equipo de fotodocumentación y análisis.
- 7.- Realizar eletrotransferencia de las dobles dimensiones en PVDF y cortar los spots que marquen diferencias.
- 8.- Secuenciar un spot idéntico al (los) que induzca(n) activación/daño endotelial empleando un secuenciador automatizado de proteínas.
- 9.- Ingresar a los bancos de datos del sitio de internet la Biblioteca de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica e identificar a través de la secuencia aminoterminal

las moléculas conocidas o los genes que codifican para alguna proteína putativa compatibles con la misma.

10.- Publicar los resultados en revistas con arbitraje reconocidas.

## METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Transversal, Experimental.

Universo: Pacientes embarazadas con diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en el Hospital General de Acapulco

Muestra: Muestreo sistemático recopilando hasta 100 plasmas por grupo.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión	Exclusión	Eliminación
Mujeres embarazadas con diagnóstico de preeclampsia o eclampsia .	Mujeres embarazadas con Otra enfermedad diferente a preeclampsia	Por solicitud de la paciente. Coagulación o hemólisis de la muestra.

### Operacionalización de variables:

- i. **Variable 1:** Viabilidad celular en presencia de plasma de pacientes con preeclampsia.
  - ii. **Definición conceptual:** Cantidad de células que permanecen vivas posterior al contacto de 48 horas con plasma de pacientes con preeclampsia a una concentración del 10 y 15% de plasma en el medio de cultivo.
  - iii. **Definición operacional:** Se colocaran aproximadamente 10,000 células por pozo más suero bovino fetal al 5% más plasma de paciente con preeclampsia al 10% y en otro pozo al 15%. Después de 48 horas se teñirán las células con cristal violeta y se obtendrá su lectura por medio de espectrofotometría.
  - iv. **Indicador:** Espectrofotometría.
  - v. **Escala de medición:** Cuantitativa.
- 
- i. **Variable 2:** Apoptosis por traslocación de fosfatidilserina y activación de la cascada de las caspasas.
  - ii. **Definición conceptual:** Presencia de translocación de fosfatidilserina en la membrana celular.
  - iii. **Definición operacional:** Se colocaran aproximadamente 10,000 células por pozo más suero bovino fetal al 5% más plasma de paciente con preeclampsia al 10% y en otro pozo al 15%. Después de 48 horas se teñirán con anexina V, siendo analizadas mediante citometría de flujo.
  - iv. **Indicador:** Citometría de flujo.
  - v. **Escala de medición:** Semi-Cuantitativa.
- 
- i. **Variable 3:** Separación electroforética por isoelectroenfoco y geles de SDS de pro

- ii. **Definición conceptual:** Diferencias en el patrón electroforético de doble dimensión entre los plasmas de los grupos experimental (pacientes con preeclampsia) y control (embarazo normoevolutivo)
- iii. **Definición operacional:** Se tomarán una muestra conteniendo 10-50 microgramos de proteína, y se colocará en una tira de poliacrilamida y se separarán las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico empleando anfolitos un equipo de isoelectroenfoque automatizado, la tira posteriormente será sometida a una segunda dimensión de separación en un gel de poliacrilamida SDS para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular, obteniéndose la separación del patrón protéico en doble dimensión de cada plasma. Se compararán los resultados de ambos grupos mediante un equipo de análisis de imagen después de teñir los geles.
- iv. **Indicador:** análisis de imagen comparando los patrones protéicos y sus concentraciones relativas
- v. **Escala de medición:** Semi-Cuantitativa

## 2. Instrumentos de medición

- + Microscopio
- + Placas de 24 y 96 pozos.
- + Espectrofotómetro Microplate Autoreader, Biotek Instruments EL311.
- + Carboxilfluorescein FLICA Apoptosis Detection Kit Caspase Assay, Immunochemistry Technologies, LLC.
- + Annexin V Apoptosis Detection Kit: Sc- 4252 AK Santa Cruz
- + Citómetro de flujo Becton Dickinson FACS Calibur
- + Isoelectroenfoque: Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System with Ettan IPGphor Manifold.
- + Geles de SDS: Ettan DALT six Large Vertical System.

## PROCEDIMIENTO

**Obtención de muestras de plasma.-** Las muestras de los diferentes grupos de estudio a) mujeres que cursan con embarazos normales; b) mujeres con preeclampsia severa documentada por las cifras tensionales y proteinuria; c) mujeres no embarazadas y d) hombres jóvenes sin hipertensión arterial sistémica se obtendrán por venopunción y la sangre será colectada en presencia de EDTA para obtener el plasma, la sangre se centrifugará dentro de las primeras 3 horas de haberse obtenido y se le agregará una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina, leupeptina, aprotinina y PMSF).

**Obtención de cultivos de HUVECs.-** Los cordones umbilicales de recién nacidos con y sin preeclampsia se obtendrán de las salas de labor de una manera aséptica y serán transportados en "medio de transporte" (Medio 199 adicionado de suero fetal bovino al 10%, glucosa, piruvato de sodio y glutamina) estéril, en el laboratorio los cordones se trabajarán dentro de las 12 horas de haberse obtenido.

Los cordones serán canalizados con un catéter por ambos extremos de la vena umbilical, se lavarán con medio 199 sin suero para eliminar la sangre y se incubarán con colagenasa tipo II a 37°C durante 5-10 minutos, se aplicará un ligero masaje y se obtendrá las células desprendidas mediante lavado con jeringa, se trabajarán cordones umbilicales de manera individual. Las células obtenidas se centrifugarán a 900 rpm durante 5 minutos y se sembrarán en cajas de cultivo T-25, con medio de

cultivo 199 suplementado con piruvato de sodio, glutamina, 10% de suero fetal bovino, penicilina, estreptomycin y anfotericina B así como factor de crecimiento para células endoteliales.

Los cultivos se alimentarán cada tercer día eliminando el medio y añadiendo medio nuevo hasta alcanzar la confluencia. Para los experimentos los cultivos se despejarán de las cajas empleando tripsina 0.05% en Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) pH 7.4 durante 2-5 min. a 37°C, la reacción se detendrá añadiendo 10 ml de medio 199 con 10% de suero fetal bovino se centrifugarán, se resuspenderán en medio 199 suplementado con suero bovino fetal, antibióticos y factor de crecimiento endotelial y se sembrarán en placas de plástico estériles de 24 pozos a una densidad de 25,000 células por pozo.

**Evaluación de citotoxicidad.**- Los cultivos en los pozos en fase log cercana a la confluencia (determinada por observación directa al microscopio) se incubarán con medio 199 suplementado con antibióticos, factor de crecimiento endotelial y concentraciones variables (5, 10, 15 y 20%) de los plasmas derivados tanto de las mujeres con preeclampsia como de los grupos control. Las fracciones eluidas del Cibacron 3GA-agarosa, se evaluarán de la misma manera. En el caso de los "spots" éstos serán sometidos a esterilización por exposición con luz ultravioleta y se depositarán directamente en los pozos, se emplearán fragmentos de membrana u otras proteínas electrotransferidas como controles. En caso de purificarse proteínas por HPLC se añadirán al medio complementado y se esterilizarán por filtración en membranas de 0.22 micras antes de añadirse a los cultivos. Se dejará el plasma durante 24 Y 48 horas y posteriormente se observarán las células en un microscopio invertido y se documentará la morfología de las células mediante fotografía, se incubarán con cristal violeta y se lavarán con HBSS, se lizarán con 100 microlitros de solución de lisis (isopropanol-HCl) el sobrenadante se cuantificará por colorimetría en un espectofotómetro para placas de ELISA a 575nm. Para determinar la cantidad de células que permanecen adheridas después de la incubación se empleará cristal violeta en otros pozos control.

**Semipurificación de los factores.**- Debido a los datos preliminares con que contamos los plasmas se incubarán con Cibacron 3GA-agarosa a temperatura ambiente por 2 horas, la resina se lavará con solución salina de fosfatos (PBS) y se eluirá con 0.5, 1.0 y 1.5M de NaCl, las fracciones retenidas y no retenidas en cada paso de purificación de todos los grupos se evaluarán para ver su efecto de citotoxicidad e inducción de factores que demuestran activación/daño endotelial. Alternativamente las fracciones obtenidas de los eluidos serán sujetas a isoelectroenfoque preparativo en solución empleando rotolitos en un equipo de rotofor (BioRad) para intentar una mayor purificación.

**Determinación de marcadores de activación/daño endotelial.**- Los sobrenadantes obtenidos de las incubaciones con los diferentes plasmas, sus fracciones semipurificadas o purificadas o aquellos incubados con los "spots" obtenidos de las membranas de PVDF se evaluarán para la producción de: ICAM-1 soluble, VCAM-1 soluble, P-selectina soluble, E-selectina soluble, endotelina-1 y endogлина soluble se medirán empleando diferentes diluciones un sistema de inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial.

**Cuantificación de proteínas.**- Para poder comparar las concentraciones relativas de las bandas o "spots", se cuantificará proteína presente en los plasmas problemas y controles empleando la técnica de Bradford, los geles serán cargados con concentraciones iguales de proteína, alternativamente se empleará el equipo de espectofotometría para bajos volúmenes solicitado en esta propuesta.

**Isoelectroenfoque de los plasmas o sus fracciones.**- Los plasmas crudos, o las fracciones semipurificadas por Cibacron 3GA se someterán a un isoelectroenfoque empleando tiras con inmobilinas en el equipo para el cual se solicita apoyo en esta convocatoria (IPGphor Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante, se emplearán diversos rangos de pH para determinar el óptimo para resolver mejor las muestras. Se correrán controles de punto isoeléctrico (PI) y se

calculará el PI de las proteínas presentes en la muestra empleando el software del equipo de fotodocumentación.

**Geles de 2ª Dimensión.-** Las tiras de poliacrilamida con inmobilinas en que se resolverán las muestras serán sujetas a una segunda dimensión empleando geles de poliacrilamida SDS, inicialmente las muestras se correrán en una cámara de electroforesis de pequeño formato y una vez identificadas las diferencias presentes en las muestras tanto crudas como semipurificadas, se empleará tinción con azul brillante de Coomassie para observar las proteínas mas abundantes y tinción con plata para detectar aquellas moléculas que se encuentren poco representadas en la mezcla. Una vez identificadas las diferencias en los patrones electroforéticos de doble dimensión se procederá a correr geles preparativos con mayor resolución para obtener los "spots" de proteínas que se encuentren exclusivamente o se hallen incrementadas en los plasmas de las mujeres con preeclampsia pero que se hallen ausentes o disminuidos en los grupos control, o bien que se encuentren en concentraciones superiores en los plasmas de los grupos controles, en particular el de las mujeres embarazadas sin preeclampsia, esto con el fin de detectar baja producción como en el caso del PIGF y se correrán carriles con proteínas de peso molecular conocido para poder calcular el peso molecular de las proteínas presentes en la muestra empleando el software del equipo de fotodocumentación.

**Electrotransferencia.-** Los geles de doble dimensión en donde se encuentren diferencias serán electrotransferidos a membranas de PVDF empleando un equipo de electrotransferencia semiseco, las proteínas serán detectadas empleando una tinción con rojo Ponceau.

**Secuencia de proteínas.-** Los "spots" que se encuentren exclusivamente o incrementados en los plasmas de las mujeres con preeclampsia se cortarán de las membranas y se secuenciarán en su región aminoterminal empleando un secuenciador automático de proteínas con el que ya cuenta el laboratorio. Se realizarán al menos 25 ciclos de cada muestra para obtener 25 residuos de aminoácidos y estar razonablemente seguros de que no existirá confusión al identificar las proteínas en las bases de datos.

**Identificación de las proteínas.-** Las secuencias serán comparadas con las bases de datos existentes en el sitio de internet de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, empleando tanto las bases que contienen secuencias de proteínas como aquellas que contienen secuencias de nucleótidos, utilizando para tal efecto un traductor de secuencias proteínas-nucleótidos existente en el mismo sitio.

## **PLAN DE ANALISIS DE RESULTADOS.**

**Obtención de muestras de plasma.-** Los diferentes grupos de estudio a estudiar fueron: a) mujeres que cursan con embarazos normales; b) mujeres con preeclampsia severa, documentada por las cifras tensionales, proteinuria y criterios de severidad.

La sangre se colectó de ambos grupos en presencia de EDTA para obtener el plasma, la muestra se centrifugó dentro de las primeras 3 horas de haberse obtenido y se le agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina, leupeptina, aprotinina y PMSF).

Obtención de cultivos de HMEC.- La línea HMEC-1 se creció en cajas de cultivo T-25, en medio MCDB 131 suplementado con glutamina, 10% de suero bovino fetal y una mezcla de antibióticos y antifúngicos (anfotericina B, estreptomycin y penicilina), así como factor de crecimiento para células endoteliales. Las células se mantuvieron en cultivo con medio MCDB 131 para su crecimiento y cuando las células alcanzaron confluencia se despegaron de la caja de cultivo con tripsina al 0.25% y HEPES para no dañarlas, una vez despegadas se detuvo la reacción con medio con 10% de CPSR -3 y se centrifugó, las células se re-suspendieron en medio MCDB 131 suplementado, se procedió al conteo celular por medio de la técnica de azul tripano y se sembraron en placas estériles de 24 pozos con una densidad de 300 000 células por pozo.

Obtención de cultivos de HUVEC's.- Las células endoteliales HUVEC's se derivaron de cordón umbilical de embarazos normales y de madres con preeclampsia, se obtuvieron por incubación con colagenasa y se sembraron en cajas T-75 y medio M 199 suplementado con Factor de Crecimiento Endotelial 50mcg/ml, una mezcla de antibióticos-antifúngicos (anfotericina B, estreptomycin y penicilina) y Suero Bovino Fetal al 20%. Una vez que el cultivo llegó a confluencia se despegaron las células con tripsina al 0.25% y HEPES para no dañarlas, se detuvo la reacción con medio con 10% de CPSR -3 y se centrifugó, las células se re-suspendieron en medio M 199 suplementado, se procedió al conteo celular por medio de la técnica de azul tripano y se sembraron en placas estériles de 24 pozos con una densidad de 300 000 células por pozo.

Evaluación de viabilidad.- Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 30 000 células se incubarán con medio MCDB-131 suplementado con antibióticos, factor de crecimiento endotelial, los plasmas derivados tanto de las mujeres con preeclampsia como de los grupos normal se incubaron por 48 hrs., en concentraciones de 10% y 15%, para determinar la cantidad de células que permanecen adheridas después de la incubación se usó la técnica de cristal violeta.

Ensayos de apoptosis por kit de Anexina V y Policaspasas.- Se sembraron las células en placas estériles de 24 pozos con una densidad celular de 300 000 células por pozo, se permitió estabilizar el cultivo por 24 horas. Se prepararon las diluciones de los plasmas tanto embarazo normal como preeclámpicas a 10% y 15% con medio MCDB-131, el control fue con SBF al 10% y 15%. Se dejó este estímulo en las células por 48 horas, desde las 24 horas se observan los cambios morfológicos. Para la separación celular de las placas de 24 pozos, se utiliza tripsina más colagenasa, se extraen los sobrenadantes y el paquete celular se divide en tubos para citometría y se determina anexina V (Santa Cruz) y policaspasas por el kit de Flica.

### **Semipurificación del plasma.**

La semi-purificación del plasma se realizó por medio del equipo de Rotofor el cual es una separación de proteínas por isoelectroenfoque en un soporte líquido, se emplearon varios rangos de pH, a) pH = 3 a 10, b) pH = 2.5 a 5. C) pH de 4 a 6. D) Finalmente se construyó un gradiente de pH entre 2.5 y 6. Una vez realizado cada uno de los gradientes se generaron 20 fracciones de cada corrimiento, por lo que a cada fracción se le determinó el pH, se eliminó los anfólitos por diálisis, posteriormente se cuantificó la

concentración de proteínas, se realizó un gel en poliacrilamida al 12% y se probaron las fracciones sobre cultivos celulares.

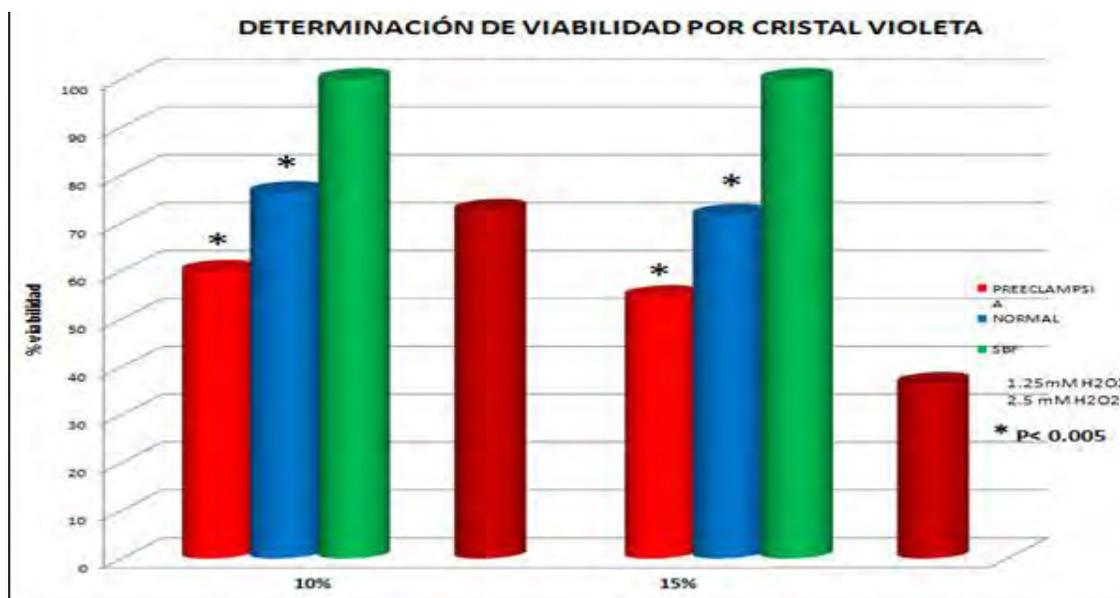
Cuantificación de proteínas.- Para poder comparar las concentraciones relativas de las proteína plasmáticas se cuantifico proteína empleando la técnica de Bradford, los geles se cargaron en concentraciones iguales de proteína, para posteriormente realizar la tinción de los geles con plata.

Determinación de molécula solubles por ELISA.- Los sobrenadantes obtenidos de las incubaciones de 48hrs con los diferentes plasmas, a las concentraciones de 10% y 15%, se evaluaron para la producción de: VCAM-1 soluble (CD106), P-selectina soluble (CD62P), E-selectina soluble (CD62E), endoglina soluble (CD105), IL-8 soluble y TNFalfa, se determino por medio diferentes diluciones un sistema de inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial.

Una vez que se obtuvieron las fracciones purificadas, se probaron sobre los cultivos celulares, y los sobrenadantes se cuantifico: endoglina soluble (CD105) y endotelina soluble.

## RESULTADOS.

Los plasmas ya separados de los diferentes grupos, con la mezcla de inhibidores de proteasas, se adicionaron al medio de cultivo para estimular a las células HMEC-1 por 48hrs, inicialmente se estimularon las células con una concentración de 10% y 15% de plasma, en los ensayos iniciales. Para la determinación de la viabilidad se realizó la técnica de Cristal Violeta, los resultados obtenidos se encuentran en la Gráfica 1.



GRÁFICA 1.- Determinación de viabilidad por cristal violeta.

Puede observar que hay una disminución de la viabilidad de las células HMEC-1 con los plasmas de embarazos con preeclampsia (59.9% y 54.6%) con 10% y 15% respectivamente, en comparación con los plasmas de embarazos normales (76.4% y 71.65%). Se realizó la estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones de 1.25mM y 2.5mM como control positivo, siendo la viabilidad de 72.6% y 36.5% respectivamente. Se realizó para el análisis estadístico la prueba de T la cual muestra que existe una  $P < 0.005$  entre el grupo normal y el de preeclampsia tanto para 10% y 15%.

Se realizaron observaciones al microscopio durante la estimulación observándose cambios morfológicos desde las 24hrs. y son más aparentes a las 48 hrs. como puede observarse en las microfotografías que se encuentran en el Figura 1.

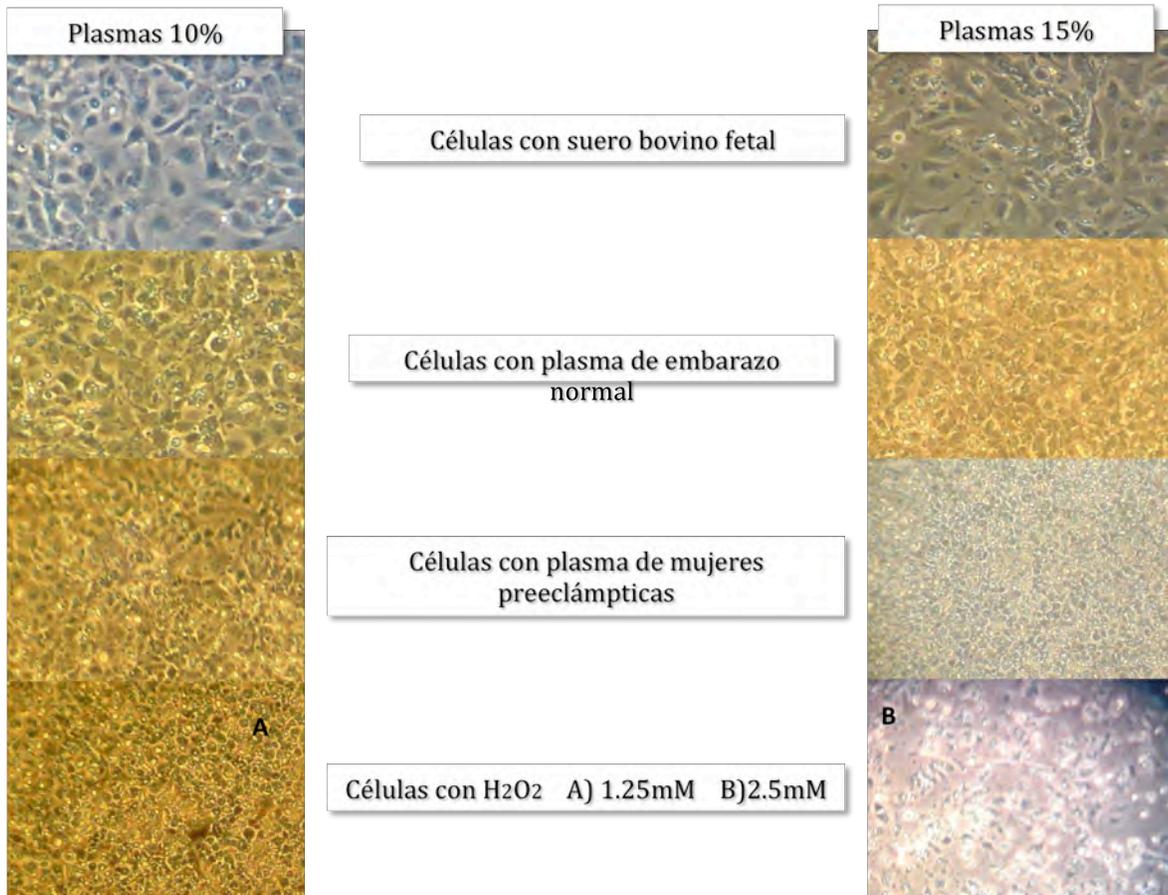
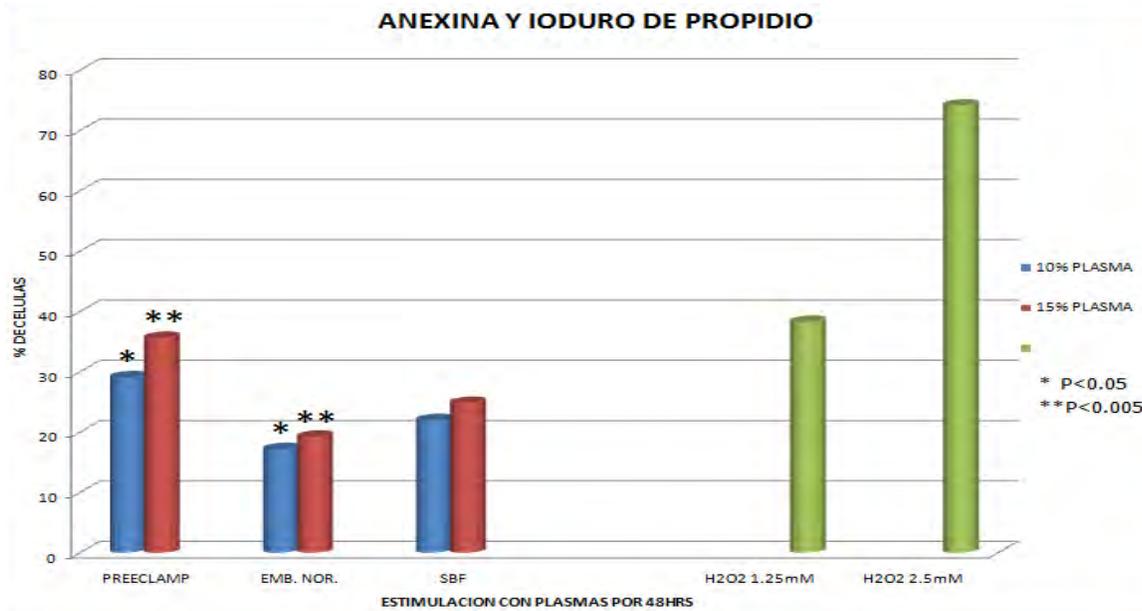


Figura 1.- Microfotografías de las células estimuladas con plasma a diferentes concentraciones

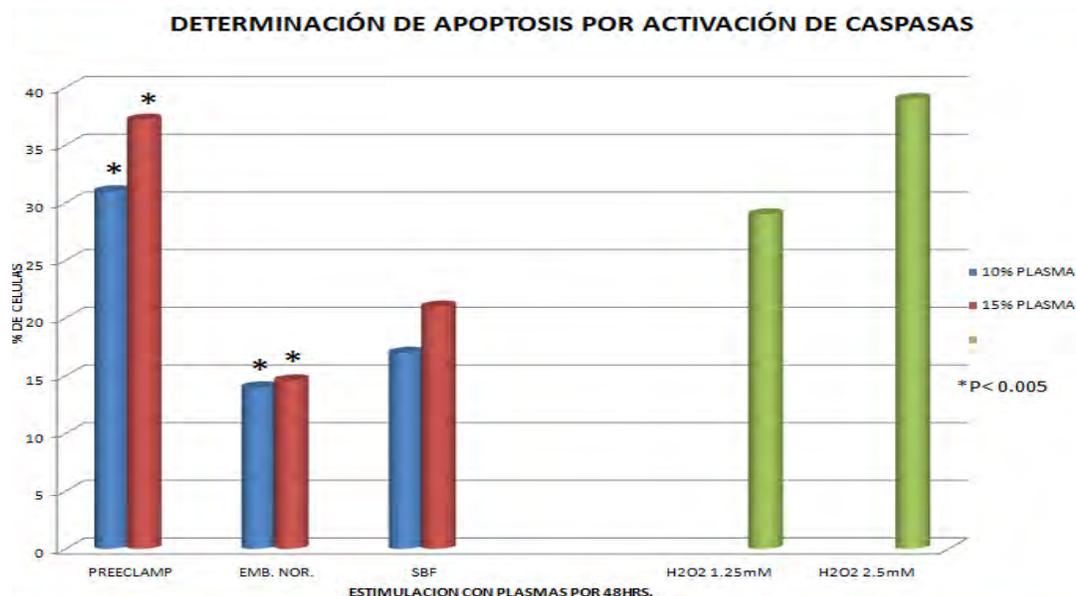
Se determino la activación de apoptosis por la vía de Traslocación de fosfatidil-serina determinada por Anexina V y Ioduro de Propidio, los resultados se encuentran en la Gráfica 2.



Gráfica 2.- Determinación de apoptosis por Anexina V reconociendo la Traslocación de fosfatidil serina en la superficie de las células después de la estimulación por 48Hrs., con plasma normal y con preeclampsia al 10 y 15%.

Como puede observar, hay un mayor número de células que expresan fosfatidil-serina las cuales fueron estimuladas con plasmas preeclámpticas siendo de 29.08% para el 10% y de 35.6% para el 15%, mientras que para el estímulo con plasma de embarazo normal fue de 17.2% para el 10% y de 19.2% para el 15%. El análisis estadístico mostró que existe una  $P < 0.05$  entre plasma con preeclampsia y plasma normal con la estimulación del 10% y de  $P < 0.005$  para 15% de plasma.

También se determinó apoptosis por la activación de caspasas, lo cual está representado en la Gráfica 3.

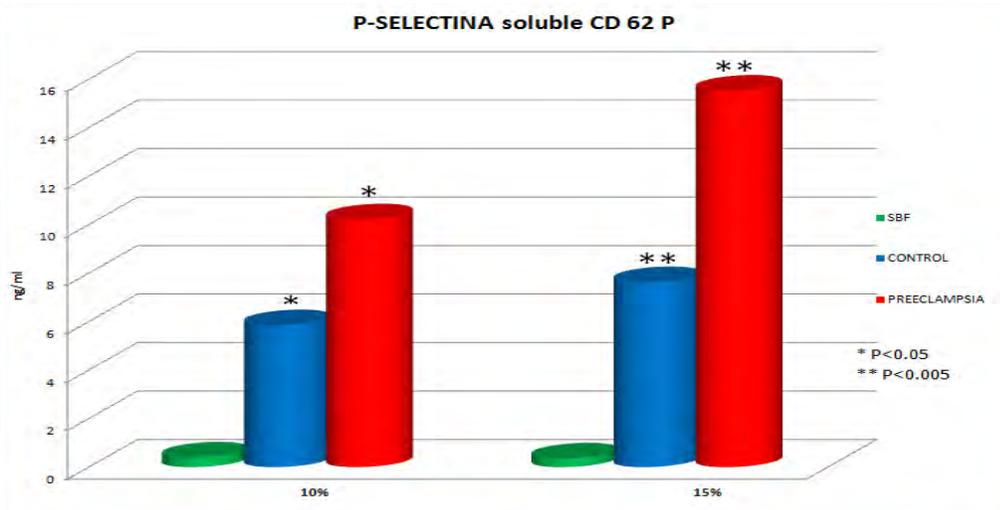


Grafía 3.- Determinación de apoptosis por activación de la vía de las Caspasas. Estimuladas con plasma de embarazo normal y preeclámpicas por 48 hrs

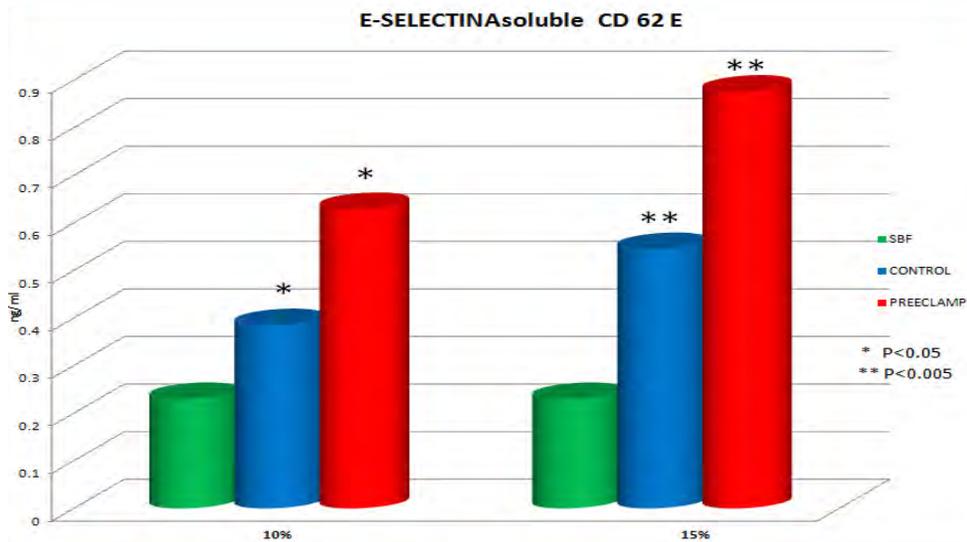
Al igual que con anexina V hay un mayor número de células que expresan caspasas en las que se estimularon con plasma preeclámpicas, siendo 31% para el 10% y de 37.2% para el 15%. Para el plasma normal las células que respondieron solo fue de 14% para el 10% y de 14.6% para el 15% de plasma.

Para el control positivo se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como estímulo, la respuesta de las células fue de 29% de las células que presentan apoptosis para 1.25mM y de 39% para 2.5mM. En el análisis estadístico la prueba T muestra en ambas concentraciones del plasma una P < 0.005 de significancia.

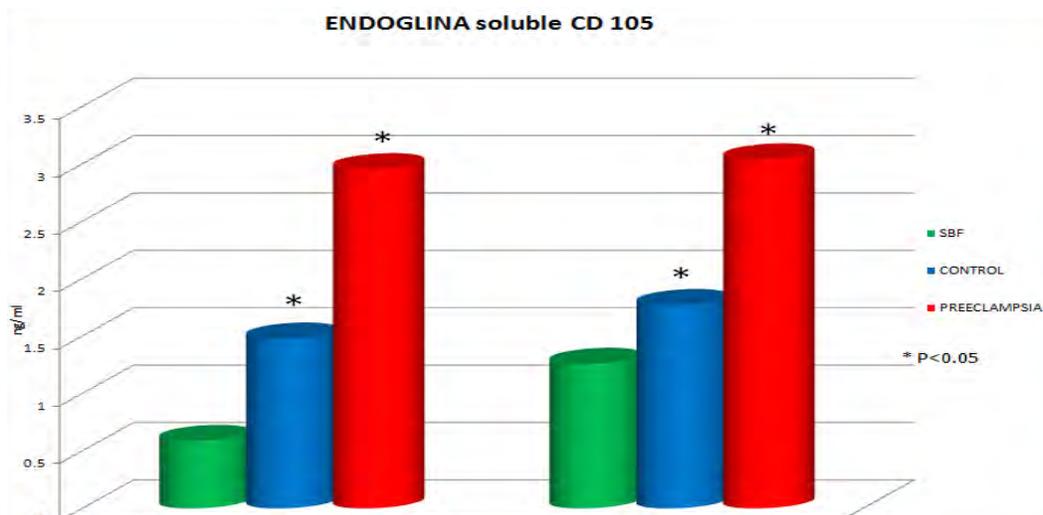
Se determinaron las moléculas solubles CD 62 P, CD 62 E, CD 105, CD 106, IL-8 y TNF- $\alpha$ , en los sobrenadantes de las células HMEC-1 estimuladas por 48Hrs., con los plasmas tanto preeclampsia como embarazo normal, mostrándose los resultados en las Gráficas 4, 5, 6 y 7, las moléculas P-Selectina soluble y E-Selectina soluble muestran un comportamiento semejante, las células estimuladas con el plasma de preeclampsia su expresión fue mayor que las células estimuladas con plasma normal, teniendo una significancia estadística de P < 0.05 para el estímulo de 10% y de P < 0.005 para el 15%.



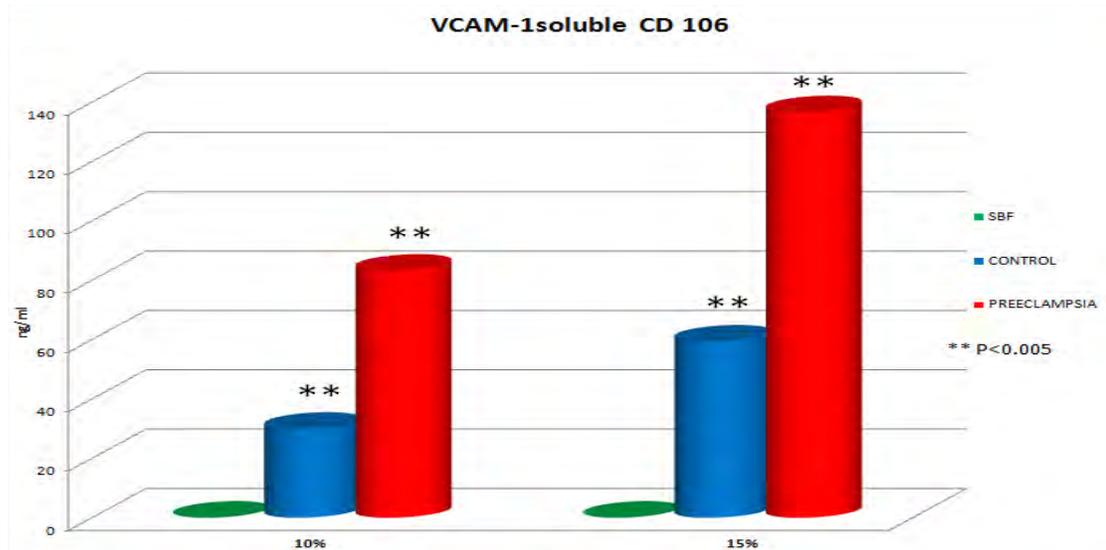
Gráfica 4.- Determinación de P-Selectina soluble en el sobrenadante de las células estimuladas por 48hrs., con plasma de embarazo normal y preecláptica



Gráfica 5.- Determinación de E-Selectina soluble en el sobrenadante de las células estimuladas por 48hrs., con plasma de embarazo normal y preecláptica.



Gráfica 6.- Determinación de Endoglina CD 105 soluble en el sobrenadante de las células estimuladas por 48hrs., con plasma de embarazo normal y preecláptica.



Gráfica 7.- Determinación de VCAM-1 CD 106 soluble en el sobrenadante de las células estimuladas por 48hrs., con plasma de embarazo normal y preecláptica

Para las moléculas VCAM-1 (CD106) y Endoglina (CD 105) el comportamiento también es semejante solo varía la significancia con la prueba estadística. Tanto para el 10% como para el 15%  $P < 0.05$  y en el caso de CD 106 la significancia fue de  $P < 0.005$ . En las determinaciones de IL-8 y TNF- $\alpha$  no se encontró diferencia significativa.

Para la purificación de proteínas plasmáticas se inició con la preparación de las muestras para la eliminación de sustancias que pueden interferir, para ello se realizó el tratamiento con Cibacron Blue 3GA y posteriormente purificación por precipitación con el Kit 2-D-Clean-Up, posteriormente por Isoelectro-enfoque en soporte sólido.

La semi-purificación por isoelectro-enfoque se realizó en el equipo de ROTOFOR, el cual utiliza un soporte líquido y partimos de la muestra completa (solo con inhibidores), a la cual se le adicionan las diferentes mezclas de anfóteros. Inicialmente se empleó un rango de pH entre 3 y 10 unidades. Posteriormente se realizó un rango de 2.5 a 5 Figura 2.

**FRACCIONES DE PLASMA CON PREECLAMPSIA  
SEMIPURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH  
2.5 a 5**

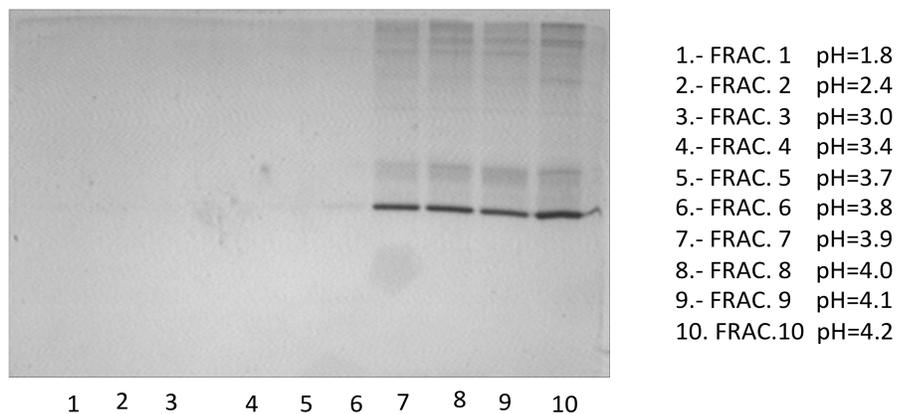


Figura 2.- Semipurificación de plasma de madre con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 1.8 y 4.2.

También se empleo el rango de 4 a 6 de pH en los geles que están en la Figura 3.

**FRACCIONES DE PLASMA CON PREECLAMPSIA  
SEMIPURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON  
pH=4.4 a 11.7**

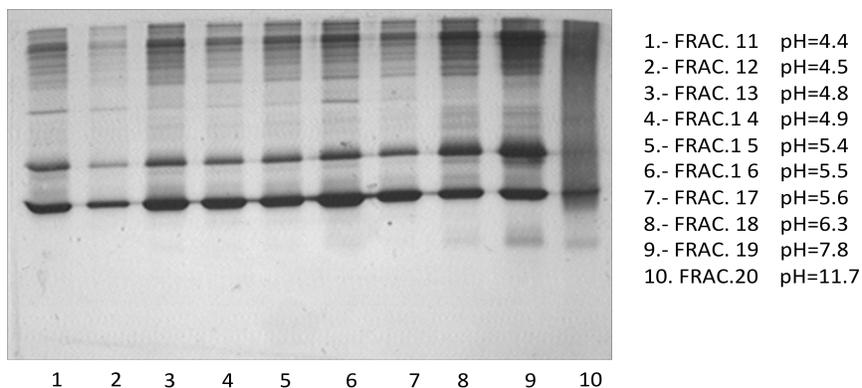


Figura 3.- Semipurificación de plasma de madre con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 4.4 y 11.7.

Finalmente se realizó una mezcla para obtener un rango de 2.5 a 6 de pH los resultados se representan en la Figura 4., cada separación se procedió a dializar las muestras para eliminar los anfolitos para poder estimular las células así como realizar geles de poliacrilamina al 12%.

En los geles se muestran varias diferencias en la presencia y ausencia de bandas de proteínas.

**FRACCIONES DE PLASMA CON PREECLAMPSIA  
SEMIPURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON  
pH=2.5 a 4.9**

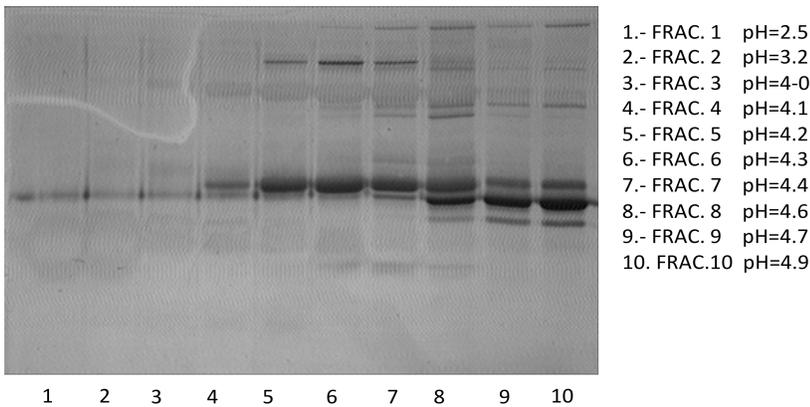


Figura 4.- Semipurificación de plasma de madre con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 2.5y 4.9.

Para poder analizar mejor las diferencias en los geles colocamos las fracciones del plasma con preeclampsia y de embarazo normal con el mismo pH en forma consecutiva.

**FRACCIONES DE PLASMA CON PREECLAMPSIA  
SEMIPURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON  
pH=5.1 a 9.3**

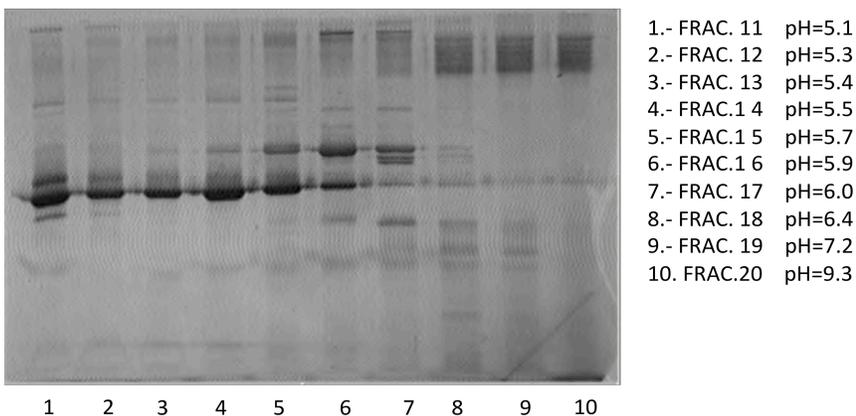
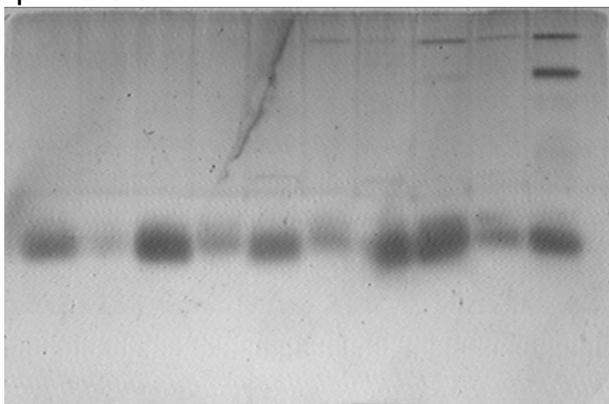


Figura 5.- Semipurificación de plasma de madre con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 5.1 y 9.3.

En la Figura 6, se encuentran las fracciones de pH de 1.8 a 3.7 tanto del plasma normal como del plasma con preeclampsia. La fracción que mostró tener actividad fue analizada electroforéticamente y se encontró que, tiene un P.M. aproximado de 50Kdal., y tiene un pH=2.68, la cual será enviada a secuenciar por su pureza.

### FRACCIONES DE PLASMA SEMI-PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE Y CONCENTRADAS CON pH=1.8 a 3.7

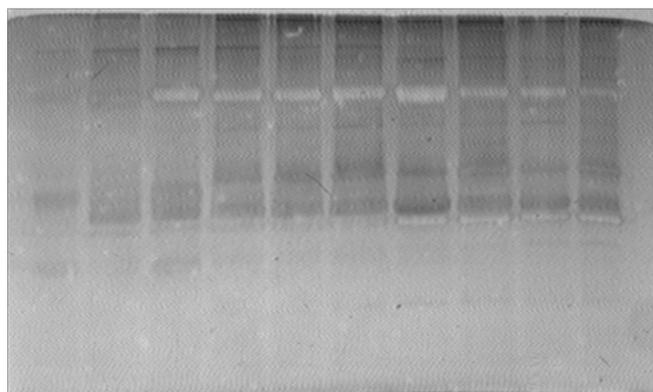


- 1.- FRAC. 1 PREEC. pH=1.8
- 2.- FRAC. 1 NOR. pH=1.9
- 3.- FRAC. 2 PREEC. pH=2.6
- 4.- FRAC. 2 NOR. pH=2.5
- 5.- FRAC. 3 PREEC. pH=3.0
- 6.- FRAC. 3 NOR. pH=2.9
- 7.- FRAC. 4 PREEC. pH=3.5
- 8.- FRAC. 4 NOR. pH=3.3
- 9.- FRAC. 5 PREEC. pH=3.7
- 10. FRAC. 5 NOR. pH=3.7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 6.- Semipurificación de plasma de madre con embarazo con preeclampsia y con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 1.8 y 3.7.

## FRACCIONES DE PLASMA SEMI-PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH=3.9 a 4.7

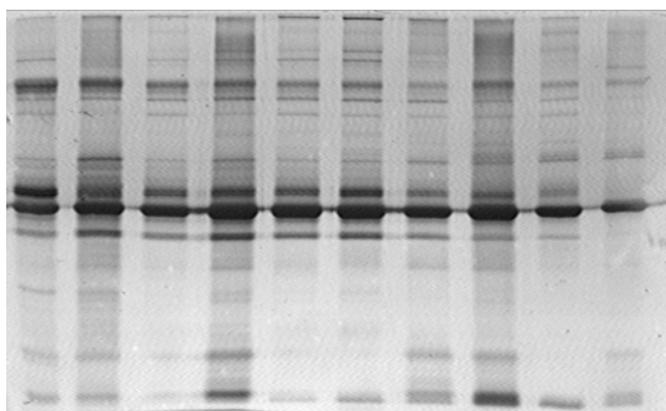


- 1.- FRAC. 6 PREEC. pH=3.9
- 2.- FRAC. 6 NOR. pH=3.9
- 3.- FRAC.7 PREEC. pH=4.3
- 4.- FRAC. 7 NOR. pH=4.0
- 5.- FRAC.8 PREEC. pH=4.4
- 6.- FRAC.8 NOR. pH=4.2
- 7.- FRAC. 9 PREEC. pH=4.5
- 8.- FRAC. 9 NOR. pH=4.5
- 9.- FRAC. 10 PREEC. pH=4.6
10. FRAC. 10 NOR. pH=4.7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 7.- Semipurificación de plasma de madre con embarazo con preeclampsia y con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 1.8y 3.7.

## FRACCIONES DE PLASMA SEMI-PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH=4-9 a 5.7

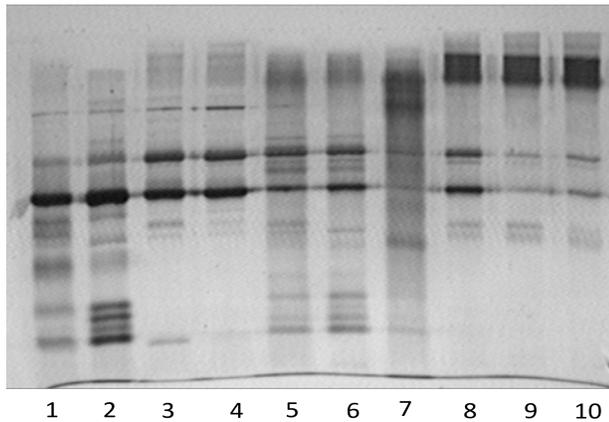


- 1.- FRAC. 11 PREEC. pH=4.9
- 2.- FRAC. 11 NOR. pH=4.9
- 3.- FRAC. 12 PREEC. pH=5.2
- 4.- FRAC. 12 NOR. pH=5.0
- 5.- FRAC. 13 PREEC. pH=5.4
- 6.- FRAC. 13 NOR. pH=5.1
- 7.- FRAC. 14 PREEC. pH=5.5
- 8.- FRAC. 14 NOR. pH=5.5
- 9.- FRAC. 15 PREEC. pH=5.7
10. FRAC.15 NOR. pH=5.6

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 8.- Semipurificación de plasma de madre con embarazo con preeclampsia y con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 4.9 y 5.6.

## FRACCIONES DE PLASMA SEMI-PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH=5.7 a 10.5



- 1.- FRAC. 16 PREEC. pH=5.7
- 2.- FRAC. 16 NOR. pH=5.8
- 3.- FRAC. 17 PREEC. pH=6.2
- 4.- FRAC. 17 NOR. pH=6.1
- 5.- FRAC. 18 PREEC. pH=6.8
- 6.- FRAC. 18 NOR. pH=6.9
- 7.- FRAC. 19 PREEC. pH=8.3
- 8.- FRAC. 19 NOR. pH=7.9
- 9.- FRAC. 20 PREEC. pH=10.4
10. FRAC.20 NOR. pH=10.5

Figura 9.- Semipurificación de plasma de madre con embarazo con preeclampsia y con preeclampsia separada por isoelectroenfoque con un rango de pH entre 5.7 y 10.5.

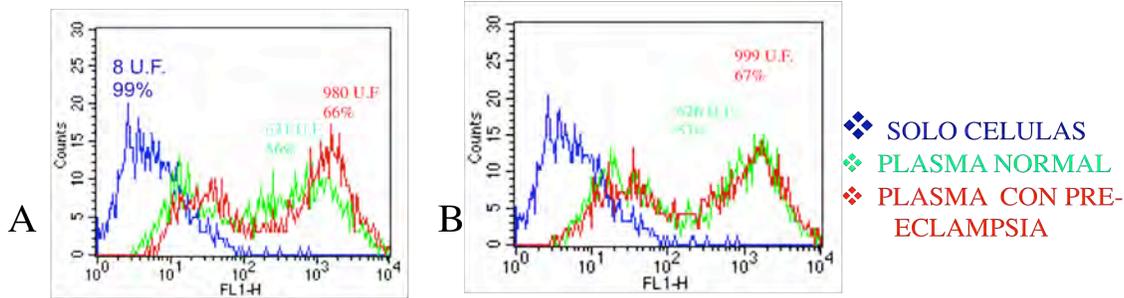
Hay otros patrones proteicos que se pudieron obtener con diferentes características en el comportamiento electroforético al comparar ambos plasmas.

Además de la proteína de 50 Kdal, se observa otra proteína de aproximadamente 200kda., y pH=3.76, en el plasma normal, la cual no está presente en el plasma con preeclampsia, así como en la fracción con pH=5.79 hay dos proteínas de bajo PM de aproximadamente 30Kdal., que igualmente no se encuentran en el plasma preeclámptico.

Por otra parte se observan la presencia de otra proteína en la fracción con pH=3.94 en el plasma con preeclampsia con PM de 40Kdal aproximadamente, la cual está ausente en el plasma normal, sin embargo, solo la fracción inicialmente mencionada de pH=2.68 fue capaz de inducir apoptosis, las otras fracciones no produjeron apoptosis en las células. Estas últimas fracciones se ensayaron para la prueba de apoptosis sobre los cultivos de células de la línea HMEC-1 sin tener resultados positivos.

Las fracciones que mostraron tener actividad inicialmente se determinó apoptosis con el Kit de Anexina V y IP., los resultados de las citometrías se presentan en las Gráficas 8, 9, y 10. Solo están representados los histogramas de las fracciones que mostraban actividad y que se fue identificando la mezcla de pH que permitiera separar mejor a las proteínas.

TRASLOCACION DE FOSFATIDIL-SERINA EN CELULAS HMEC-1  
ESTIMULADAS CON FRACCIONES DE PLASMA SEMI-  
PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH= 3 A 10

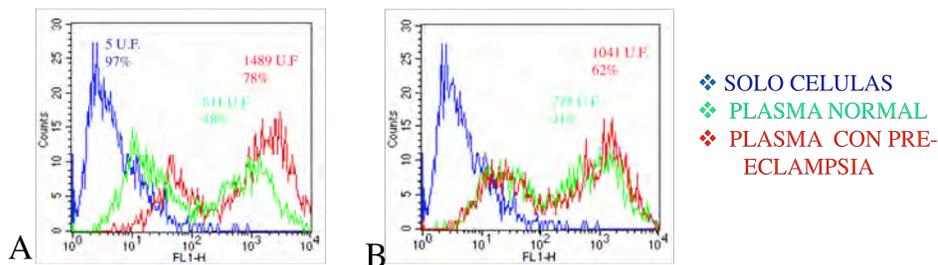


CELULAS HMEC-1 ESTIMULADAS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS  
DEL PLASMA a pH= 3 a 10.

- A) FRACCION NORMAL pH= 3.8 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 3.8  
B) FRACCION NORMAL pH= 5.1 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 5.3

Gráfica 8.- Histogramas de la traslocación de la fosfatidil-serina en la superficie de las células HMEC-1 estimuladas por 48Hr.con las fracciones semipurificadas de los plasmas de embarazo normal y con preclampsia por isoelectroenfoque con rango de pH 3 a 10. Solo se muestran las fracciones que mostraron diferencia.

TRASLOCACION DE FOSFATIDIL-SERINA EN CELULAS HMEC-1  
ESTIMULADAS CON FRACCIONES DE PLASMA SEMI-  
PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH= 2.5 A 5

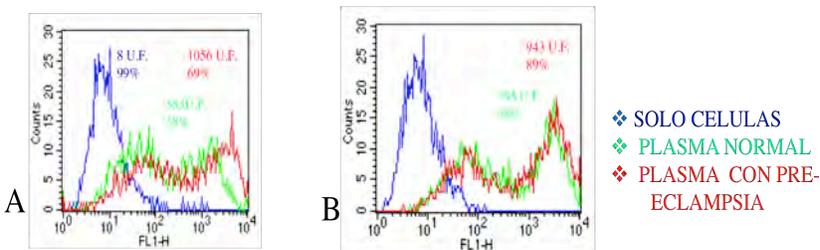


CELULAS HMEC-1 ESTIMULADAS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS  
DEL PLASMA a pH= 2.5 a 5.

- A) FRACCION NORMAL pH= 4.5 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 4.9  
B) FRACCION NORMAL pH= 4.8 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 5.5

Gráfica 9.- Histogramas de la traslocación de la fosfatidil-serina en la superficie de las células HMEC-1 estimuladas por 48Hr.con las fracciones semipurificadas de los plasmas de embarazo normal y con preeclampsia por isoelectroenfoco con rango de pH 2.5 a 5. Solo se muestran las fracciones que mostraron diferencia.

TRASLOCACION DE FOSFATIDIL-SERINA EN CELULAS HMEC-1  
ESTIMULADAS CON FRACCIONES DE PLASMA SEMI-  
PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH= 4 A 6



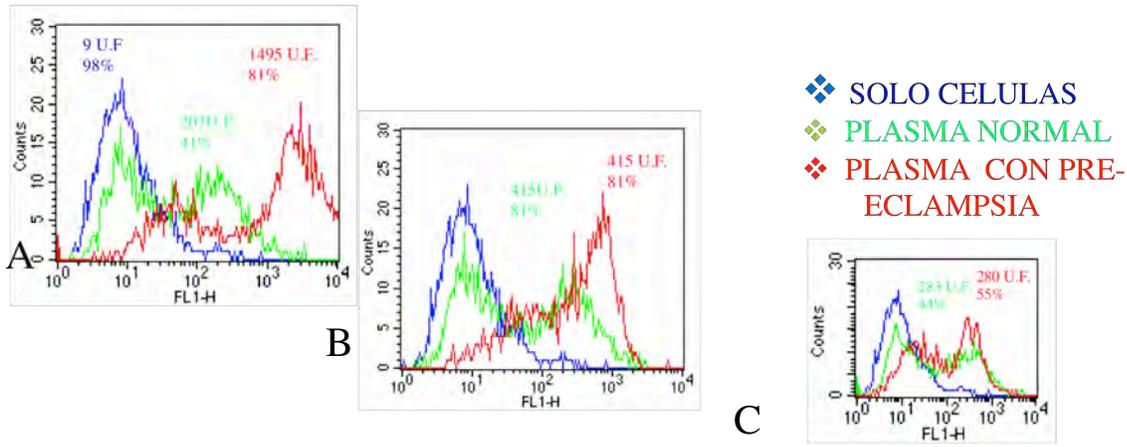
CELULAS HMEC-1 ESTIMULADAS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS  
DEL PLASMA a pH= 4 a 6.

- A) FRACCION NORMAL pH= 4.2 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 4.2  
B) FRACCION NORMAL pH= 4.5 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 4.5

Gráfica 10.- Histogramas de la traslocación de la fosfatidil-serina en la superficie de las células HMEC-1 estimuladas por 48Hr.con las fracciones semipurificadas de los plasmas de embarazo normal y con preeclampsia por isoelectroenfoco con rango de pH 4 a 6. Solo se muestran las fracciones que mostraron diferencia.

En las células HMEC-1 con la fracción del plasma con preeclampsia de pH=2.6 se obtuvo que el 81% de las células translocaban la fosfatidil-serina en la membrana, la intensidad de fluorescencia media fue de 1495,37U.F. Mientras que con la fracción de pH=2.5 del plasma de embarazo normal solo fue el 41% de las células las que translocaron la fosfatidil-serina con una intensidad de fluorescencia de 206.82 U.F. La siguiente fracción del plasma con preeclampsia con pH=3.0 también hay inducción de apoptosis (81%), pero la intensidad de fluorescencia disminuye a 415 U.F. Gráfica 11. Las demás fracciones no mostraron inducción de Apoptosis en las células HMEC-1

TRASLOCACION DE FOSFATIDIL-SERINA EN CELULAS HMEC-1  
ESTIMULADAS CON FRACCIONES DE PLASMA SEMI-  
PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH= 2.5 A 6



CELULAS HMEC-1 ESTIMULADAS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS  
DEL PLASMA a pH= 2.5 a 6.

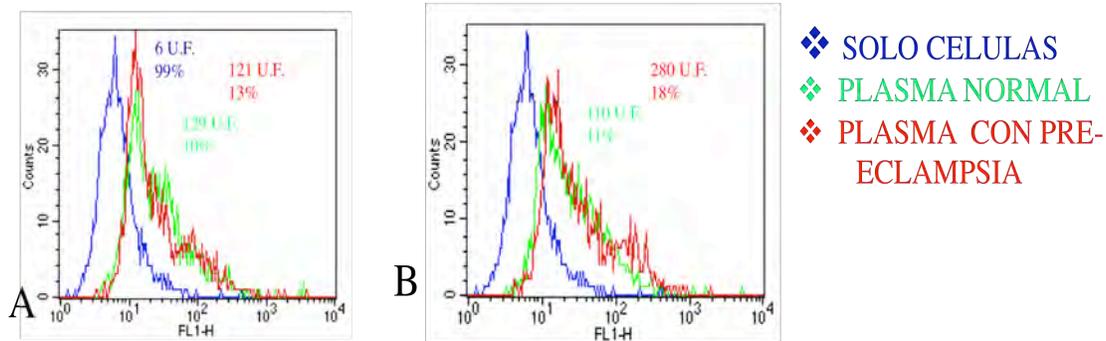
- A) FRACCION NORMAL pH= 2.5 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 2.6
- B) FRACCION NORMAL pH= 2.8 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 3.0
- C) FRACCION NORMAL pH= 3.2 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 3.5

Gráfica

11.- Histogramas de la traslocación de la fosfatidil-serina en la superficie de las células HMEC-1 estimuladas por 48Hr.con las fracciones semipurificadas de los plasmas de embarazo normal y con preeclampsia por isoelectroenfoque con rango de pH 2.5 a 6. Solo se muestran las fracciones que mostraron diferencia.

Posteriormente se obtuvieron células de cordón umbilical de embarazo normal y preecláptica y se realizaron los experimentos en células HUVEC`s, NO se observo la inducción de apoptosis de la misma fracción purificada (pH=2.68) del plasma con preeclampsia, ensayada en las células HMEC-1. Estas determinaciones fueron por citometría de flujo, los resultados se encuentran en la Gráfica 12. Sin embargo con la células HUVEC`s provenientes de embarazo normal, la inducción de apoptosis con la misma fracción del plasma con preeclampsia (pH=3.0) se observa una ligera diferencia del 33% (171U.F.) con relación al plasma de embarazo normal 27% (156 U.F.) Gráfica 13.

TRASLOCACION DE FOSFATIDIL-SERINA EN CELULAS HUVEC's  
ESTIMULADAS CON FRACCIONES DE PLASMA SEMI-  
PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH= 2.5 A 6

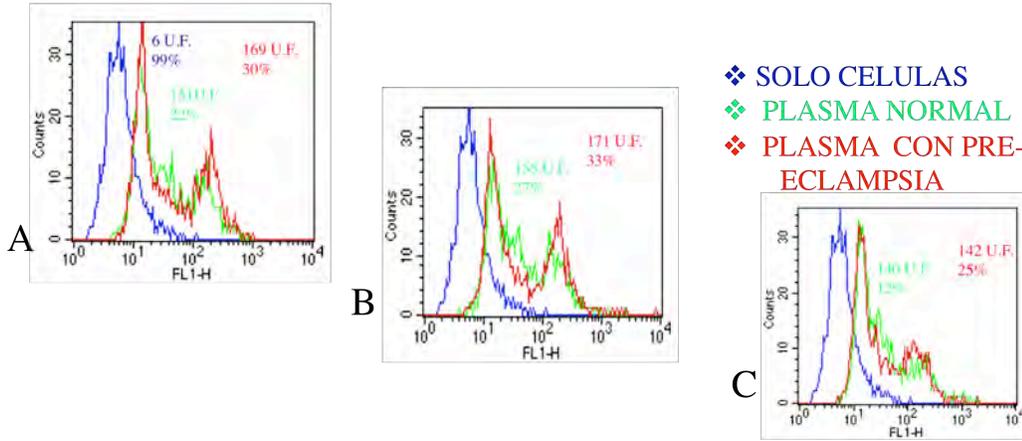


CELULAS HUVEC's DE EMBARAZO CON PRECLAMPSIA Y ESTIMULADAS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL PLASMA a pH= 2.5 a 6  
 A) FRACCION NORMAL pH= 2.5 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 2.6  
 B) FRACCION NORMAL pH= 3.7 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 3.7

Gráfica 12.- Histogramas de la traslocación de la fosfatidil-serina en la superficie de las células HUVEC's provenientes de un embarazo con preeclampsia y estimuladas por 48Hr.con las fracciones semi-purificadas de los plasmas de embarazo normal y con preeclampsia por isoelectroenfoque con rango de pH 2.5 a 6. Se muestran las fracciones que mostraron diferencia con las células HMEC-1.

Con la fracción la cual mostro tener actividad ( pH= 2.68 ), las células HUVEC's fueron empleadas para determinar por citometría de flujo la muerte celular y al sobrenadante se le determino por el método de ELISA la concentración de Endotelina soluble producida así como la Endoglina (CD105) soluble, igualmente los resultados se encuentran en la Gráfica 14 y 15 respectivamente. Puede observarse que hay una mayor producción de ambas moléculas, en el caso de la Endotelina se obtiene un 148% mayor en el sobrenadante de células con embarazo con preeclampsia y plasma también proveniente de embarazo con preeclampsia en comparación con las células de embarazo normal, y la fracción de ambos plasma.

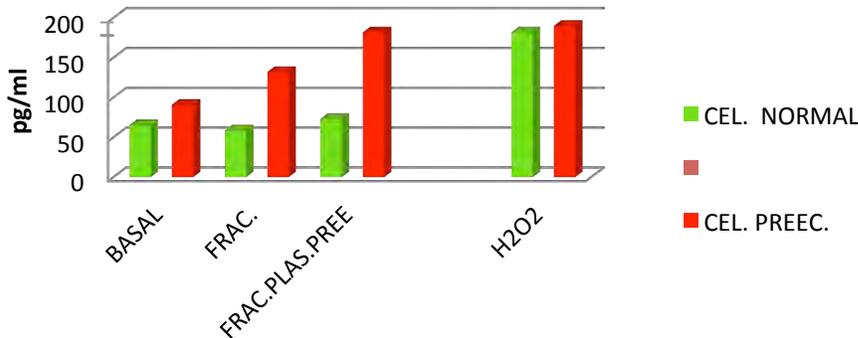
TRASLOCACION DE FOSFATIDIL-SERINA EN CELULAS HUVEC'S ESTIMULADAS CON FRACCIONES DE PLASMA SEMI-PURIFICADAS POR ISOELECTROENFOQUE CON pH= 2.5 A 6



CELULAS HUVEC'S DE EMBARAZO NORMAL Y ESTIMULADAS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL PLASMA a pH= 2.5 a 6  
 A) FRACCION NORMAL pH= 2.5 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 2.6  
 B) FRACCION NORMAL pH= 2.9 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH= 3.0  
 C) FRACCION NORMAL pH= 3.7 Y FRACCION PREECLAMPSIA pH=3.7

Gráfica 13.- Histogramas de la traslocación de la fosfatidil-serina en la superficie de las células HUVEC's provenientes de embarazo normal y estimuladas por 48Hr.con las fracciones semi-purificadas de los plasmas de embarazo normal y con preeclampsia por isoelectroenfoque con rango de pH 2.5 a 6. Se muestran las fracciones que mostraron diferencia con las células HMEC-1.

**SECRECIÓN DE ENDOTELINA EN CÉLULAS HUVEC'S ESTIMULADAS CON LA FRACCION DE pH=2.6**

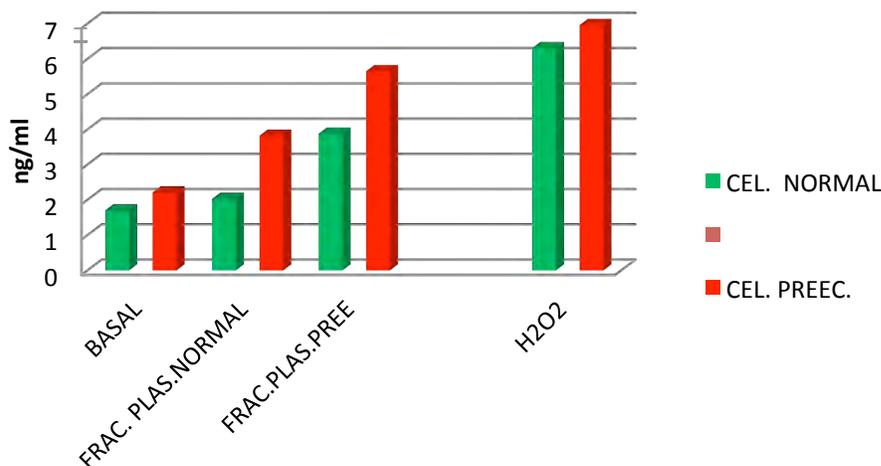


Gráfica 14.-Concentración de Endotelina soluble en el sobrenadante de células HUVEC's estimuladas con la fraccion semipurificada con pH=2.5

En la determinación de Endoglina igualmente la secreción fue mayor con las células de embarazo con preeclámpticas (145%) y el plasma proveniente de embarazo con preeclampsia, con respecto al sobrenadante de las células estimuladas con el plasma normal y células de embarazo normal. En todos los experimentos se tenía la estimulación con agua oxigenada a 1.25mM como control de apoptosis ó de daño endotelial.

□

### SECRECIÓN DE ENDOGLINA EN CELULAS HUVEC's ESTIMULADAS CON LA FRACCION DE pH= 2.6



Gráfica 15.- Concentración de Endoglina soluble en los sobrenadantes de células HUVEC's estimuladas con la fraccion semipurificada con pH=2.5

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

A pesar de los esfuerzos por tratar de comprender la etiopatogenia de la preeclampsia, se ha dicho que la preeclampsia es “la enfermedad de las teorías ninguna de las cuales ha resistido la prueba del tiempo” hasta el momento solo se cuenta con datos que demuestran el incremento de varios factores relacionados con el daño o activación endotelial en la circulación de las pacientes preeclámpticas, pero éstos parecen ser más bien el efecto que la causa de la lesión/activación del endotelio. Los pocos trabajos que han intentado demostrar la presencia de factores citotóxicos en el suero o plasma de pacientes con preeclampsia reportan datos controvertidos.

Hasta donde sabemos no se han podido caracterizar adecuadamente él o los factores que pudieran ser responsables de la lesión/activación endotelial que precede a la aparición de la hipertensión en la preeclampsia, como se pretende realizar en el presente proyecto, sino mas bien se ha visto el efecto de los mismos medidos por el incremento de la endoglina soluble.

Las recientes técnicas de alta eficiencia como el análisis en doble dimensión, prometen dar mejores resultados que los obtenidos hasta la fecha en identificar diferencias en los patrones de proteínas al comparar muestras patológicas contra muestras control. El empleo de una prueba funcional que demuestre de una manera directa la citotoxicidad de los plasmas de mujeres con preeclampsia tanto cuando se emplea como suero total como las diferentes fracciones semi-purificadas representa una mejor aproximación para identificar a las moléculas responsables de generar daño endotelial, más que solo identificar una asociación entre los valores elevados presentes en el plasma de una determinada proteína pero sin que exista una prueba directa de su participación en la generación de la disfunción endotelial.

En este contexto en el presente trabajo intentamos caracterizar las diferencias que existen en los patrones protéicos en geles de doble dimensión de plasmas provenientes de mujeres que cursaron con embarazos normales y comparados con plasmas de mujeres con preeclampsia severa, tanto de plasmas completos como de aquellas fracciones obtenidas por purificación por isoelectroenfoque (ROTOFOR) y estimulando cultivos de células endoteliales de la línea HMEC-1 así como HUVEC's de embarazo normal y con preeclampsia, se observo el daño generado y se determino muerte celular e identificamos una proteína de 50Kdal con  $pH=2.6$  la cual hemos llamado P-E 50, esta proteína está altamente enriquecidas en dos primeras fracciones de nuestra separación, por lo que se secuenciará, sin embargo, el resto de las fracciones no tuvieron actividad para inducir apoptosis de forma aislada, quizás la combinación de algunas de estas fracciones se genere una estimulación secundaria para producir el daño celular.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gifford, R.W et. al. Cunningham, G, S.J. Report Of The National High Blood Pressure Education Program Working Group On High Blood Pressure In Pregnancy. *Am. J Obstet. Gynecol.* 2000; 83.
- 2.- Roberts J.M et. al. Summary Of The Nhlbi Working Group On Research On Hypertension During Pregnancy. *Hypertension.* 2003; 41:437-445.
- 3.- Easterling, T.R., Benedetti, T.J., Schmucker, B.C., Millard, S.P. Maternal Hemodynamic Normal And Preeclamptic Pregnancies: A Longitudinal Study. *Obstet. Gynecol.* 1990; 76:1061-1069.
- 6.- Conrad, K.P., Benyo, D.F. Placental Cytokines And The Pathogenesis Of Preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997; 37:240-249.
- 7.- Redman,C.W.G., Sargent, I.L. Placental Debris, Oxidative Stress Preeclampsia.*Placenta* 2000; 21:597-602.
- 8.- Roberts, J.M. Endothelial Dysfunction In Preeclampsia. *Semin Reprod. Endocrinol.* 1998; 5-15
- 9.- Bersinger. N.A. et al Preeclampsia Have Increased Serum Levels Of Pregnancy Associated Plasma Protein A (Papp-A), Inhibin A, Activin A And Soluble E-Selectin. *Hypertens. Pregnancy* 2003; 22:45-55.
- 10.- Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive Value Of Maternal Angiogenic Factors In Second Trimester Pregnancies With Abnormal Uterine Perfusion. *Hypertension.* 2007; 49:818-24.
- 11.- Venkatesha S, et al. Soluble Endoglin Contributes To The Pathogenesis Of Preeclampsia. *Nat Med.* 2006; 12:642-9.
- 12.- Guo B, et al. Cd105 (Endoglin), Apoptosis, And Stroke. *Stroke.* 2004; 35:E94-5
- 13.- Zhang, Y. et al : Increased Endothelial Monolayer Permeability Is Induced By Serum From Women With Preeclampsia But Not By Serum From Women With Normal Pregnancy Or That Are Not Pregnant. *Hypertens. Pregnancy* 2003; 22:99-108.
- 14.- Bernard, N., Giguere, Y.: Genetics Of Preeclampsia: What Are The Challenges *J. Obstet. Gynaecol.Can.* 2003; 25:578-585.
- 15.- Kanayama, N.: Trophoblastic Injury: New Etiological And Pathological Concept Of Preeclampsia. *Croat. Med. J.* 2003 44:148-156 .
- 16.- Myatt, L., Miodovnik, M. :Prediction Of Preeclampsia. *Semi. Perinatol.* 1999; 23:45–57.
- 16.- Broughton-Pipkin, F., Rubin, P. :Pre-Eclampsia: The “Disease Of Theories.” *Br. Med. Bull.* 1994; 50:381–396.
- 17.- Arechavaleta-Velasco, F., et al :Evidence Of Endothelial Cytotoxic Compounds In Placental Extracts From Preeclamptic Women. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2000; 7:114-117.

18.- Smarason, A.K. C.W.:Endothelial Cell Proliferation Is Suppressed By Plasma But Not Serum From Women With Preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996; 174:787-793.

19- Page, N.M., et al :Placental Peptides As Markers Of Gestational Disease. *Reproduction* 2002; 123:487-495.

20.- Austgulen; R. et al .: Increased Maternal Plasma Levels Of Soluble Adhesion Molecules (Icam-1, Vcam-1, E-Selectin) In Preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*1997; 71:53-58.

**Cronograma de actividades:**

Actividad	Mes					
		ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
Realización de protocolo de investigación	P					
	R					
Determinación de viabilidad por método de cristal violeta	P					
	R					
Determinación de apoptosis por traslocación de fosfatidilserina	P					
	R					
Determinación de apoptosis por medio de cascada de caspasas	P					
	R					
Separación electroforético por isoelectroenfoco de proteínas plasmáticas.	P					
	R					
Registro de protocolo de investigación	P					
	R					
Realización de informe final, abstract y cartel de resultados	P					
	R					

P: Programado R: Realizado