



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR EDUARDO LICEAGA"
CIENCIAS MÉDICAS

TÍTULO

EXPRESIÓN DE EXOSOMAS URINARIOS DEL COTRANSPORTADOR
 Na^+ : Cl^- ACTIVADO EN PREECLAMPSIA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

ELBA ONELIDA MEDINA HERNÁNDEZ

TUTOR

DRA. LUCIA MONSERRAT PÉREZ NAVARRO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR EDUARDO LICEAGA"

COMITÉ TUTOR

DRA. LORENA LEONOR ROJAS VEGA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN

DR. JESÚS CARLOS BRIONES GARDUÑO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR EDUARDO LICEAGA"

Ciudad Universitaria, CDMX a junio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se llevó a cabo gracias a la colaboración de estas 3 instituciones.



En el Servicio de ginecología y Obstetricia del Hospital y el servicio de Nefrología Unidad 105b del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".



En el laboratorio de Investigación de Metabolismo Mineral y Óseo del Hospital Infantil de México Federico Gómez.



En la Unidad de Fisiología Molecular perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas y localizado en el INCMNSZ.

Dra. Monserrat Pérez Navarro
Dr. Rafael Valdez Ortiz
Dr. Jesús Carlos Briones Garduño
Dr. Emmanuel Pérez Estévez

Dra. Mara Medeiros Domingo

Dra. Lorena Leonor Rojas Vega
Dra. Ivonne Hurtado
Dra. Fabiola Gallardo
Dra. Silvana Bazúa Valentí
Dr. Gerardo Gamba Ayala
Q.F.B. Norma Hilda Vázquez Díaz
Q.F.B. David Eduardo Meza Sánchez
Dra. Andrea Sánchez
Dra. Norma Bobadilla

Índice

pág.

Abreviaturas.....	3
1. Marco Teórico	4
1.1 Preeclampsia	
Estableciendo el diagnóstico de preeclampsia	
1.2 El sodio y el riñón: cotransportador renal de Na ⁺ : Cl ⁻ (NCC)	
Cotransportador sodio glucosa (SGLT2)	
Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ (NHE3)	
Cotransportador Na ⁺ : K ⁺ :2Cl ⁻ (NKCC2)	
Cotransportador Na ⁺ : Cl ⁻ (NCC)	
Canal epitelial de sodio (ENaC)	
1.3 Regulación hormonal de los cotransportadores	
1.4 Inhibidor de serin Proteasa 3	
HSP-72	
1.5 Exosomas	
2.0 Planteamiento del problema.....	23
2.1 Justificación.....	23
2.2 Hipótesis.....	24
2.3 Pregunta de investigación.....	24
2.4 Objetivos	24
2.5 Metodología	25
Tipo y diseño del estudio	
Cálculo de Tamaño de la muestra	
Análisis estadístico	
Aspectos éticos y de bioseguridad	
Criterios de Selección	
Procedimiento del estudio	
Procesamiento y almacenamiento de la muestra	
Extracción de exosomas urinarios	
3.0 Resultados.....	31
Características de la población basal	
Características de la población al mes de seguimiento	
Determinación de exosomas urinario	
Resultados un mes posterior a la resolución del embarazo	
Correlación de los transportadores de sal con parámetros químicos y bioquímicos	
4.0. Discusión.....	
5.0. Conclusiones.....	66
6.0 Referencias	

Abreviaturas

a. a	Aminoácidos
AAH	Asa ascendente de Henle
Ca²⁺	Calcio
CD	Conducto colector
Cl⁻	Cloro
CMVs	Cuerpos Multivesiculares
ER	Receptor de estrógenos
E2	Estradiol
ENaC	Canal de Na ⁺ epitelial sensible a amilorida
ESCRT	Complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte (ESCRT) por sus siglas en Ingles.
FeNa	Fracción excretada de sodio
FeBUN	Fracción excretada de urea
GPER	Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G
HCO₃⁻	Bicarbonato
HSP72	Proteína de choque térmico 72
HTA	Hipertensión arterial
K⁺	Potasio
mRNAs	Ácidos ribonucleicos mensajeros
miRNA	Micro ácido ribonucleico
Na⁺	Sodio
NCC	Cotransportador Na ⁺ : Cl ⁻ sensible a tiazidas
NHE3	Intercambiador de sodio-hidrógeno 3
pNCC	Cotransportador sodio-cloro activado o fosforilado
pNKCC2	Cotransportador sodio-potasio 2 cloros fosforilado o activado
PAM	Presión arterial media
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
SPAK	STE-20 proline-alanine-rich kinase
TP	Túbulo proximal
TCD o DCT	Túbulo contorneado distal
TFG	Tasa de Filtrado glomerular
W.B.	Western blot

1.1 PREECLAMPSIA

La preeclampsia, es una enfermedad multisistémica caracterizada por la presencia de hipertensión, proteinuria y/o disfunción a órganos-diana después de la semana 20 de gestación en una mujer embarazada previamente normotensa (1),(2) La condición complica cerca del 3-6% de los embarazos.(3),(4) La hipertensión (HTA) severa y signos/síntomas de daño a órgano blanco son considerados un espectro severo de la enfermedad (2).

La fisiopatología de la preeclampsia involucra tanto factores maternos como factores fetoplacentarios. La presencia de anomalías en el desarrollo de la vasculatura placentaria temprana es considerada una causa primaria de relativa perfusión baja, hipoxia, e isquemia, lo cual conduce a la liberación de numerosos factores dentro de la circulación materna que alteran la función endotelial sistémica materna, causando HTA y otras manifestaciones de la enfermedad. Aunque, el remodelado anormal de la arteria es ampliamente considerado como un rol crítico, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes permanecen desconocidos (5):(2):(1).

Estableciendo el diagnóstico de preeclampsia

El colegio americano de ginecología y obstétrica (ACOG por sus siglas en inglés), convocó a un grupo de trabajo de expertos en el manejo de hipertensión en el embarazo y en 2013 definió los criterios para el diagnóstico de preeclampsia severa (tabla 1).(2)

1.2 El sodio y el riñón: cotransportador renal de Na⁺: Cl⁻ (NCC)

Presión arterial sistólica ≥160 mmHg, o presión arterial diastólica de ≥ 110 mm Hg, Hipertensión puede ser confirmada en un intervalo corto (minutos) Y proteinuria Índice proteína/creatinina ≥ 0.3mg/dl.	O en ausencia de proteinuria, nuevo inicio de HTA con nuevo inicio de cualquiera de las siguientes: - Trombocitopenia (<100,000/microlitros) - Alteración funcionamiento hepático: concentraciones elevadas de enzimas hepáticas (2 veces la concentración normal) - Insuficiencia Renal (Creatinina sérica >1.1mg/d) o el doble de la concentración de creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal) - Edema pulmonar - Síntomas cerebrales o visuales
---	--

El edema generalizado es una manifestación común de preeclampsia, las pacientes con proteinuria muestran una retención ávida de sodio, lo cual ocurre a pesar de una supresión del eje renina angiotensina aldosterona y contracción intravascular(6).

Los riñones ayudan a mantener el volumen del líquido extracelular regulando la cantidad de sodio (Na^+) en la orina. El catión Na^+ tiene una concentración en plasmática de 135-145mmol/l, es el electrolito de mayor concentración en sangre, lo que lo hace el principal determinante del volumen, así como, la osmolaridad del líquido extracelular y por lo tanto de la presión arterial, de este modo donde va el sodio, le sigue el agua(7) .

A lo largo de la nefrona se ubican transportadores de sal, los cuales regulan la entrada y salida de sal del cuerpo. (Figura 1) Después de la filtración por el glomérulo, la recuperación de sodio en el volumen extracelular requiere el movimiento a través de las células epiteliales del riñón, lo cual implica transporte secuencial a través de la superficie apical y basolateral (8),(9).

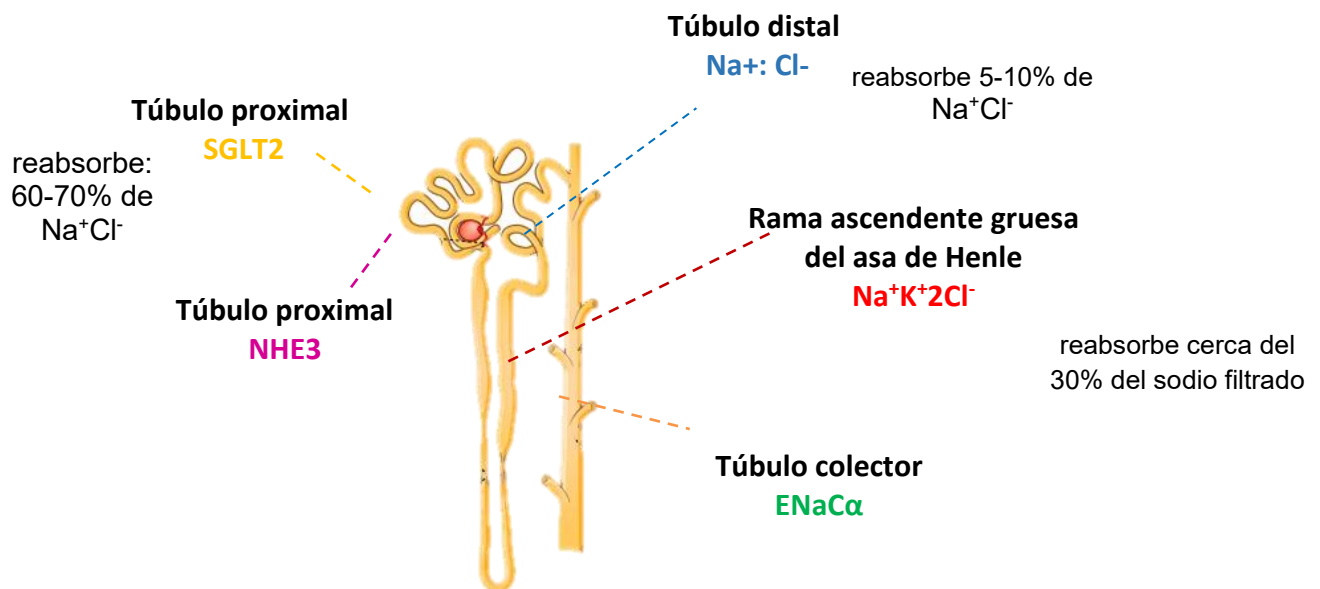


Figura 1. Transportadores de sal a lo largo de la nefrona. En el túbulo proximal el intercambiador de sodio-bicarbonato (NHE3) y el cotransportador Na^+ : glucosa tipo II (SGLT2), reabsorben del 60-70% del sodio filtrado. En el asa de Henle el cotransportador sodio: potasio 2 cloros ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}$) reabsorbe

cerca del 30% del sodio filtrado, mientras que la nefrona distal se reabsorbe de un 5-10% por el cotransportador Na^+ : Cl^- (NCC) y el canal epitelial de sodio (EnaCa).

Cotransportador sodio glucosa (SGLT2)

El cotransportador sodio glucosa o también llamado SGLT2 esta codificado por el gen *SLC5A2*, el cotransportador se ubica en los segmentos S_1 y S_2 de la membrana apical del túbulo proximal y también es localizado en la rama ascendente del asa de Henle, pero su función en este segmento es aún desconocida. La función principal del cotransportador SGLT2 es la reabsorción de glucosa; mediante una relación 1:1 de sodio-glucosa **Figura 2.**(10)

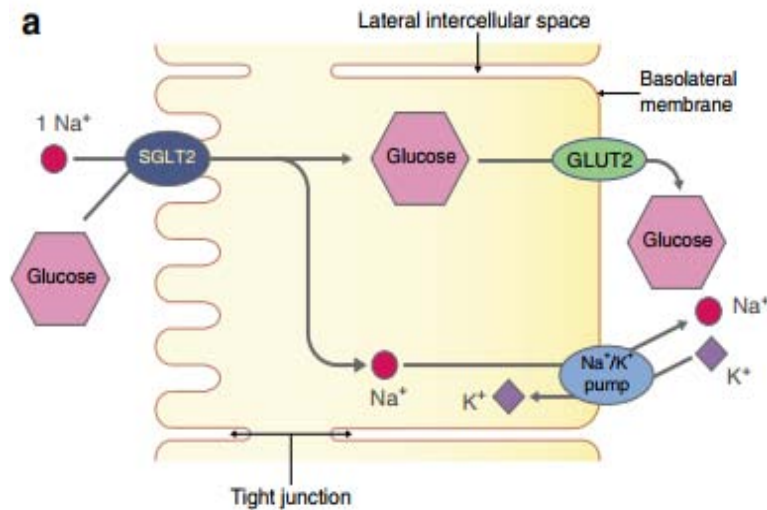


Figura 2. Reabsorción de glucosa en el túbulo proximal. Las células epiteliales de los segmentos S_1 y S_2 del túbulo proximal expresan SGLT2 sobre la membrana apical y GLUT2 sobre la membrana basolateral. En el segmento S_1 y S_2 la reabsorción de glucosa ocurre, la primera vía de transporte cruza la membrana apical por SGLT2 y entonces la salida pasiva de glucosa sale hacia el plasma vía GLUT2. El gradiente de sodio que cruza la membrana apical es mantenido por la bomba Na^+/K^+ basolateral. El índice de acoplamiento sodio: glucosa es de 1:1 a una concentración extracelular de Na^+Cl^- de 150mmol/l (10)

Intercambiador de Na⁺/H⁺ (NHE3)

NHE3 el intercambiador de Na⁺:H⁺ apical, es codificado en el humano por el gen *SLC9A3* sirve tanto en la reabsorción de Na⁺Cl⁻ como NaHCO₃ en el túbulo proximal. Figura 3. Las adaptaciones de la actividad del antiporter Na⁺-H⁺ ha sido descrito en un número de condiciones crónica, incluyendo acidosis metabólica crónica y acidosis respiratoria, deficiencia de potasio e hiperfiltración glomerular. Un incremento similar en la actividad antiporter de Na⁺-H⁺ podría ser responsable del incremento en la reabsorción Na⁺Cl⁻ vista en depleción crónica Na⁺Cl⁻ y el incremento en la reabsorción de NaHCO₃ vista en alcalosis metabólica crónica con contracción del volumen extravascular(11)

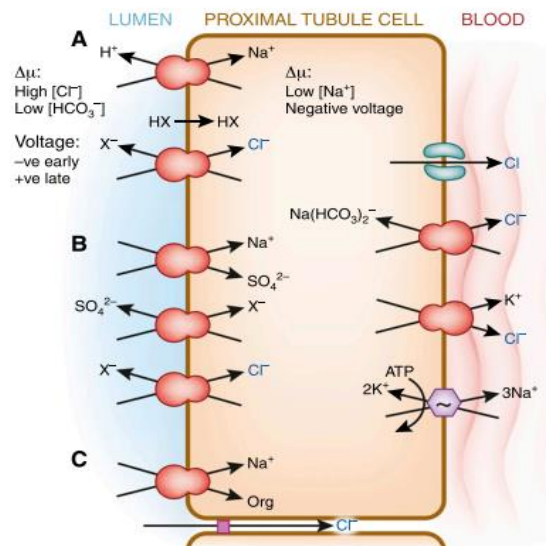


Figura 3. Reabsorción de Na⁺Cl⁻ en el túbulo proximal. A diferencia de la extremidad ascendente gruesa o el túbulo contorneado distal, no hay transportadores dedicados de "Na⁺Cl⁻" en el túbulo proximal. El túbulo proximal usa arreglos paralelos de simportes y antiporters para afectar la entrada de Na⁺Cl⁻. A. Intercambiador paralelo Na⁺/H⁺ (NHE3) y el intercambiador Cl⁻/base- (CFEX) con reciclaje de un conjugado ácido HX resultando en una entrada de Na⁺Cl⁻ neta. B. Triple mecanismo de acoplamiento donde el cotransportador Na-sulfato (NaS-1) corre en paralelo con 2 intercambiadores de aniones para lograr el cotransporte Na⁺Cl⁻. C. Na⁺ acoplado al transporte de solutos orgánicos con transporte paracelular simultáneo de Cl⁻ manejado por el lumen al espacio intersticial gradiente químico cuesta abajo de Cl⁻. (11)

Cotransportador $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (NKCC2)

El cotransportador NKCC2 está codificado por el gen *SLC12A1*, pertenece a la familia de proteínas de membrana plasmática que median la simetría electroneutral de Na^+ , K^+ y Cl^- con una estequiometría 1:1:2 respectivamente en la membrana apical, por lo que el mecanismo de transporte adicional es necesario para balancear el transporte de Na^+ con una salida del doble de la cantidad de Cl^- en la membrana basolateral (**Figura 4**)(12):(13).

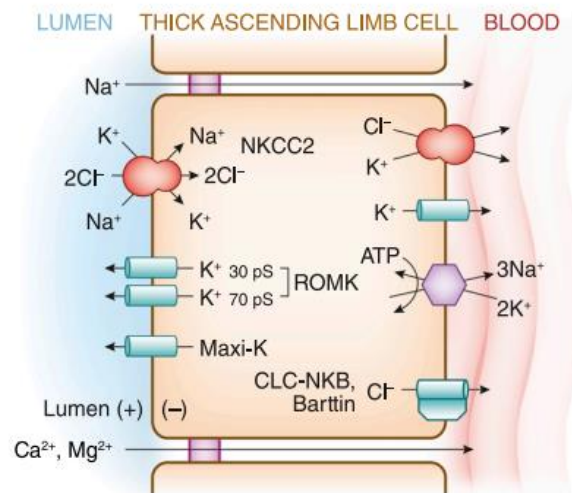


Figura 4. Vías de transporte transepitelial de cloro.

NKCC2 es exquisitamente sensible a furosemida un diurético de “asa” que inhibe el transporte transepitelial de Cl^- por la rama ascendente gruesa del asa de Henle; también se le llama cotransportador sensible a bumetanida 1 (BSC-1).(14):(15)

NKCC2 es expresado a lo largo de rama ascendente gruesa del asa de Henle, en las células R y S y las células de la mácula densa en donde sensa la concentración de Cl^- luminal e inicia la señal para la regulación túbulo-glomerular y la liberación de renina; por lo tanto, controla el tono arteriolar aferente y la tasa de filtración glomerular.

Este transportador generalmente requiere la presencia simultánea de los tres iones, de modo que el transporte de Na^+ y Cl^- a través el epitelio sea mutuamente dependiente y codependiente de la presencia luminal de K^+ (13)

Aunque NKCC2 es codificado por un único gen (*Slc12a1*), un empalme diferencial del RNA mensajero de NKCC2 resulta en la formación de transcritos alternos. La combinación de dos transcritos independientes producen al menos 6 isoformas de NKCC2 mostrando expresión especie-específica. El primer transcrito produce las isoformas A, B y F, las cuales difieren en su localización a lo largo de la rama ascendente gruesa del asa de Henle y en sus características de transporte de iones (afinidad iónica para Na^+ , K^+ , y Cl^-). La isoforma NKCC2A tiene afinidad intermedia para el Cl^- y es localizada en la rama ascendente gruesa medular y cortical, aunque es más abundante en la corteza. La isoforma B muestra alta afinidad por Cl^- y es localizada en las células de la mácula densa y porción cortical. La isoforma F tiene la más baja afinidad para transportar iones y es localizado principalmente en la región medular.(14),(16)

Estructuralmente el cotransportador NKCC2 tiene 12 dominios transmembrana, así como 2 sitios de glucosilación localizados entre los dominios transmembrana 7 y 8, lo cual confiere masa molecular aparente de 160 KDa, cuando es detectado por western blot. **(Figura 5)**(16)

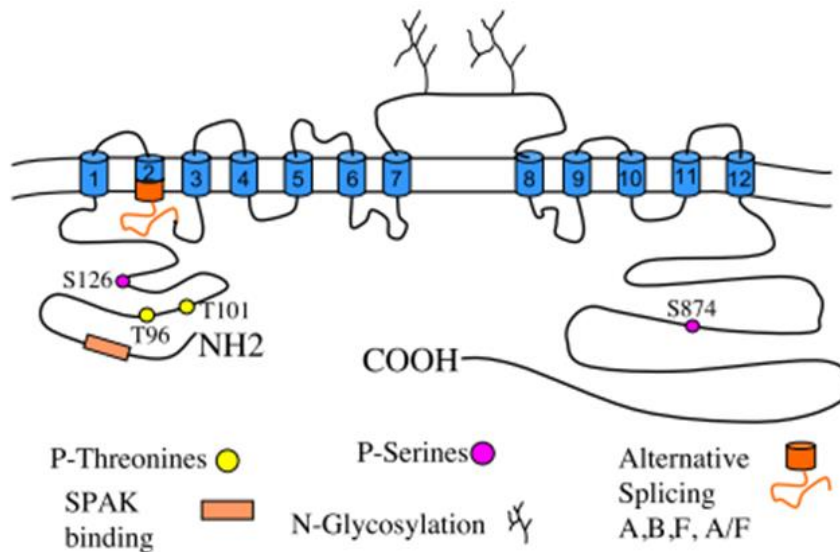


Figura 5. Estructura esquemática de la proteína $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2), destacando los sitios de fosforilación establecidos (secuencia de rata) y algunas de las interacciones proteína-proteína identificadas hasta la fecha.(16)

Cotransportador Na⁺: Cl⁻ (NCC)

En la parte inicial del túbulo contorneado distal de la nefrona (también llamado TCD1), se encuentra localizado el cotransportador sodio-cloro sensible a tiazidas (NCC).(13) Únicamente 5-10% de la carga filtrada de sodio es reabsorbido en el TCD, es un proceso transcelular impulsado por la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa, la cual saca Na⁺ hacia el espacio extracelular generando un gradiente de concentración que favorece la entrada de Na⁺ por la membrana apical a través de dos diferentes vías: el cotransportador electroneutro NCC y ENaC que reabsorbe Na⁺ de manera electrogénica. Esto es posible porque no es afectado por la retroalimentación túbuloglomerular. Debido a esta propiedad, NCC juega un rol pivote en el volumen del líquido extracelular y el control de la presión sanguínea (13),(17)

El NCC, también conocido como cotransportador SLC12A3, es una proteína de membrana que pertenece a la familia de transportadores SLC12 cloro-catiónicos (14). Tiene un dominio hidrofóbico central que contiene 12 regiones transmembranales (TM 1-12) interconectadas por seis asas extracelulares y cinco asas intracelulares. El segmento de interconexión más largo está entre la región TM 7 y 8, el cual está glucosilado, por lo que se presume que ve al lado extracelular, tiene un dominio N-Terminal y C-terminal, así como sitios de fosforilación (figura 6).(18)

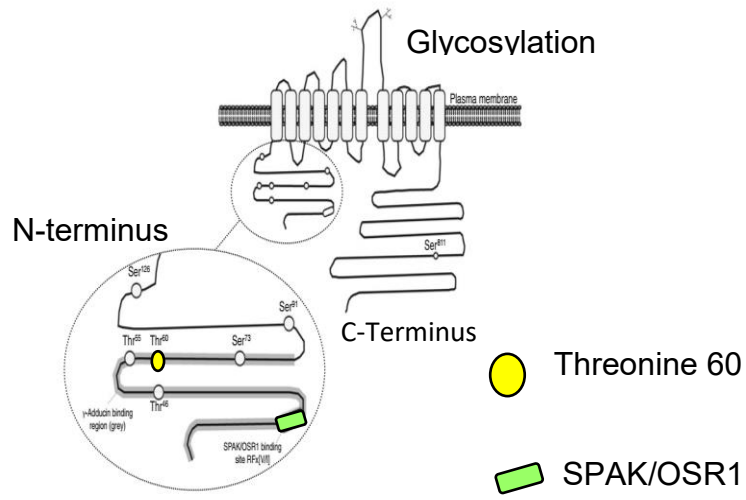


Figura 6: Estructura del cotransportador sodio-cloro, con 12 dominios transmembrana, en donde se observa los sitios de fosforilación. Modificado de Moes A.D., Van Der Lubbe N, Zietse R, Loffing J, Hoorn EJ. The sodium chloride cotransporter SLC12A3: New roles in sodium, potassium, and blood pressure regulation. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2014;466(1):107-118. doi:10.1007/s00424-013-1407-9

Canal epitelial de sodio (ENaC)

El canal epitelial de sodio (ENaC) está compuesto de 3 subunidades homólogas y permite el flujo del ion Na^+ a través de epitelios de alta resistencia, manteniendo la homeostasis de sal y agua. Las subunidades que forman ENaC llamadas como alfa, beta, gamma son miembros de la superfamilia ENaC/Degenerina(13). y están codificados por los genes *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G*, para cada subunidad respectivamente.(19)

ENaC media la entrada apical de Na^+ dentro de las células principales y constituye el paso limitante para el transporte transepitelial de Na^+ en la nefrona distal sensible a aldosterona. Este cotransportador se expresa a lo largo del túbulo contorneado distal en el segmento DCT2 en donde el movimiento de los iones Na^+ sin un ion acompañante conduce a una carga negativa en el lumen, también es expresado en el túbulo conector y conducto colector por lo que el voltaje transepitelial se convierte progresivamente más negativo en el lumen(13) (Figura 7).

Este gradiente negativo sirve como fuerza motriz para el transporte de cloro dentro del espacio peritubular a través de mecanismos paracelular, y también incrementa el gradiente para la secreción de K^+ , vía canales de K^+ tal como ROMK (expresado en las células principales) y canales BK (expresado en las células principales y las células intercaladas)(13)

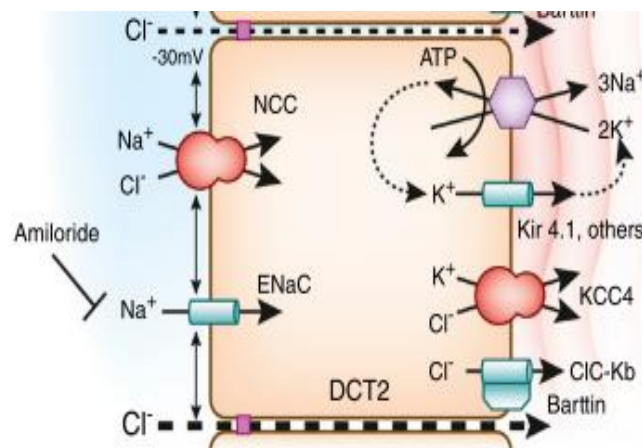


Figura 7. Un modelo de reabsorción de Na^+Cl^- por las células del Túbulo contorneado distal porción DCT2. Tomado de: Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan O.B., Deen P.D and DEK, *Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation*. 2015. Clin J Am Soc Nephrol 10: 135–146, 2015. doi: 10.2215/CJN.05760513

1.3 Regulación hormonal de los cotransportadores

Cotransportador NKCC2

Las diferencias en la capacidad de concentración y manejo del sodio han sido notorias en humanos y roedores(20), así como entre hembras y machos. Varias hormonas son responsables de la exactitud en el control de sodio, disparando la cascada de señalización que regula la actividad de NKCC2.(21)Al estudiar esta regulación hormonal se encontraron receptores a estrógenos y progesterona a nivel renal.

Musselman et al., en 2010, condujeron un estudio para determinar como el sexo y la ovariectomía con o sin suplementación con 17- β estradiol y progesterona en ratas, influyen en la abundancia y distribución de NKCC2 en la rama ascendente gruesa del asa de Henle (Figura 8, 9 y 10) en ratas macho intactas, ratas hembras intactas, y ratas hembras ovariectomizadas a las que se les implantó 17- β estradiol de liberación prolongada 2.5ug/día y a los 7 días se evaluaron los cambios en NKCC2 en tejido renal (riñón completo, corteza y médula) mediante western blot. Encontrando que la suplementación con 17- β estradiol en ratas ovariectomizadas incrementó la expresión de la proteína NKCC2 en aproximadamente 30% en el riñón completo, pero no alteró los niveles en la corteza e incrementó la expresión de NKCC2 un 65% en la médula externa, además las ratas machos y las ratas hembras ovariectomizadas tuvieron una concentración similar de niveles de NKCC2 en médula externa y la suplementación con 17- β estradiol en hembras ovariectomizadas elevó NKCC2 en la médula externa. (20)

Uno de los aspectos importantes que concluye, es que la influencia de las hormonas ováricas sobre la abundancia de NKCC en la médula juega un importante rol en establecer el gradiente de concentración medular, por lo tanto, regular la excreción de agua vía el mecanismo de contracorriente. Además, participa en la dilución del fluido tubular que se presenta en el túbulo distal y en el conducto colector.

Los datos de inmunohistoquímica mostraron que NKCC2 está principalmente en la membrana apical en machos, hembras intactas y hembras ovariectomizadas con o sin suplementación de

17- β estradiol y se confirmó por análisis por western blot que los machos y las hembras ovariectomizadas tuvieron menos marcaje de NKCC2 en la médula externa comparado con hembras intactas o hembras con suplementación de 17- β estradiol.(20)

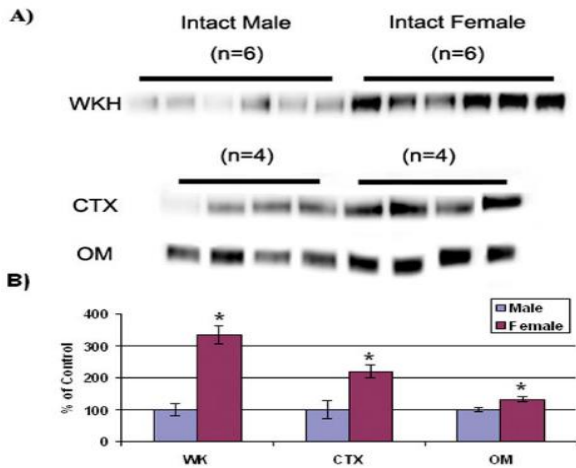


Figura 8. Western blot semicuantitativo mostrando las diferencias en la abundancia de

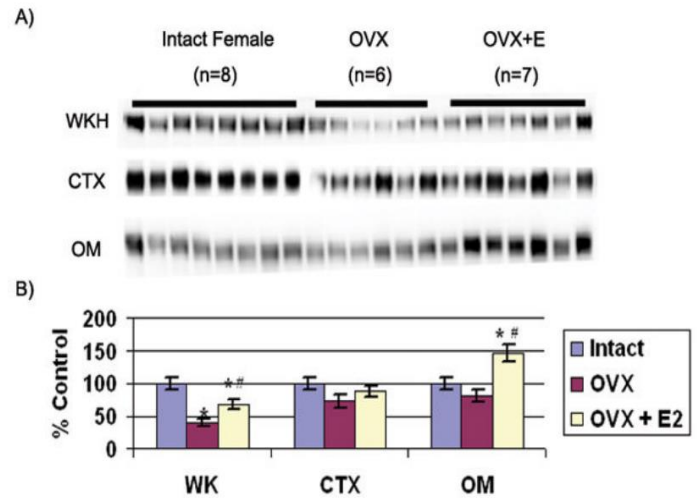


Figura 9. Western blot semicuantitativo mostrando los efectos de 17- β estradiol sobre la abundancia de NKCC2.

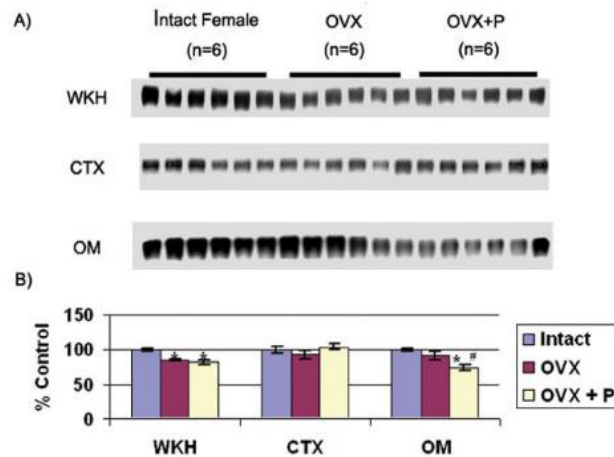


Figura 10. Western blot semicuantitativo mostrando los efectos de progesterona sobre la abundancia de NKCC2. Por sus siglas en inglés: Whole kidney (WKH), cortex (CTX), inner stripe of the outer medulla (OM).

Regulación Hormonal de NCC

Se conoce que la expresión/actividad de NCC es afectada por dos mecanismos postranslacionales: fosforilación por la cinasa SPAK en el dominio amino-terminal la cual es modulada por WNKs “With no lysine kinases” y la ubiquitilación por un efecto directo del complejo de ubiquitina ligasa E3 de tipo HECT- Nedd4-2, que reduce la cantidad o actividad de NCC en la membrana plasmática o un efecto indirecto del complejo ubiquitin ligasa tipo-RING, KLHL3 y Cul3 que modula la ubiquitilación de WNKs.(22)

Existe evidencia de que los estrógenos, progesterona y prolactina, hormonas involucradas en el ciclo sexual, embarazo y lactancia, regulan la expresión y la fosforilación de NCC. En el túbulo contorneado distal en la membrana basolateral y a nivel nuclear se encuentran receptores a diversas hormonas, entre ellas las hormonas femeninas (figura 11) (21).

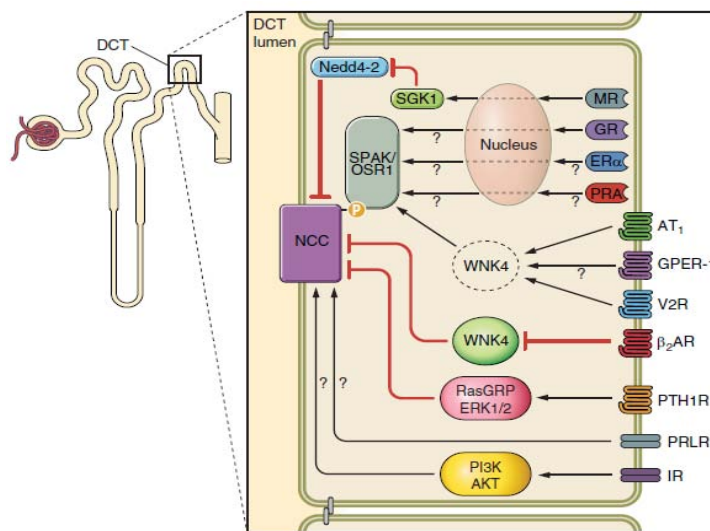


Figura 11. Túbulo contorneado distal segmento 2, con todas las hormonas que regulan el cotransportador Na⁺: Cl⁻. Los receptores de hormonas están localizados en la membrana basolateral. PLRL receptor de prolactina por sus siglas en inglés, PRA: Receptor de progesterona A: GPER-1, proteína G receptor de estrógenos; ER-α, receptor de estrógenos α. IR, receptor de insulina, GR, receptor glucocorticoide; AT1, receptor de angiotensina; receptor mineralocorticoide.(23)

Rojas-Vega et al., 2015, demuestra que la expresión-fosforilación de NCC son mayores en hembras que en machos en ratas, ratones y humanos y que la fosforilación de NCC es promovida por estrógenos, progesterona y prolactina. Al comparar la expresión de NCC entre

ratas hembras y macho se encontró que las ratas hembra tienen aumento en la expresión (Figura 12) de igual forma sucede en los ratones hembra y macho (Figura 13). Al realizar la ovariectomía en ratas da como resultado la disminución de la expresión y fosforilación del cotransportador (Figura 14), mientras que al administrar estrógenos a ratas macho mostró un incremento significativo en la fosforilación de NCC (Figura 15), dichos resultados fueron hallados también en humanos al cuantificar exosomas urinarios de mujeres y hombres por análisis de Western Blot. (Figura 16)(24)

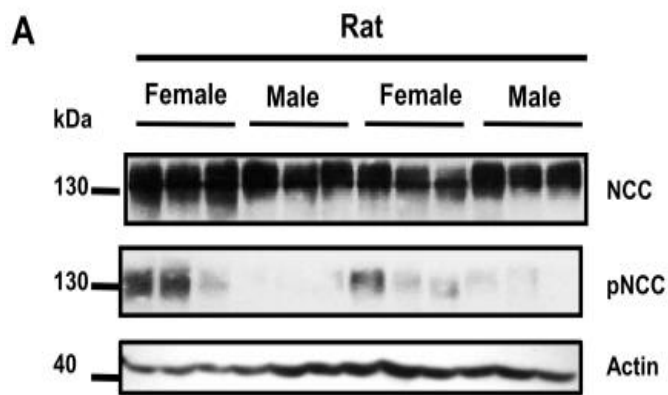


Figura 12. Las ratas hembra tienen mayor expresión y fosforilación de NCC en sitio treonina 58 en análisis de W.B.

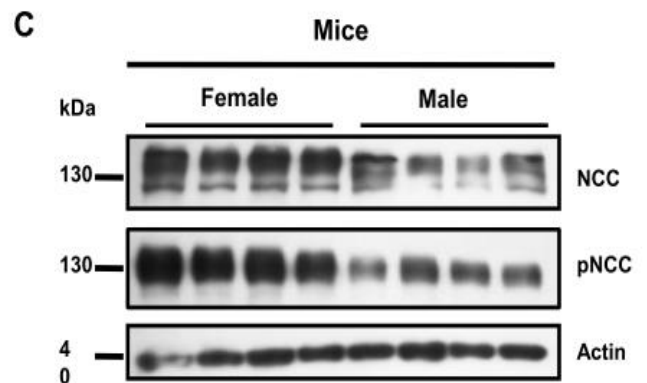


Figura 13 Análisis de W.B de la expresión/fosforilación de NCC en sitio treonina 58, en riñones completos de ratones hembra y macho. Se observa que los ratones hembra tienen mayor expresión y fosforilación.

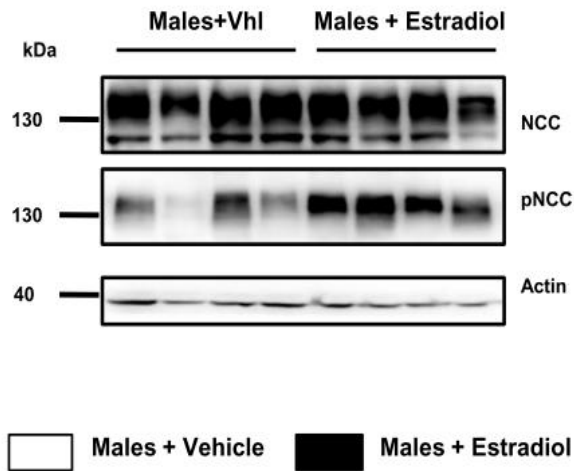


Figura 14. Análisis de la expresión y fosforilación de NCC (sitio Treonina 58) de ratas hembras controles y ovariectomizadas. Las hormonas ováricas regulan la fosforilación.

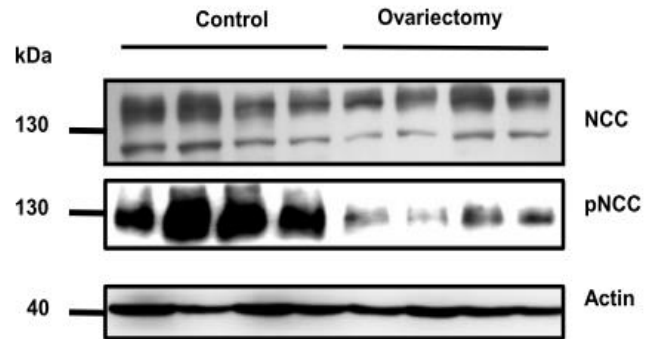


Figura 15. Análisis de la expresión y fosforilación de NCC (sitio Treonina 58) de ratas macho a la administración exógena de estradiol.

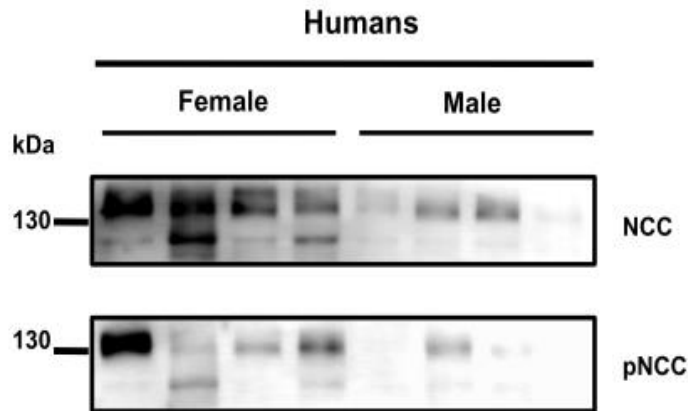


Figura 16. Análisis de la expresión y fosforilación de NCC en exosomas urinarios de mujeres y hombres, normalizados por la creatinina urinaria. Las mujeres tienen mayor expresión y fosforilación de NCC.

1.4

Inhibidor de serin Proteasa 3

GEN SERPINE (inhibidor de serin proteasa o cisteína), fue primero identificado un inhibidor específico de la calicreina tisular y por lo tanto fue llamada proteína de unión a calicreina. La calicreina tisular es una serin proteasa y libera cininas de cininógenos. El sistema calicreina-cinasa tiene una importante función en la inflamación, regulación de la presión sanguínea, generando dolor y alergia. Serpina3k específicamente se une a la calicreina tisular, formando un enlace covalente e inhibe la actividad proteolítica de la calicreina tisular. Serpina3K participa en la regulación de la vasodilatación y el flujo sanguíneo local vía interacción con el sistema calicreina-cinina. Serpina 3k se ha encontrado que inhibe la angiogénesis y reduce la permeabilidad vascular. SERPINA3K es expresada en altas concentraciones en el hígado y bajos niveles en otros tejidos, tal como el riñón, páncreas y retina. SERPINA3k se ha estudiado en pacientes con diabetes y daño retiniano demostrando que la SERPINA3K es una serpina endógena la cual protege a la célula del estrés oxidativo de la muerte celular y su efecto protector es vía bloqueo de la sobrecarga de calcio a través de la vía de la fosfolipasa C.(25)

HSP-72

Proteína de Choque térmico 72 (HSP-72) es uno de los patrones moleculares asociados a daño, liberado en respuesta a la exposición de estresantes y activa potentemente el inflamósoma. La familia HSP70 es la proteína de choque térmico más abundante en las células.(26)

HSP72 pertenece a la familia de HSP70 que funciona como una molécula chaperona en el plegamiento de proteínas, transporte y degradación. Sin embargo, el efecto citoprotector de HSP72 está relacionado con la capacidad para inhibir la apoptosis e inhibir la síntesis de citosinas proinflamatorias. Se ha documentado que HSP72 urinario es un buen marcador para la pérdida de la integridad de las células tubulares.(27),(28)

El incremento en la expresión de esta proteína incrementa bruscamente en daño celular que ha sido encontrado en muchos estudios de daño renal isquémico y tóxico por lo que se utiliza como biomarcador(29)

1.5 Exosomas

Las vesículas extracelulares son una población heterogénea y dinámica de vesículas unidas a membrana, su contenido y su composición de membrana no únicamente depende de la fuente celular si no también son sensibles al estrés y a los cambios del medio ambiente. Se conocen como vesículas extracelulares a los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos(30) (Figura 17).

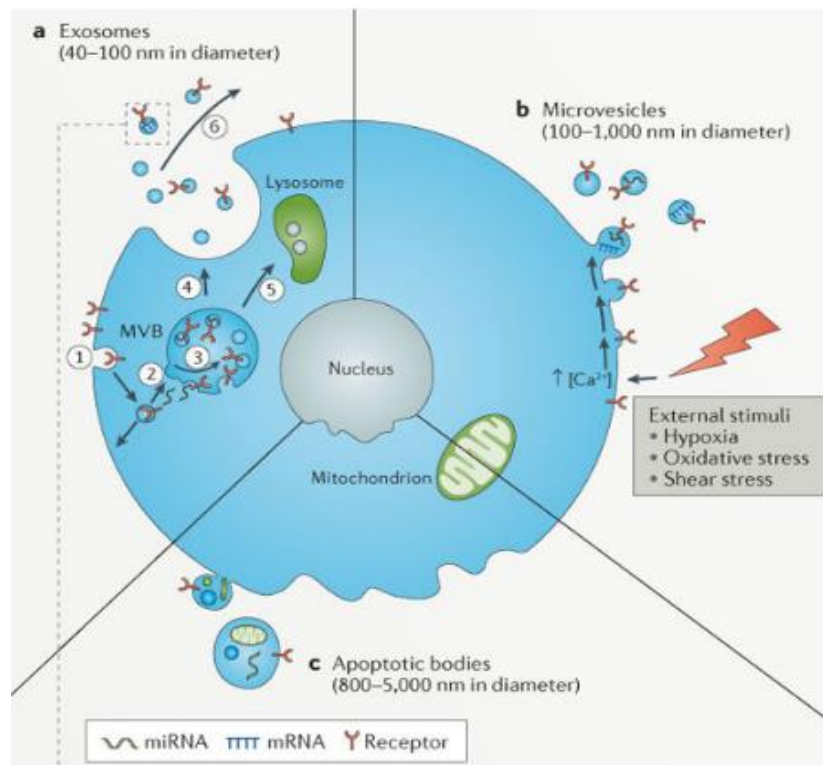


Figura 17. Mecanismos de formación de vesículas extracelulares urinarias regulan su composición. **a)** paso 1 formación de exosomas, proteínas de membrana son internalizadas (endocitadas) por células, resultando en la formación de endosomas tempranos. A medida que estos endosomas maduran en endosomas tardíos (paso2), la invaginación de su membrana delimitadora produce vesículas intraluminales, por proceso regulado por cuatro complejos de clasificación endosomal distintos requeridos para el transporte (paso 3); estos endosomas tardíos que contienen vesículas intraluminales se denominan cuerpos multivesiculares CMVs. Los CMVs se pueden fusionar con la membrana plasmática, lo que resulta en la liberación de vesículas intraluminales (paso 4), que ahora

se denominan exosomas. Alternativamente, los CMVs pueden fusionarse con los lisosomas, lo que resulta en la degradación de los contenidos del CMVs (paso 5). Los exosomas pueden participar en los eventos de señalización molecular después de su liberación en el espacio urinario o en el espacio intersticial parenquimatoso (paso 6) **b)** Las micro vesículas, son vesículas grandes de dos capas de 100 a 1000 nm de diámetro que contienen lípidos y proteínas de la membrana plasmática, y lípidos, proteínas y ácidos nucleicos citoplásmicos. Las microvesículas se forman cuando un estímulo (por ejemplo, hipoxia, estrés oxidativo o fuerza de cizallamiento) impulsa eventos intracelulares como los mediados por las proteínas de unión a Calcio o fosfolípidos, que causan el desprendimiento y la liberación de microvesículas de la membrana plasmática **c)** los cuerpos apoptóticos son grandes vesículas con doble capa lipídica de 800 a 5,000 nm de diámetro son altamente heterogéneos en tamaño y composición. La membrana delimitadora de cuerpos apoptóticos contiene lípidos y proteínas derivados de la membrana plasmática y contiene material citoplásmico que incluye proteínas orgánicas específicas (por ejemplo, las del núcleo, las mitocondrias, etc.), ácidos nucleicos y lípidos (30)

Los exosomas son generados de los cuerpos multivesiculares (Figura 17) los cuales contienen vesículas intraluminales. Las vesículas intraluminales están formadas por componentes del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, que consiste en una doble capa limitante lipídica, proteínas transmembrana y un núcleo hidrofílico que contiene proteínas, mRNAs, micro RNAs, RNA sin codificar y factores de transcripción, contienen un set definido de proteínas las cuales varían acorde a la célula de origen (Figura 18). Los exosomas están definidos por su tamaño, el rango es de 30 a 100nm (aunque tamaños arriba de 150nm han sido reportados dependiendo de la técnica usada), los exosomas son liberados dentro del medio ambiente extracelular por muchas células de diferentes tejidos y órganos. A nivel renal los exosomas urinarios son liberados de las células del epitelio renal, incluyendo podocitos, células del túbulo renal y células del epitelio transicional siendo la orina la muestra biológica ideal para su aislamiento e identificación. (31)

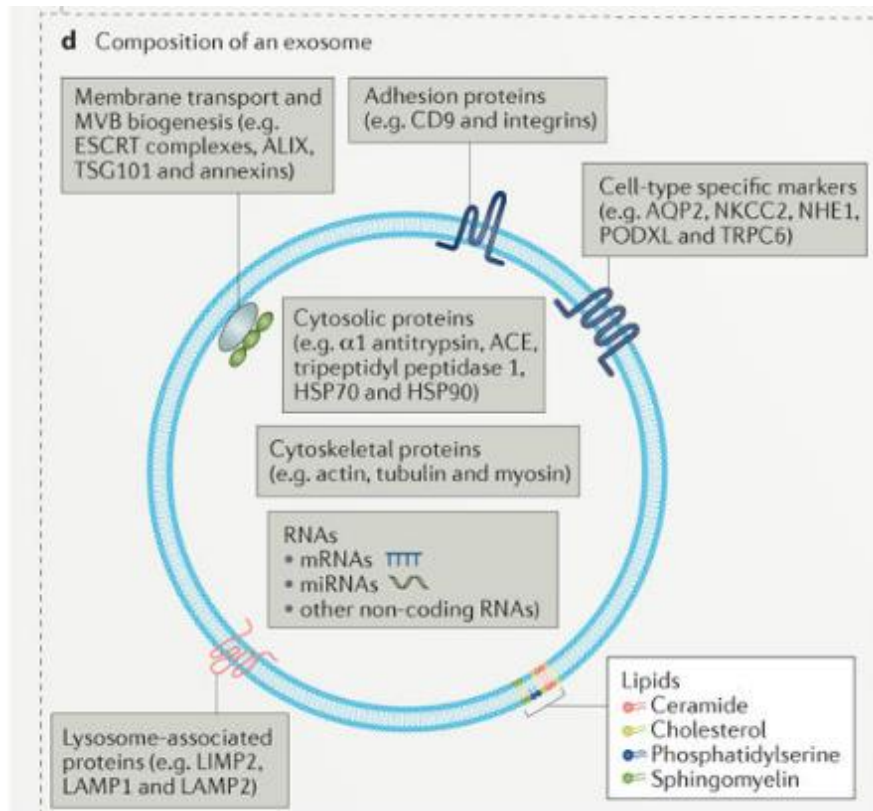


Figura 18. Composición de un exosoma. Los exosomas contienen lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, algunos de los cuales son únicos para el tipo de célula del que se forman los exosomas. Los fosfolípidos y esteroides, como la ceramida, la esfingomiélin, la fosfatidilserina y el colesterol son importantes para los aspectos mecanicistas y biofísicos de la formación de bicapas, la curvatura y la fluidez, que afectan la fusión de la membrana. La membrana de las vesículas extracelulares urinarias también contiene proteínas integrales de la membrana y proteínas asociadas a la membrana, como las proteínas de adhesión (CD9 e integrinas), las proteínas de transporte y/o fusión de la membrana y proteínas involucradas en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares (proteínas ESCRT, proteína X que interactúa con ALG2, proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101) y anexinas, proteínas lisosómicas (proteína de membrana de lisosoma 2) y (proteína de membrana asociada a lisosoma 1 (LAMP1) Y (LAMP2), mientras que el lumen contiene proteínas solubles como la antitripsina alfa 1, la enzima convertidora de angiotensina, la tripeptidil peptidasa 1, las proteínas de choque térmico HSP70 Y 90), y las proteínas del citoesqueleto (como la actina, la tubulina y la miosina)(30)

2.0 Planteamiento del problema

La preeclampsia es una enfermedad hipertensiva específica del embarazo afecta entre un 3 a 6% de los embarazos en el mundo, con una alta morbilidad y mortalidad perinatal para la madre y el feto. Los factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia son múltiples, no siendo prevenible el desarrollo de esta entidad, por lo que el conocimiento de su fisiopatología y factores involucrados en el desarrollo es primordial.

La preeclampsia es definida y clasificada por las cifras de presión arterial elevada en presencia de daño en otros órganos; el desarrollo de hipertensión arterial es una parte crucial de este síndrome materno, dentro de su fisiopatología se ha estudiado el involucro del sistema renina angiotensina aldosterona, el desarrollo de autoanticuerpos contra el receptor de angiotensina y la vía de factores antiangiogénicos, sin embargo el papel que juega el riñón en el control de la presión arterial regulando la reabsorción de sal y agua no se ha estudiado.

La evidencia creciente indica un mayor riesgo de efectos adversos a largo plazo para la salud en mujeres afectadas por la preeclampsia entre ellos se encuentran el desarrollo de hipertensión arterial, isquemia cardiaca, enfermedad vascular cerebral y el desarrollo de enfermedad renal crónica.

2.1 Justificación

Las vías fisiopatológicas de la preeclampsia son múltiples; a pesar de que los cotransportadores de sodio tienen una participación directa con la reabsorción de sodio y con ello en el desarrollo de hipertensión arterial, se desconoce en el embarazo la participación del cotransportador NCC con el desarrollo de preeclampsia

Datos experimentales muestran que la expresión y actividad de NCC es modulada por hormonas femeninas, por lo que el cambio hormonal producido por el embarazo podría contribuir a un incremento en la expresión y actividad de NCC y en consecuencia un aumento en la retención de sodio y agua, contribuyendo en el desarrollo de hipertensión en preeclampsia.

Por lo que el estudio de los cotransportadores activados ayudaría a esclarecer nuevas rutas fisiopatológicas, que a la larga podrían sugerir nuevos blancos terapéuticos que se puedan utilizar durante el embarazo y disminuir la morbimortalidad materna

2.2 Hipótesis

Si, la preeclampsia se encuentra asociada al incremento de expresión del NCC activado, y esté a la mayor concentración sérica de estrógeno, progesterona y prolactina, entonces, las mujeres con preeclampsia presentaran una expresión $\geq 30\%$ de NCC activado y $\geq 30\%$ en las concentraciones séricas de hormonas femeninas en comparación con embarazadas sin preeclampsia.

2.3 Pregunta de investigación

¿Cómo es la expresión del cotransportador NCC activado y los niveles de hormonas progesterona-estrógeno y prolactina en pacientes con preeclampsia?

2.4 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la presencia del cotransportador NCC sodio-cloro sensible a tiazidas en exosomas urinarios de mujeres con preeclampsia severa en comparación con mujeres embarazadas sanas en el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

Objetivos específicos

Evaluar el grado de correlación entre la expresión del cotransportador NCC y NKCC2 con los niveles de hormonas ováricas y prolactina en mujeres embarazadas sanas y con preeclampsia severa.

Correlacionar la expresión de NCC y NKCC2 con las cifras de tensión arterial, electrolitos séricos y urinarios.

2.5 Metodología

Tipo y diseño del estudio

Se trata de un estudio unicéntrico, prospectivo, longitudinal, descriptivo y observacional. Se realizaron dos mediciones la primera al momento del diagnóstico de preeclampsia y la segunda 1 mes posterior a la resolución del embarazo.

Cálculo de Tamaño de la muestra

El cálculo de tamaño de la muestra se realizó con base a un estudio piloto realizado en el año 2016 (Medina E. et al. Expresión de exosomas urinarios del cotransportador NCC activado en pacientes con preeclampsia, proyecto de tesis para obtener el grado de especialista en nefrología, 2016).

Se utilizó el programa estadístico G Power, considerando que en el estudio previo el tamaño del efecto obtenido fue de 0.8 d-Cohen y lo que corresponde a una f de 0.4 p. Se empleó un test de f para MANOVA, considerando mediciones repetidas (dos) con una correlación entre mediciones de 0.33, con dos grupos de análisis, un intervalo de confianza al 95% y un valor de $p \leq 0.05$ (figura 19)

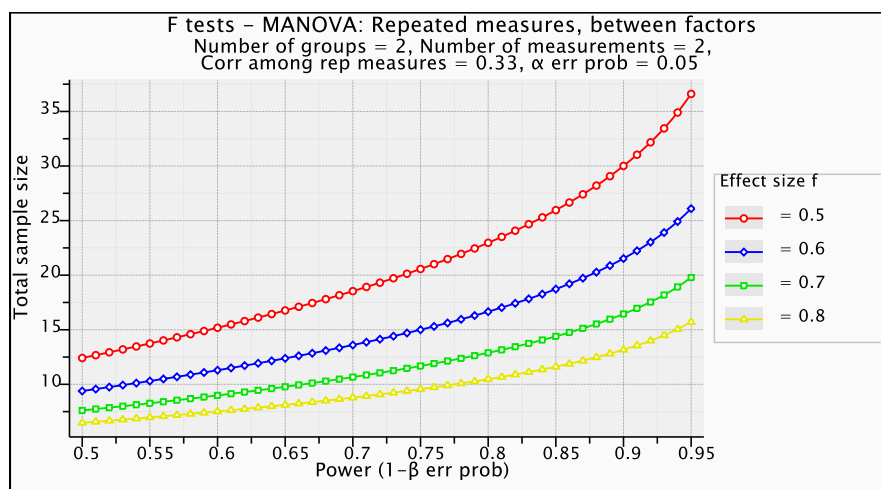


Figura 19. GPower Plot

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos se analizaron en el paquete estadístico SPSS 22.0. De acuerdo al tipo de variables se obtuvieron medidas de tendencia central y dispersión, mediante las pruebas estadísticas de t de Student y X^2 para diferencia de medias y proporciones, respectivamente, en caso necesario se empleó prueba exacta de Fisher o Wilcoxon, U de Mann Whitney. Se realizó correlación de Pearson entre las diferentes variables continuas de interés, y análisis de MANOVA. Considerando un IC al 95%, y valor de $p \leq 0.05$.

Aspectos éticos y de seguridad

El protocolo fue autorizado por el comité de ética e investigación del Hospital General de México con número de aprobación: DI-105B/03/16/041 y se otorgó el consentimiento informado a cada paciente previo a su participación en el estudio.

Criterios de Selección

a) Criterios de inclusión casos

- Se incluyeron a mujeres que acudieron al Servicio de Ginecología del Hospital General de México
- Mujeres embarazadas con ≥ 20 semanas de gestación, con diagnóstico de Preeclampsia severa de acuerdo al Hypertension in pregnancy, Report of the American Collage of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy 2013 (ACOG 2013), que tiene como criterios diagnósticos los siguientes:
 - Presión sistólica ≥ 160 mmHg o presión diastólica ≥ 110 mmHg, la confirmación dentro de minutos es suficiente y proteinuria ≥ 0.3 gramos en orina de 24 horas en muestra de orina o índice proteína (mg/dL) /creatinina (mg/dL) ≥ 0.3 . Tira reactiva 1+ (30-100mg/dl) en examen general de orina. En pacientes con hipertensión de nuevo inicio sin proteinuria, el nuevo inicio de cualquiera de los siguientes es diagnóstico de preeclampsia: Conteo de plaquetas $< 100,000$ /microlitro, Creatinina sérica > 1.1 mg/dl o el doble de creatinina sérica en la ausencia

de otras enfermedades renales, transaminasas hepáticas al menos dos veces la concentración normal, edema pulmonar, síntomas visuales o cerebrales.

b) Criterios de exclusión casos

Se excluyeron a aquellas pacientes con hipertensión crónica, quien hubiera recibido tratamiento antihipertensivo y mujeres con comorbilidad como Diabetes Mellitus y/o Enfermedad renal crónica.

Cada paciente con preeclampsia se pareo con una mujer embarazada sana por edad y semanas de gestación

Criterios de inclusión para mujeres con embarazo sano (controles)

- a) Mujeres que acudan a control del embarazo, tener ≥ 20 semanas de gestación, que cursen con embarazo normoevolutivo.

Criterios de eliminación para mujeres con embarazo sano (controles).

- a) Pacientes que su muestra no haya podido ser procesada.

Procedimiento del estudio

Se incluyeron 11 mujeres embarazadas que acudieron al servicio de ginecología del Hospital General de México, quienes cumplían los criterios de inclusión para el diagnóstico de preeclampsia severa. Cada paciente con preeclampsia fue pareada por edad y semanas de gestación con una mujer con embarazo sano.

Se realizaron dos mediciones de parámetros clínicos (cifras de presión arterial, peso, talla, uso de fármacos antihipertensivos) y de laboratorio incluida la medición de exosomas urinarios (Urea, creatinina, ácido úrico, electrolitos séricos y urinarios, examen general de orina, proteinuria, B2 microglobulina) una al momento del diagnóstico y otra posterior a la resolución del embarazo (1 mes).

A ambas pacientes se les invitó a participar y se otorgó el consentimiento informado, posteriormente se realizó la toma de muestra de sangre, la colección de las muestras de orina, y la recolección de datos de las características clínicas y los valores de laboratorio. Una muestra de orina es complementada con inhibidor de proteasa, posterior a ello se realizan 2 pasos de ultracentrifugación para el aislamiento de exosomas urinarios para su análisis de western blot **Figura 20**.

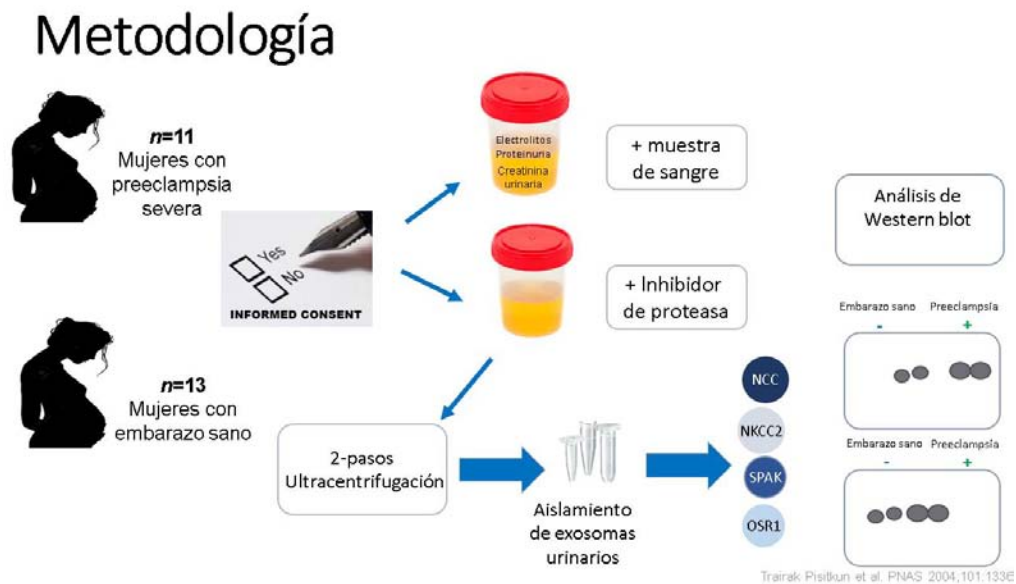


Figura 20. Diagrama de selección de la paciente (casos y controles) y toma de muestras

Procesamiento y almacenamiento de la muestra

Las muestras de sangre en su mayoría fueron procesadas en el Laboratorio del Hospital General de México, entre 4 a 8 ml de sangre fueron transportadas al Hospital Infantil de México para centrifugación, el suero fue almacenado a -80°C para medición posterior de aldosterona. En el laboratorio del Hospital General de México se realizó la medición de electrolitos urinarios en muestra aleatoria y examen general de orina. Una muestra de orina aleatoria de al menos 40 ml fue trasladada en red de frío al Hospital Infantil de México, en donde es complementada con inhibidor de proteasa, en un lapso no mayor de 4 horas del

momento de la toma hasta el traslado. El inhibidor de proteasa debe estar almacenado a una temperatura de -20 grados centígrados. Una vez que se agrega los inhibidores de proteasas, las muestras de orina fueron almacenadas a -80°C, para su posterior análisis.

Extracción de exosomas urinarios

Para la extracción de exosomas se descongeló la orina en hielo y se mezcló intensamente en un agitador vortex para homogeneizar la orina. Se tomó 10 ml de la muestra y se centrifugo a una velocidad de 17,5000 g por 10 min a una temperatura de 37°C. De este procedimiento se obtiene el supernadante (S1) que se pasa a otro tubo limpio. El pellet 1 de 17,000 g se agrega DDT (dedithiothreitol) a una concentración final de 200 mg/ml o en solución de aislamiento, dejar incubar 5-10 min a 37° y vortexear cada 2 minutos, centrifugar 13, 600 rpm/10 min/37°C, tomar supernadante (S2). Tomar la mezcla del supernadante (S1 + S2) y mezclarlos, centrifugar por 120 minutos/200,000g/4°C, el supernadante 3 se desecha y el pellet 3 se solubiliza en 50µl de solución de aislamiento 1.5% SDS y 50mMTris-HCL (pH6.8). Para posteriormente realizar la cuantificación de las proteínas en gel de acrilamida.

Western Blot (WB)

Para evaluar los niveles de expresión y fosforilación de NCC, se utilizaron anticuerpos contra NCC, así como fosfoanticuerpos que reconocen epítopes fosforilados dentro de estas proteínas.

- a) **Preparación de la muestra:** El pellet resuspendido obtenido previamente, se descongela; se preparan alícuotas: 20µl=4µl Laemmli 5X + Buff A. + Proteína (en función de la normalización por creatinina),
- b) **Electroforesis en gel:** Se realiza la separación por electroforesis en dos partes, primero a un voltaje a 50 mV por 30 min, y posteriormente a 100 mV hasta obtener la separación deseada de los marcadores de peso molecular.
- c) **Transferencia:** Transferir en cámara semi-seca a 10mV, por 1 hora 30 min, en una membrana de PVDF.

d) **Bloqueo**, se hidrata la membrana con metanol puro, posteriormente se enjuaga con TBS 1% + Tween 0.2%, y se realiza el **bloqueo con leche** al 5-10% en TBS-Tween por 1-1.5h. Los anticuerpos también son diluidos con leche al 5%.

e) **Detección. Método en dos pasos:**

Anticuerpo primario: Se incubó overnight a 4°C. posteriormente se lavó 4 veces con TBS-Tween 5 min.

Anticuerpo secundario: Se incubó durante 1.5 horas, T.A. (Sheep 1:5000), posteriormente se lavó 8 veces con TBS-Tween en agitación, durante 5 minutos.

Análisis (Detección quimioluminiscente): Se realizó con sustrato para la peroxidasa de hidrogeno y la intensidad de la señal fue evaluada por densitometría.

3.0 Resultados

Se incluyeron un total de 24 pacientes, 11 pacientes con preeclampsia (PE) severa y 13 mujeres con embarazo sano (ES). La edad promedio de ambos grupos fue 27.5 ± 6.03 años, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$), las características clínicas basales de la población de estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas basales de la población de estudio

Variabes	Total	Preeclampsia (PE)	Embarazo sano (ES)	p
	n=24 \pm DE	n=11 \pm DE	n=13 \pm DE	
Edad	27.5 \pm 6.03	30.2 \pm 7.58	28.92 \pm 4.64	NS
Semanas de gestación	36.68 \pm 3.37	36.07 \pm 3.00	37.33 \pm 3.44	NS
Presión arterial sistólica (mmHg)	135.21 \pm 68.2	166.2 \pm 11.54	107.15 \pm 9.59	0.001*
Presión arterial diastólica (mmHg)	82.81 \pm 17.79	99.3 \pm 9.28	68.38 \pm 8.97	0.001*
Creatinina (mg/dl)	0.66 \pm 0.15	0.78 \pm 0.09	0.54 \pm 0.1	0.001*
Índice Pr/Cr (mg/g)	2768.6 \pm 3887.5	5360.50 \pm 4131.01	178.82 \pm 128.27	0.001*
Urea mg/dl	19.33 \pm 4.82	23.96 \pm 5.93	14.70 \pm 3.71	0.001*
Ácido úrico mg/dl	5.44 \pm 1.98	6.1 \pm 1.47	4.78 \pm 1.02	0.059
Albúmina g/dl	2.91 \pm 0.22	2.72 \pm 0.25	3.11 \pm 0.20	0.001*

* Prueba de t para muestras independientes, valor de $p \leq 0.05$, IC 95%

Se identificó una paciente con diagnóstico clínico de lesión renal aguda AKIN I, al cumplir con el criterio de oliguria; una paciente con preeclampsia curso con síndrome de HELLP 4 (36.4%) tuvieron parto pretérmino y una tuvo eclampsia como parte del espectro de las manifestaciones clínicas de preeclampsia.

La tabla 2, presenta los niveles de electrolitos séricos solo se identificaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de calcio sérico.

Tabla 2. Electrolitos séricos basal de los grupos de estudio

Variable	PE	ES	p
	n=11 ±DE	n=13 ±DE	
Na ⁺ mmol	133.11±5.48	134.46±2.06	0.530
K ⁺ mmol	3.9±0.37	3.96±0.24	0.929
Cl ⁻ mmol	106±4.83	105.33±2.3	0.696
Ca ²⁺ mg/dl	8.6±0±.38	9.02±0.24	0.007 *
Mg ²⁺ mmol	2.4±0.78	1.83±0.17	0.956
P _i mmol	3.7± 0.71	3.73±0.61	0.051

* Prueba de t para muestras independientes, valor de p ≤0.05, IC 95%

La tabla 3 presenta los niveles de electrolitos urinarios de muestra aleatoria de las pacientes embarazadas con PE y ES, la fracción excreta de sodio y el nivel de proteinuria-

Al comparar ambos grupos encontramos que las mujeres con PE tienen menor excreción de cloro, con significancia estadística, sin embargo, se observa que el grupo de preeclampsia tiene menor excreción del resto de los electrolitos sin alcanzar significancia estadística. Y el nivel de proteinuria es mayor en el grupo de preeclampsia como es esperado por la fisiopatología de la enfermedad.

Tabla 3. Electrolitos urinarios basal de los grupos de estudio			
Variable	Casos n=11 ±DE	Controles n=13 ±DE	P
Na_ uri mmol/L	67.309 ± 55.15	108.96±51.66	0.069
K urinario mmol/L	32.82±38.46	53.65±30.88	0.155
Cl urinario mmol/L	54.1±38.72	118.38±51.64	0.003*
Ca urinario mg/24	4.6±4.83	7.36±7.57	0.308
Cr_ uri mg/dl	66.95±64.8	110.09±65.35	0.120
FENA%	0.90±0.81	0.61±0.34	0.291
Índice Pr/Cr	6737.49± 4764.89	151.38±105.02	0.001**

Las mujeres con preeclampsia presentaron menor nivel sérico de estradiol y progesterona respecto a mujeres embarazadas sanas con significancia clínica, no encontrando diferencias en los niveles séricos de prolactina (tabla 4).

Tabla 4. Niveles basales de hormonas

Variable	PE n=11 ± DE	ES n=13 ± DE	p
Estradiol pg/ml	33537.21±40378.99	183841.16±63382	0.003*
Progesterona ng/ml	156.44±122.29	480.01±264.88	0.000*
Prolactina ng/ml	235.33±195.64	275.90±173.84	0.714
Aldosterona pg/ml	312.70±221.20	495.23±213.26	0.070

*Prueba de t para muestras independientes, valor de p ≤0.05, IC 95%

En la tabla 5, se presentan las características del producto al momento del nacimiento, el 72.7% (8) de las pacientes con preeclampsia resolvieron el embarazo mediante cesárea. Dentro de las complicaciones del producto 3 tuvieron restricción del crecimiento intrauterino, 2 cursaron con oligohidramnios.

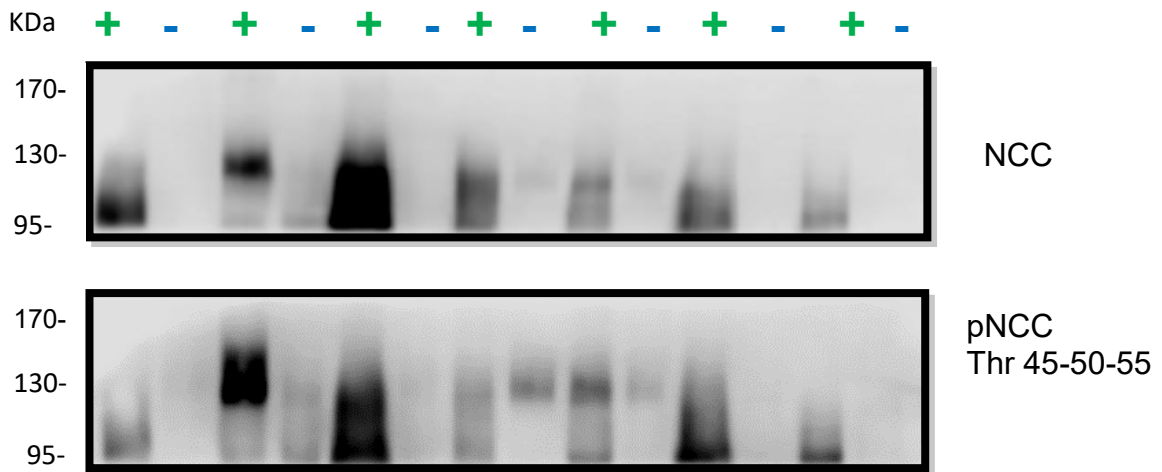
Tabla 5. Características del producto al momento del nacimiento

Variables	total n=24 (%)	PE n=11 (%)	ES n=13 (%)	p
Peso ± DE	2668.23±711.25	2342.2±753.84	3220±279.77	0.007 **
Talla ± DE	47.971±3.78	46.3±4.05	50.06±1.42	0.013**
Resolución del embarazo				
Parto	11(45.9)	3(27.3)	8(61.5)	0.305
Cesárea	13(54.2)	8(72.7)	5(38.5)	
Resultado embarazo				
Vivo	22 (94.9)	10 (90.9)	13 (100)	0.343
Muerto	1 (4.2)	1 (9.1)	0 (0)	
Complicaciones del producto				
Si	7(29.2)	5(45.5)	2(15.4)	---

Determinación de exosomas urinarios

En 5 pacientes (PE) no se realizó el análisis de exosomas mediante western blot, debido a que la muestra estaba muy diluida y la cantidad de muestra requerida para ajustarla de acuerdo a creatininuria era mayor que la capacidad del pozo del gel de poliacrilamida por lo que esas pacientes fueron eliminadas, analizando únicamente a 7 pacientes con preeclampsia y sus respectivos controles. La cantidad de muestra utilizada para la determinación de exosomas urinarios se realizó ajustado a la creatinina urinaria de cada paciente. En la Figura 21, se presenta la expresión de NCC y pNCC mediante Western Blot de exosomas urinarios basal en el cual se identifican diferencias estadísticamente significativas entre la expresión NCC total, fosforilado al realizar las gráficas de tipo “cajas y bigotes” (Figura 22).

Figura 21. Western blot de la expresión y fosforilación de NCC en mujeres con preeclampsia (+) y mujeres con un embarazo sano (-).

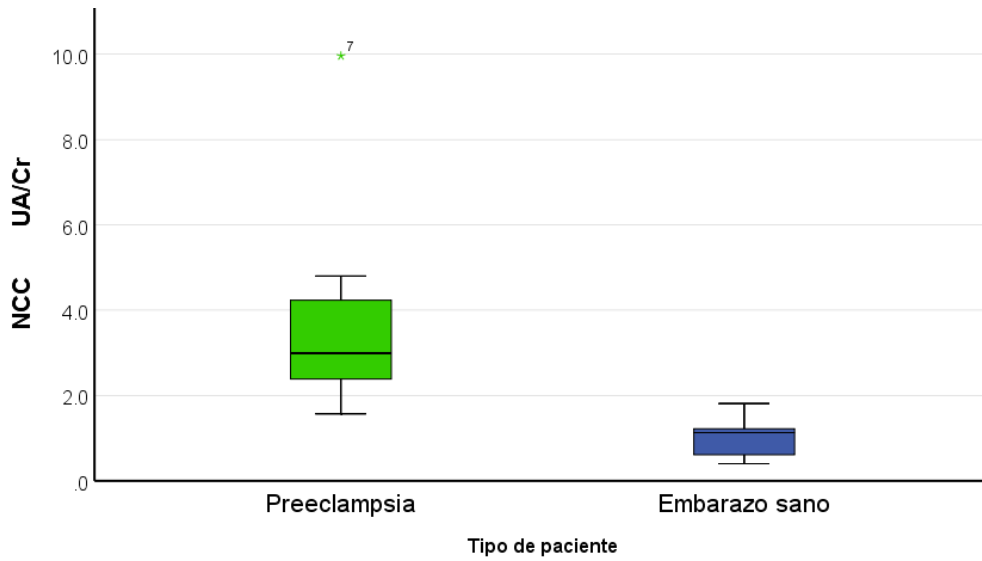


+ Mujer con preeclampsia

- Mujer con embarazo sano

Figura 22. Gráficas de cajas y bigotes de la expresión NCC (a) y pNCC (b)

a)

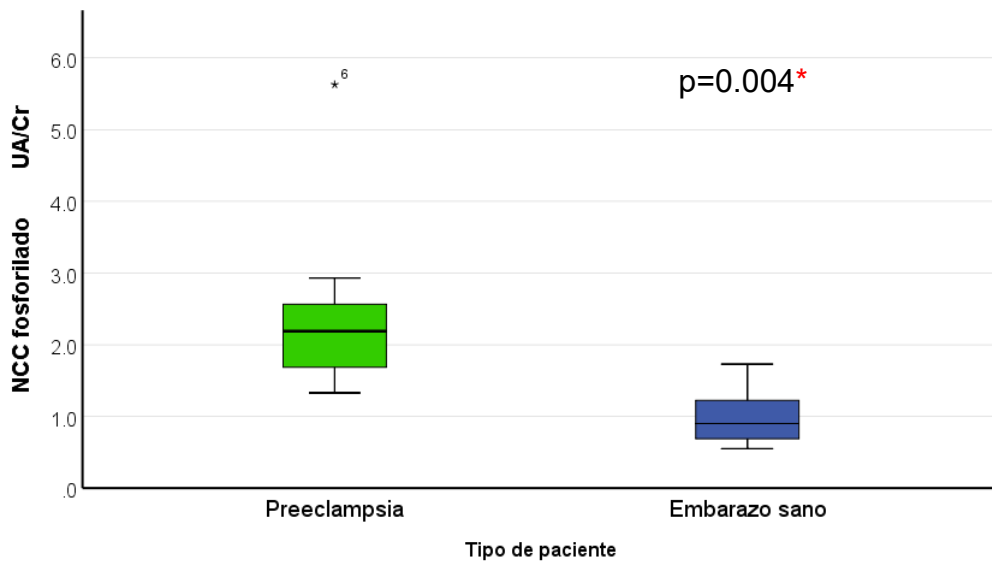


Mujer con preeclampsia (■)

Mujer con embarazo sano (■)

* $p \leq 0.05$ n=14

b)



Mujer con preeclampsia (■)

Mujer con embarazo sano (■)

* $p \leq 0.05$ n=14

Tras los resultados encontrados en NCC, se analizó si las proteínas que regulan su fosforilación, OSR1 y SPAK (32) estuviesen involucradas en el aumento de la fosforilación de NCC.

Además, se exploró la posibilidad que otros transportadores de sodio a lo largo de la nefrona estuviesen también involucrados en las alteraciones observadas en las pacientes con preeclampsia, de esta manera se analizaron también: SGLT2, NHE3, la subunidad alfa de ENaC, así como la expresión y fosforilación (Serina 91) de NKCC2.

Al realizar el análisis de western blot de la expresión y fosforilación de NKCC2, (NKCC2 y pNKCC2 S91), así como de la expresión y fosforilación de las cinasas OSR1 y SPAK¹ (Figura 23), se encontró un aumento significativo en la fosforilación de NKCC2 y SPAK, así como en OSR1, mientras que para NKCC2 se muestra una tendencia pero no alcanzó una significancia estadística (Figura 24).

¹ Para analizar la expresión de SPAK, se utilizó el anticuerpo contra OSR1, pues reconoce también a SPAK, en este caso los anticuerpos con los que contamos en el laboratorio no sirven para humanos, sin embargo, el anticuerpo para la detección de la fosforilación de SPAK (el residuo fosforilado de la Ser 373) sí detecta muestras de origen humano.

Figura 23. Análisis de la expresión y fosforilación de NKCC2, OSR1 y SPAK por western blot de la en pacientes con PE vs ES (determinación basal) n=14.

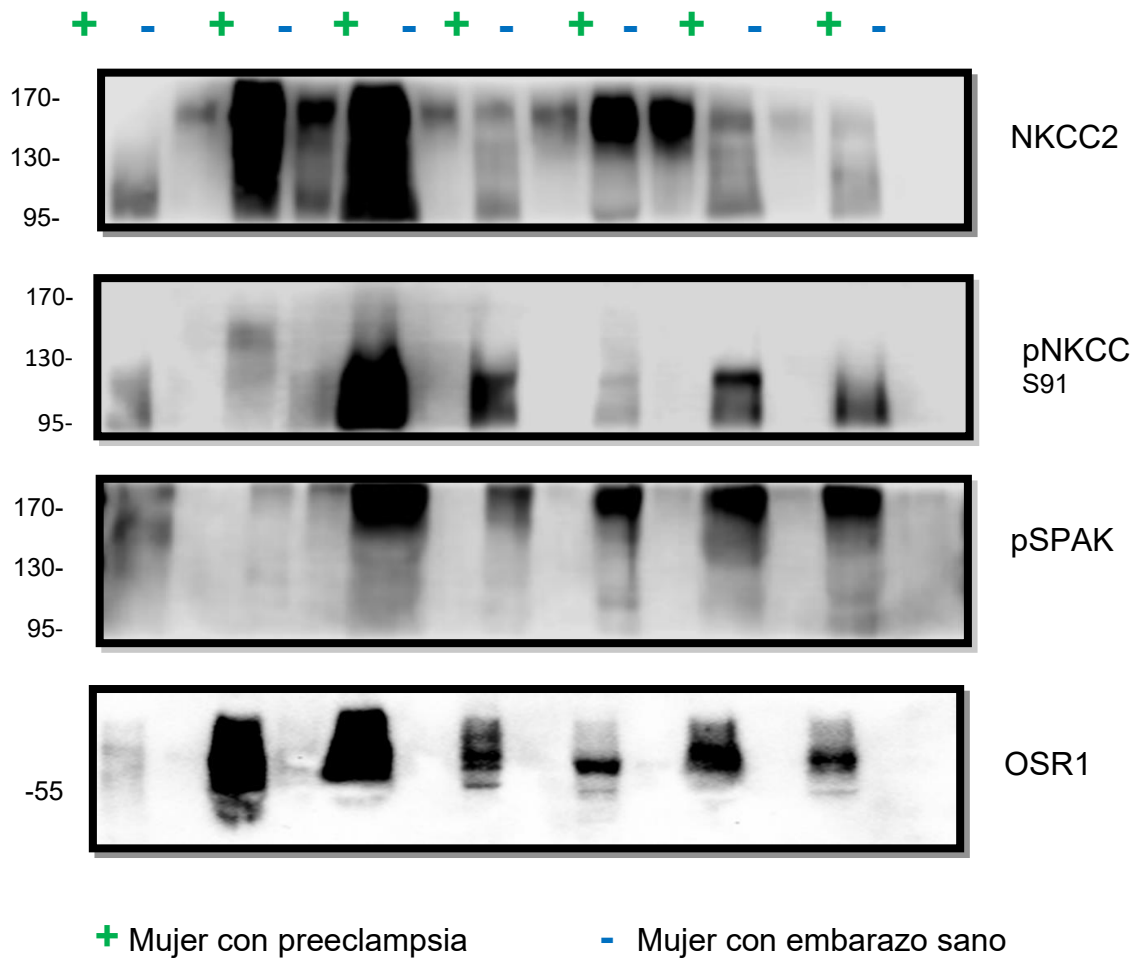
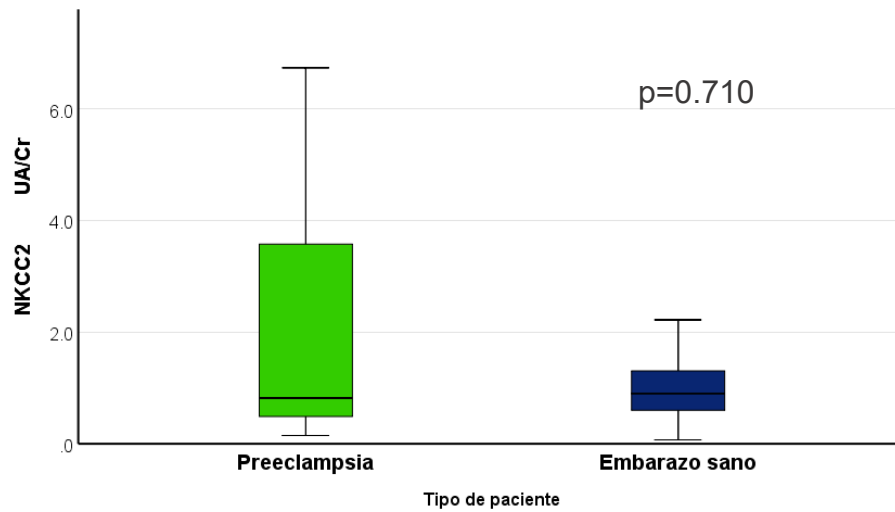
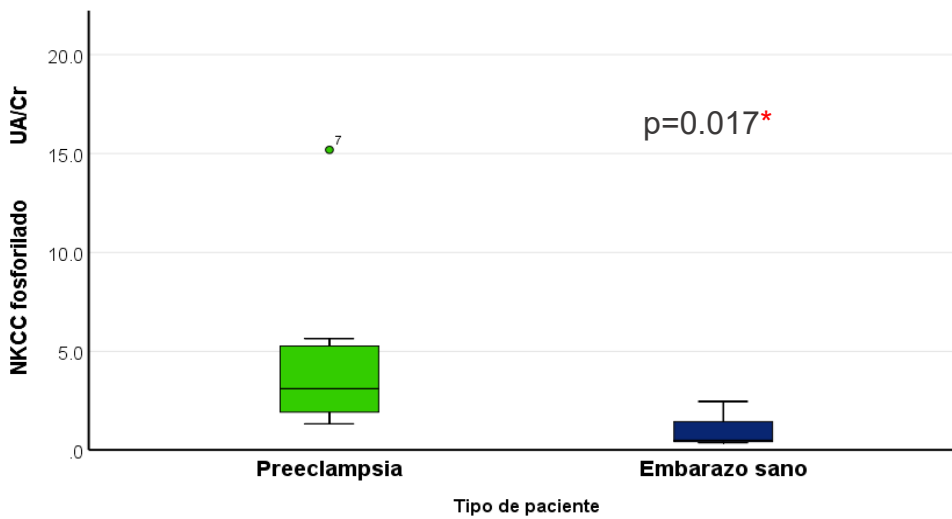


Figura 24. Gráficas de cajas y bigotes, de la expresión de los cotransportadores c) NKCC2, d) pNKCC2 e) pSPAK, f) OSR1.

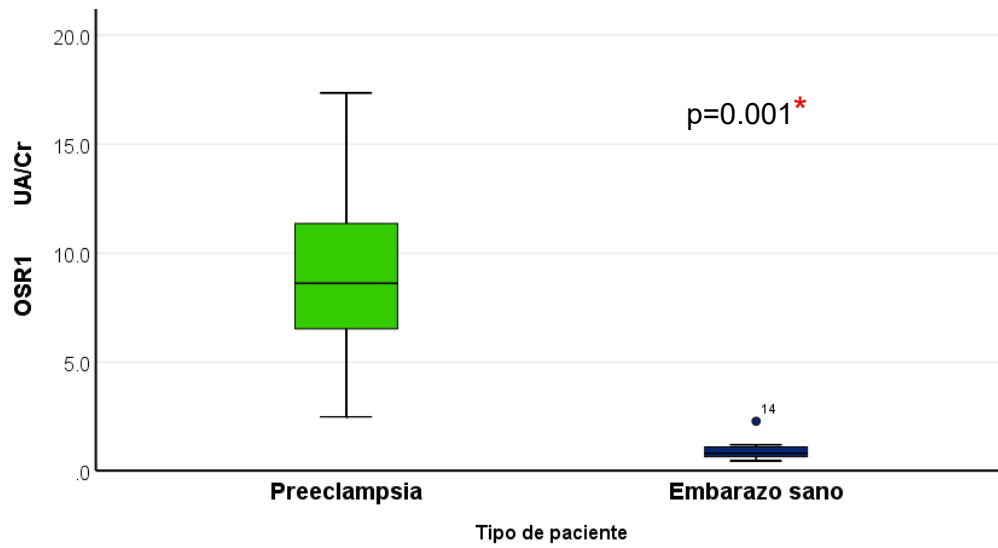
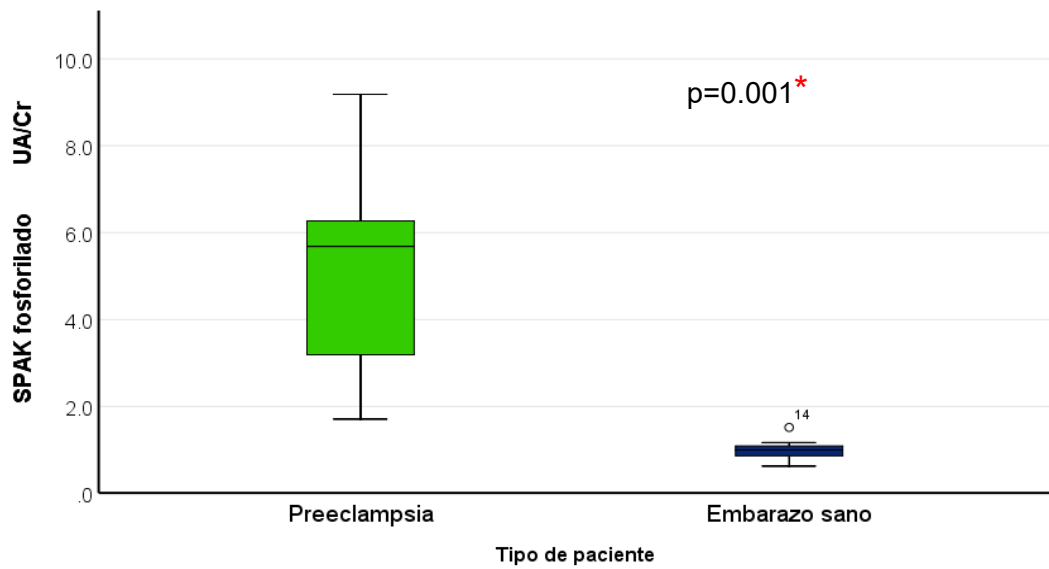
c)



d)



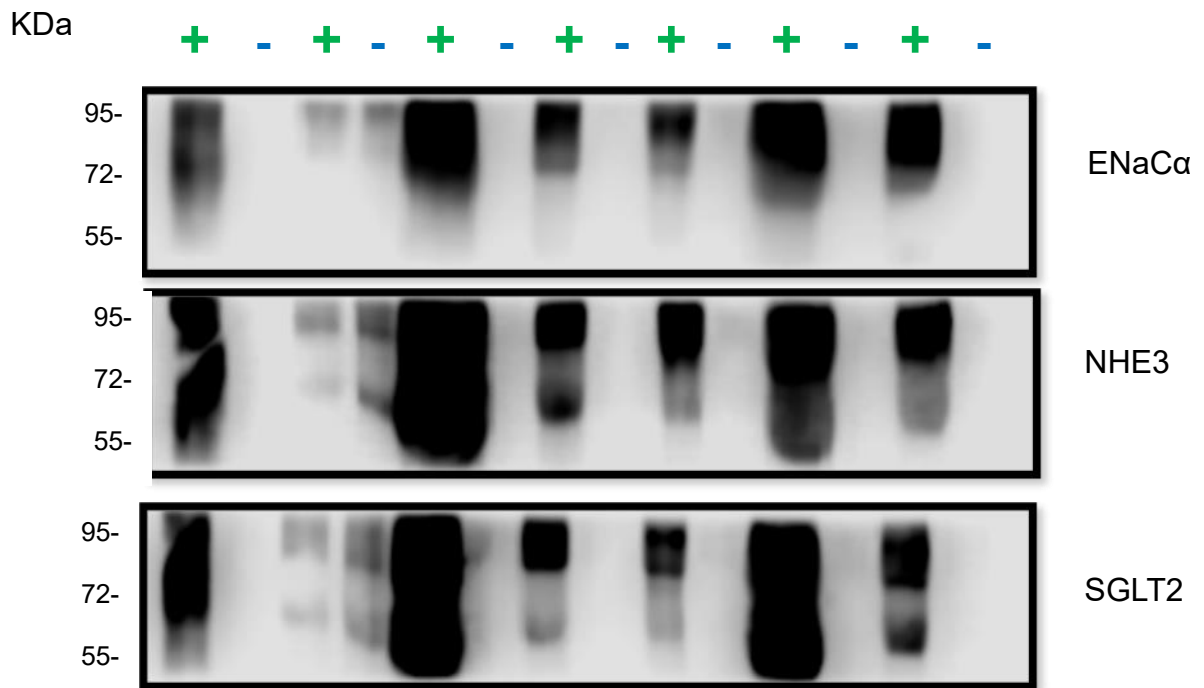
e)



Mujer con preeclampsia (■) Mujer con embarazo sano (■) *p≤0.05 n=14

En la figura 25, se observa que la expresión de SGLT2 y NHE3 en el túbulo proximal y la subunidad de alfa ENaC en el conducto colector están marcadamente incrementados mediante análisis de western blot.

Figura 25. Expresión de SGLT2, NHE3 y ENaC α



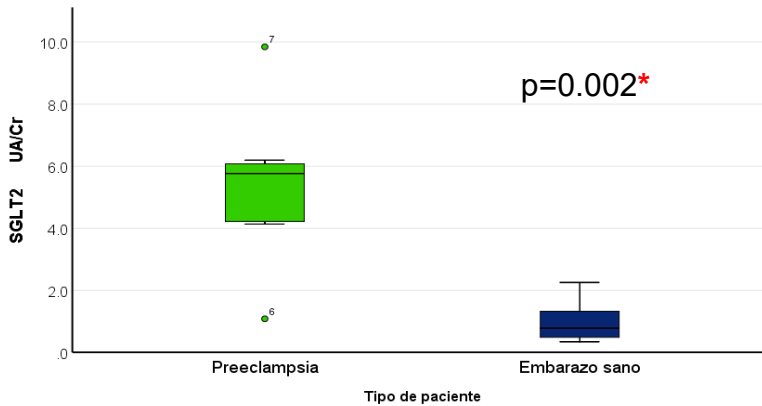
+ Mujer con preeclampsia

- Mujer con embarazo sano

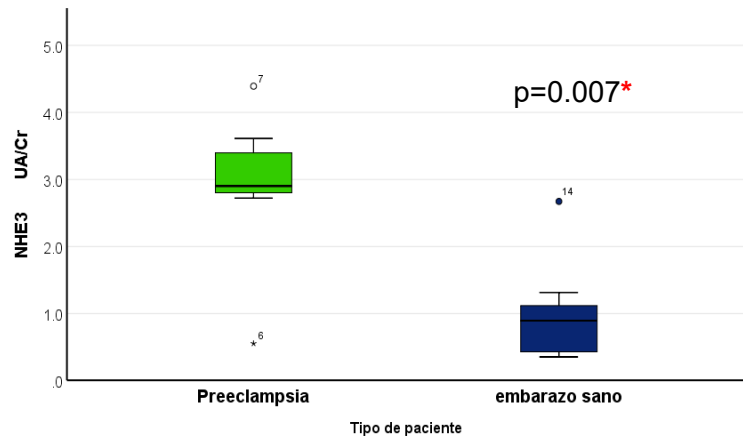
Mientras que en la figura 26 se presenta la comparación en la expresión g) SGLT2, h) NHE2 y i) ENaC α entre los grupos, representado en las gráficas de cajas y bigotes.

Figura 26. Comparación basal entre los grupos de la expresión de ENaC α , NHE2 y SGLT2

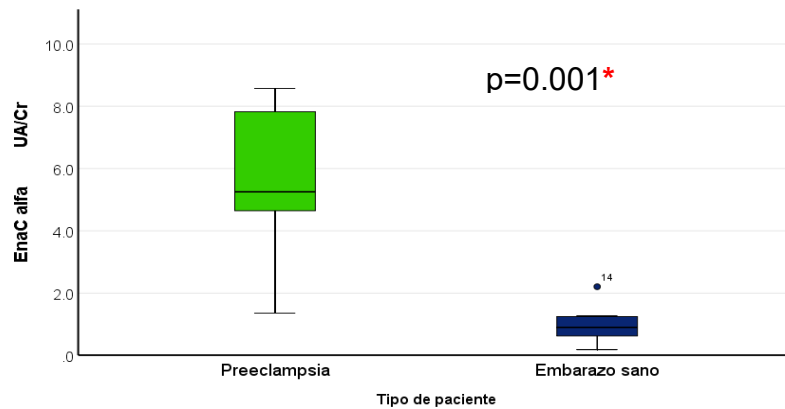
g)



h)



i)



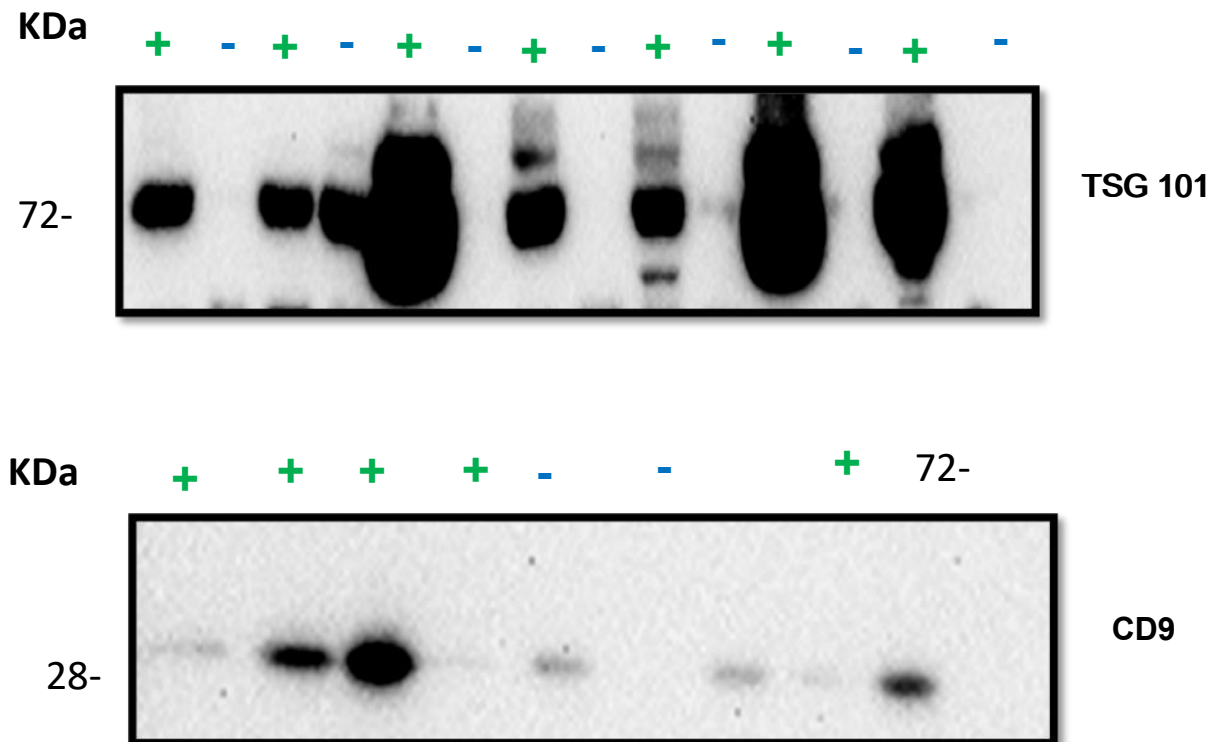
■ Mujer con preeclampsia

■ Mujer con embarazo sano

* $p \leq 0.05$ n=14

Al encontrar todos los transportadores de sodio incrementados en las pacientes con preeclampsia, se sospechó que en realidad no existe una activación específica de los transportadores y cinasas, sino que hay un aumento en el desprendimiento de los exosomas del epitelio renal anormalmente alto, estimulado por las condiciones fisiopatológicas de la PE. Para estudiar dicha posibilidad, se realizó la cuantificación de marcadores específicos de exosomas, TSG101 y CD9 (Figura 27, donde se encontró que ambos marcadores se incrementan significativamente en las pacientes con preeclampsia en comparación de las pacientes sanas.

Figura 27. Expresión de TSG101 y CD9 en pacientes con PE vs ES.

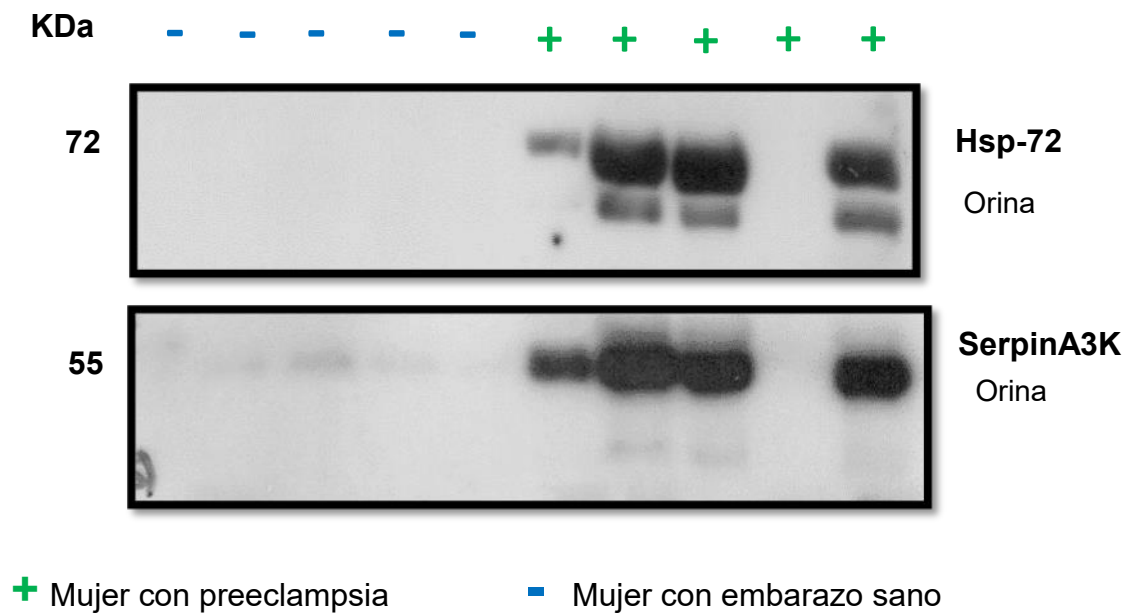


+ Mujer con preeclampsia

- Mujer con embarazo sano

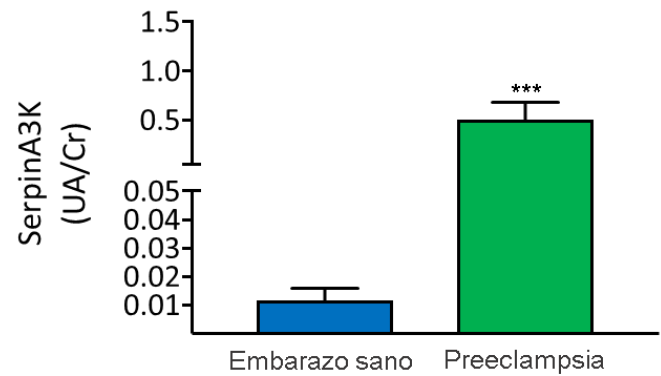
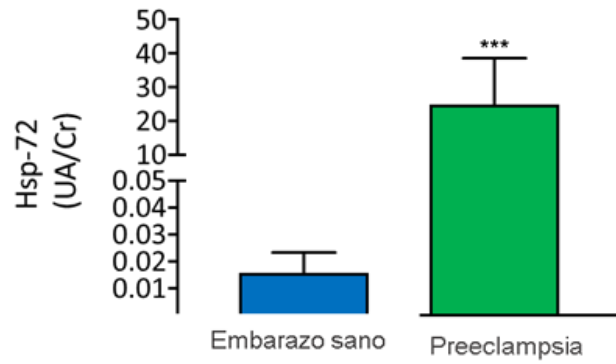
Dado el incremento en el desprendimiento de exosomas en las pacientes con PE, se pensó en la posibilidad que tuviesen algún tipo de daño renal, para ello se analizó marcadores de daño renal HSP-72 y Serpina A3K directamente en muestras de orina (Tabla 5 y figura 28) y en muestras de sangre se realizó la medición de Cistatina C y B2 microglobulina. (Tabla 5)

Figura 28. Expresión de marcadores de daño renal.



Al realizar la cuantificación de los exosomas urinarios de Hsp 72 y Serpina 3K observamos un incremento en estos dos biomarcadores en las pacientes con preeclampsia severa (Figura 29)

Figura 29. Cuantificación de exosomas urinarios de Hsp-72 y Serpina3K



Ninguna de las pacientes con preeclampsia tenía el diagnóstico o se conocía con Enfermedad renal crónica o daño renal previo, sin embargo, al analizar los resultados obtenidos encontramos que las pacientes con PE tienen cifras mayores de creatinina en contraste con embarazo sano, por lo que se realiza la medición de la tasa de filtrado glomerular por diferentes fórmulas o (CKDEPI-2009, Creatinina/cistatina 2012, MDRD, Cockcroft-Gault) utilizando la siguiente calculadora. https://www.kidney.org/professionals/kdoqi/gfr_calculator (Tabla 6)

Tabla 6. Tasa de filtrado glomerular basal

Variables	PE <i>n=7 ± DE</i>	ES <i>n=7 ± DE</i>	P	IC
CKDEPI-2009 mL/min	102.71±13.04	129.55±13.63	0.001*	-41.31a -12.38
Creatinina/cistatina 2012 mL/min	69.14±12.06	96.66±12.87	0.001*	-41.00 a -14.04
Cistatina C 2012 mL/min	50.85±11.97	72.33±16.55	0.009*	-36.78 a -6.16
MDRD mL/min	88.14±10.79	139.44±33.55	0.002*	-77.81 a -24.78
Cockcroft-Gault mL/min	123.96±36.438	171.68±36.6	0.008*	-81.13 a -14.30

*Prueba de t para muestras independientes, valor de $p \leq 0.05$, IC 95%

Resultados un mes posterior a la resolución del embarazo

Se realizó el seguimiento de las pacientes a los 30 días posterior al parto o cesárea, cuando la preeclampsia resolvió, para evaluar el comportamiento de los transportadores de sodio, así como las características clínicas y bioquímicas. Dentro de las características clínicas encontramos que no existen diferencias en los parámetros entre ambos grupos en cuanto al peso y la talla, ni lactancia materna. En cuanto al uso de antihipertensivos 2 pacientes del grupo de preeclampsia aún continuaban tomando tratamiento antihipertensivo (Tabla 7)

Tabla 7. Características clínicas de la población de estudio al mes de seguimiento				
Variables	Total n=17± DE	PE n=9 ± DE	ES n=8 ± DE	P
Peso ± DE	64.24±14.68	67.47±19.22	60.54 ±6.49	0.381
Talla ± DE	1.74±1.58	1.55±0.98	1.62 ±0.18	0.059
Número de pacientes que toman antihipertensivos	Si: 2 (11.76) No: 15 (88.23)	Si: 2 (11.76) No:15 (88.23)	Si: 0 (0) No:8 (100)	0.714
Clase de antihipertensivo que toman antihipertensivos	Nifedipino: 2 (11.76) metoprolol y captopril: 1 (5.88)	Nifedipino:2 (11.76) metoprolol y captopril: 1 (5.88)	Nifedipino: 0 (0) Metoprolol y captopril 0 (0)	1.34
Lactancia materna	Si: 16 (94.11) No: 1 (5.88)	Si: 8 (88.9) No: 1(11.1)	Si: 8 (100) No: 0 (0)	0.714

Al mes de seguimiento se observó que la presión arterial sistólica no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, mientras que las cifras de presión diastólica fueron significativamente más altas en las pacientes con PE (Tabla 8).

Tabla 8. Presión arterial al mes de seguimiento

Variable	Casos <i>n=9 ± DE</i>	Controles <i>n=8 ± DE</i>	P
Presión arterial sistólica mmHg	111.96±9.4	104.00±5.03	0.051
Presión arterial diastólica mmHg	77.33±7.9	64.85±5.01	0.002**
Presión arterial media mmHg	90.38±7.49	77.47±3.84	0.001**

La tabla 9, presenta los parámetros bioquímicos de los grupos de estudio al estudio al mes de seguimiento.

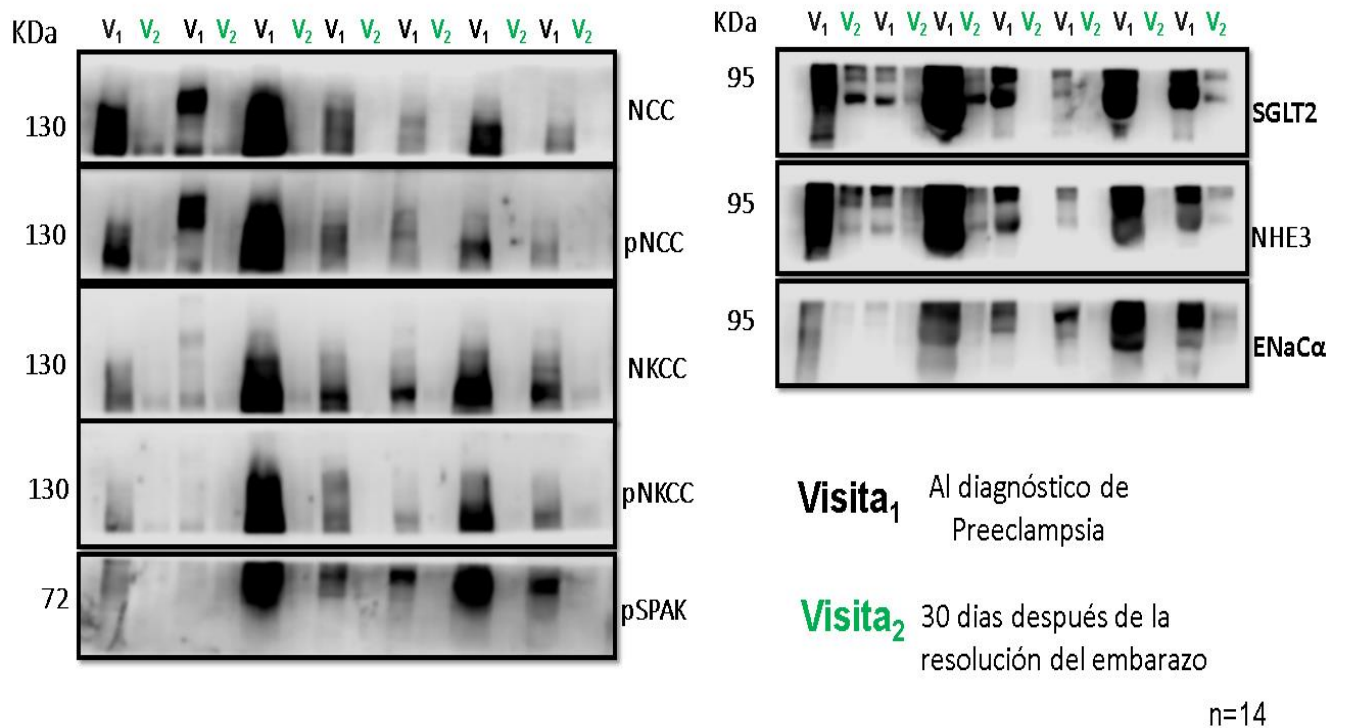
Tabla 9. Parámetros bioquímicos al mes de seguimiento

Variable	PE <i>n=9 ± DE</i>	ES <i>n=8 ± DE</i>	p
Creatinina mg/dl	0.71±0.11	0.6±0.75	0.034**
Urea mg/dl	28.73±6.93	22.08±6.3	0.056
TFG/ CKD EPI	112.65±12.11	125.62±8.1	0.021**
Ácido úrico mg/dl	5.3±1.15	5.52±1.19	0.757
Albúmina g/dl	3.9±0.22	4.02±0.19	0.393
Estradiol pg/ml	68.81±106.27	29.56±25.49	0.311
Progesterona ng/ml	1.00±0.73	0.46±0.35	0.071
Prolactina ng/ml	136.15±126.75	29.56±25.49	0.479
B2 microglobulina (no tiene unidades)	3.27±3.1	1.58±1.51	0.175
Aldosterona pg/ml	370.67±524.55	196.94±86.96	0.356

Al mes de seguimiento junto con los parámetros clínicos y bioquímicos se realizó un análisis por western blot a ambos grupos, se realizó el análisis de todos los transportadores de sodio, lo que se encontró fue que la expresión general de todos los transportadores disminuyó significativamente, sugiriendo que el incremento en la excreción de exosomas, así como el daño renal es agudo, siendo parte del escenario clínico de preeclampsia y dependiente del embarazo

En la figura 30, se presenta la expresión de exosomas urinarios al momento del diagnóstico de la preeclampsia (V1) y a los 30 días de la resolución del embarazo (V2).

Figura 30. Expresión de exosomas diagnóstico y seguimiento



Correlación de los transportadores de sal con parámetros clínicos y bioquímicos

Se realizó la estimación de correlaciones entre los niveles de los transportadores de sodio en su forma total y activa, con los parámetros de cifras tensionales y bioquímicos para evaluar la asociación o interdependencia entre estos (Tabla 9).

**Tabla 9. Correlación de Rho Spearman $p < 0.05$
Ajustado por creatinina urinaria**

	TAS	TAD	TAM	Cr	CKD EPI	K_S	Ca_S	Mg_S	pCO2	K_u	Cl_u	Prot	Índice proteína /Cr mg/g
NCC	.803	.682	.761	.694	-.691				-.636		-.568	.855	.829
pNCC	.708	.648	.717	.647	-.605							.727	.736
NKCC2						.648				.684			
pNKCC	.566	.679	.581	.596	-.596				-.664		-.636*	.837	.692
pSPAK	.812	.935	.854	.892	-.834		.533*	.559	-.645			.952	.833
SGLT1	.772	.733	.638	.822	-.818				.882		-.616	.938	.837
ENACα	.801	.891	.795	.895	-.859		.586*		-.729			.968	.838
NH3	.655	.748	.579	.750	-.711				-.691			.938	.767
OSR1	.741	.826	.869	.699	-.664							.776	.811

Se identificó que todos los transportadores de sodio correlacionan de forma positiva moderada con los niveles de presión arterial sistólica, diastólica y media, observándose que los niveles de pSPAK correlacionaron con las cifras de presión arterial diastólica; otro parámetro que presentó correlación positiva moderada con todos los transportadores de sodio es la proteinuria, excepto con los niveles de expresión de NKCC2 en su forma total.

Los niveles de pSPAK correlacionaron moderadamente y de forma negativa con los niveles de calcio sérico y pCO2, mientras que, con los niveles de magnesio sérico la correlación fue positiva. El transportador ENAC alfa correlacionó negativamente con calcio sérico, pCO2. El transportador NHE3 mostró una correlación negativa con CKD EPI y pCO2. El OSR1 no presentó correlación con ninguno de los electrolitos séricos y urinarios.

Al correlacionar los electrolitos séricos y urinarios con los transportadores de sodio encontramos correlación positiva moderada en las cifras de potasio sérico y urinario con los niveles de NKCC2 en su forma total (figura 31 y 32).

Figura 31. Correlación positiva moderada entre niveles de potasio sérico y NKCC2 en exosomas urinarios $r=0.648$ $p<0.05$

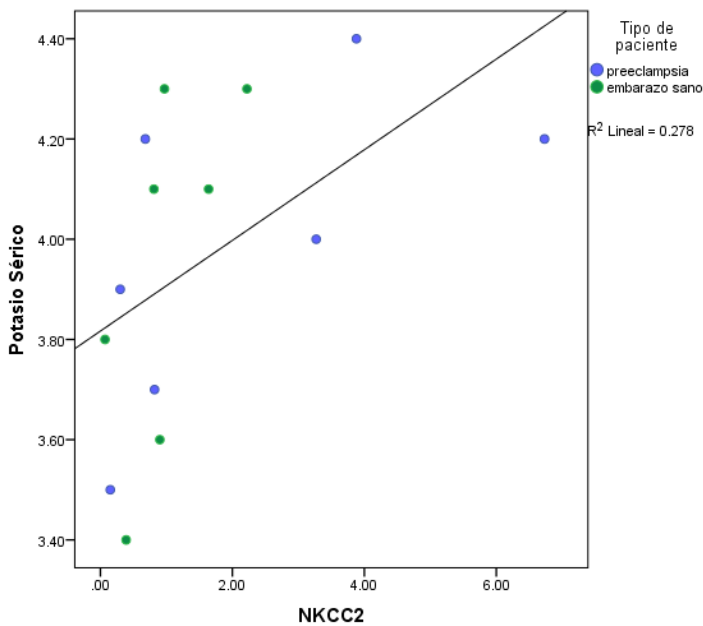
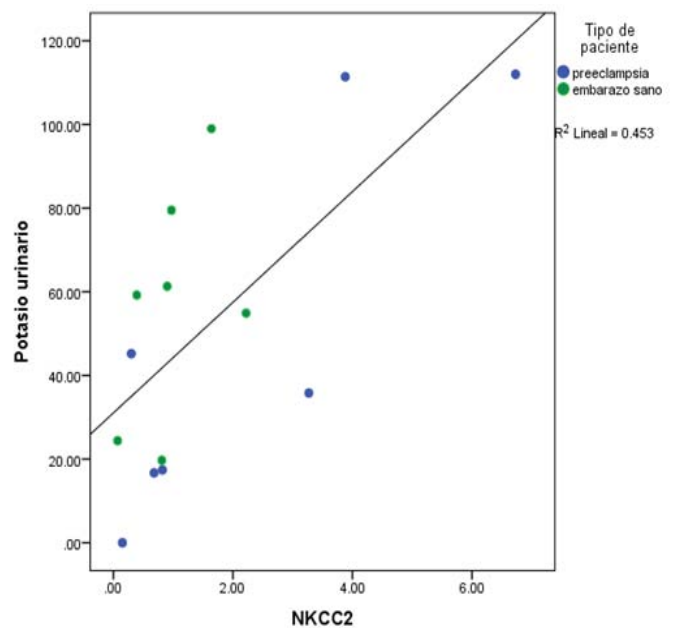


Figura 32. Correlación positiva moderada entre niveles de potasio urinario y NKCC2 en exosomas urinarios $r=0.684$ $p<0.05$



Al evaluar al cotransportador NKCC2, NCC en su forma activa y al transportador SGLT1 encontramos correlación negativa moderada con los niveles de cloro urinario (figura 33,34 y 35)

Figura 33. Correlación entre niveles de cloro urinario y NKCC2 total

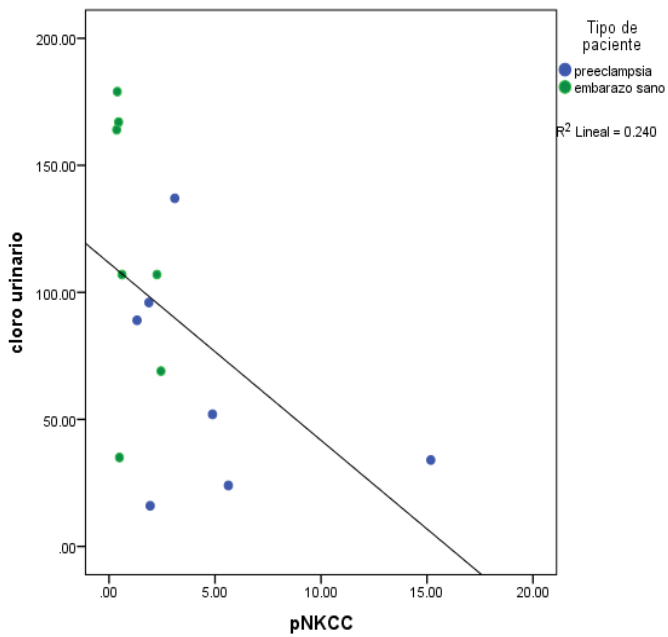


Figura 34. Correlación entre niveles de cloro urinario y NCC

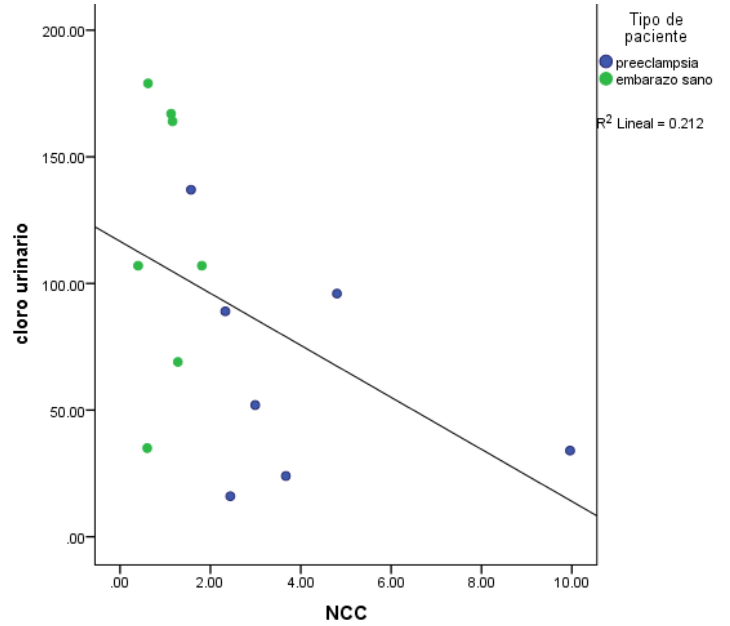
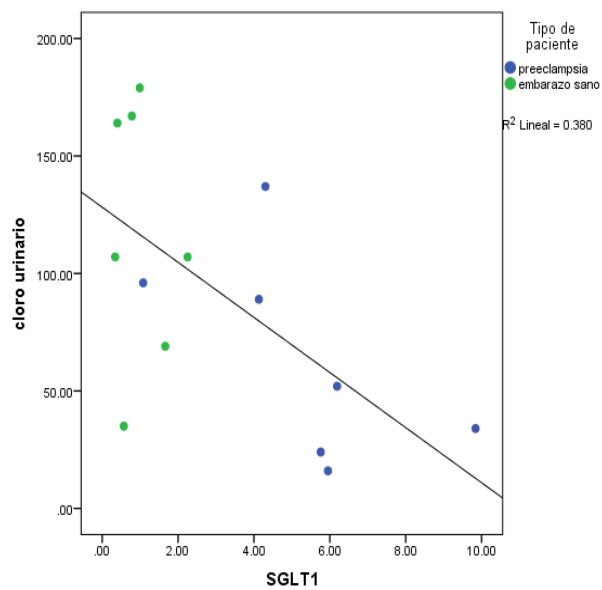


Figura 35. Correlación entre niveles de cloro urinario y SGLT1



Discusión

Los trastornos hipertensivos del embarazo, entre ellos la preeclampsia se caracterizan por una subóptima expansión del volumen del plasma que conduce a una alteración en la perfusión uteroplacentaria (33); en el embarazo normal se requiere una expansión del 40% de este volumen para permitir una adecuada perfusión del crecimiento del útero y feto, esta expansión del plasma es regulada por la retención de sal a nivel renal, la cual es mediada por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y se acompaña por vasodilatación y disminución de la presión arterial. (33)

Durante el embarazo sano se presenta elevación crónica de aldosterona, angiotensina II y estrógenos (34), estas moléculas, en el embarazo se encuentran asociadas con la estimulación (aldosterona, angiotensina II, estrógenos, insulina) y/o inhibición (óxido nítrico, progesterona, tasa de filtrado glomerular) la retención de sal. Sin embargo, está bien documentado que la retención de sodio ocurre en el embarazo normal (33); y que, la reabsorción de sodio es determinada por la tasa de transporte tubular renal de Na^+ , la cual es establecida por los transportadores de sodio a lo largo de la nefrona, estos a su vez se encuentran regulados por estímulos hormonales y no hormonales.(23),(20), (12)

Considerando lo anterior, la alteración en el transporte de sodio podría favorecer la mayor retención de sal y con ello el desarrollo de hipertensión característico de la preeclampsia, esto a pesar, de que se presente una subóptima expansión del volumen del plasma.

Nosotros no encontramos diferencias en los niveles de Na^+ y Cl^- sérico, a nivel urinario las pacientes con preeclampsia severa tienen menor excreción de Cl^- urinario, respecto a Na^+ urinario no encontramos diferencias únicamente se observa una tendencia a la menor excreción en las mujeres con preeclampsia severa vs embarazo sano. Respecto a este hallazgo una de nuestras hipótesis por la cual no encontramos diferencias en las concentraciones de Na^+ y que en cierta medida contribuya al incremento de todos los transportadores de sal; es que estuviera influyendo el modelo tricompartmental del balance de Na^+ ; el cual se basa en el hallazgo de que las concentraciones intersticiales de electrolitos

son mayores que en la sangre (el denominado depósito cutáneo de Na⁺)(35),(36)y que la retención de sodio suceda de manera crónica conforme avanza el embarazo, hasta que llega un momento crítico en el que el sistema regulatorio de la presión arterial no puede mantener la homeostasis, disparando niveles elevados de cifras tensionales.

Posterior a la resolución del embarazo es conocido que en las pacientes con preeclampsia el líquido que ha sido secuestrado en el espacio extravascular es movilizado, produciendo una gran autoinfusión de líquido del extravascular a el compartimento intravascular. Como un resultado a este proceso de movilización de líquido, hay un incremento en la presión venosa central y presión capilar pulmonar en cuña. Por lo que P.Veena 2016 encontró que el uso de furosemide con nifedipino reduce la necesidad de antihipertensivo adicional en las pacientes con preeclampsia severa comparadas con aquellas que reciben nifedipino solo.(37) Todo esto sugiere que la sal y agua están involucrados en la fisiopatología de la preeclampsia.

Durante el curso de un embarazo normal hay cambios hemodinámicos e inmunológicos; hay un incremento en los niveles de vasodilatadores, tal como óxido nítrico y relaxina así como una relativa resistencia a vasoconstrictores tal como la angiotensina II, mientras que a tasa de filtrado glomerular incrementa en aproximadamente 50% resultando en una reducción fisiológica de los niveles de creatinina sérica en el marco de la hiperfiltración, por lo que se considera que el nivel normal de creatinina sérica en el embarazo está en el rango de 0.4 a 0.6mg/dL(38)

Un estudio realizado por Ziv Harel et al, en el que se evaluó el comportamiento de la creatinina previo al embarazo, durante el embarazo y posparto en mujeres sanas, excluyendo a aquellas pacientes con cifras de creatinina >1.41 mg/dl, o albuminuria antes del embarazo; reportó que el promedio de concentración de creatinina previo al embarazo fue de 0.67mg/dl, de la semana 16 a 32 el nivel de creatinina disminuyó a un promedio de 0.57mg/dl, después de la semana 32 esta comenzó a elevarse a 0.72 mg/dl .(38) En nuestro estudio las pacientes con preeclampsia tuvieron un promedio de 36 semanas de gestación con una media de creatinina de 0.78±0.09mg/dl, al comparar nuestros resultados con lo reportado por Ziv Harel, nuestras pacientes con preeclampsia presentaron cifras de creatinina mayores a lo reportado para embarazo sano, (Figura 36) lo cual podría sugerir que las pacientes con preeclampsia

curisan con daño renal subclínico, a pesar de que ninguna de ellas presentó niveles de creatinina $\geq 1.1\text{mg/dl}$, niveles que de acuerdo al ACOG 2013 podrían sugerir daño renal en preeclampsia; llama la atención que los niveles de creatinina de nuestras pacientes con embarazo sano, son menores a lo reportado como normal para el percentil 75 (0.64mg/dl), (Figura 37), esta discordancia podría deberse a diferencias geográficas y nutricionales entre las poblaciones de estudio.

Figura 36. Cifras de creatinina previo a la gestación, durante y posterior al embarazo correspondiente por semana. Los valores adyacentes a cada curva indican el percentil específico correspondiente con el valor de creatinina sérica para cada punto del tiempo en embarazo sano. En la imagen se compara el nivel de creatinina en las pacientes con preeclampsia obtenido en nuestro estudio. Para convertir el valor de creatinina a mg/dl , dividir por 88.4. Tomado de (39)

36 semanas de gestación

- 0.74 mg/dl percentil 95
- 0.61 mg/dl percentil 75
- 0.54 mg/dl percentil 50

0.78 $\pm 0.09\text{mg/dl}$ nuestros resultados
 Pacientes con **Preeclampsia**

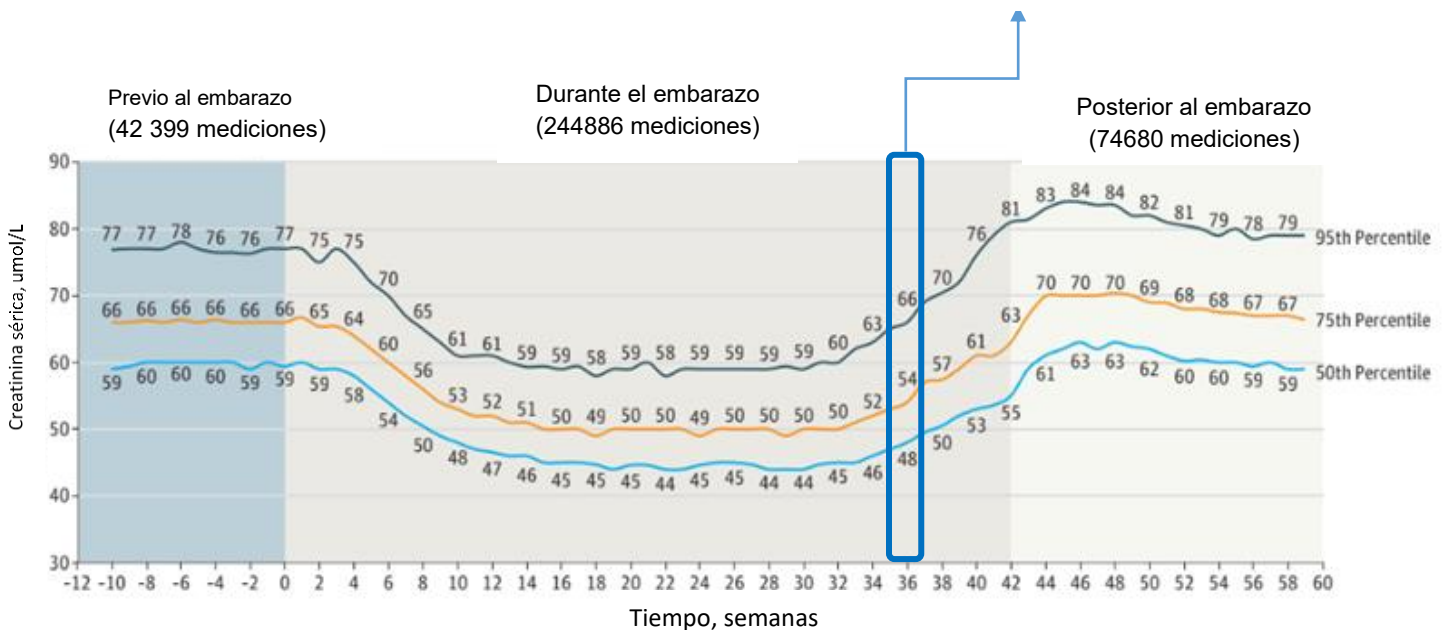
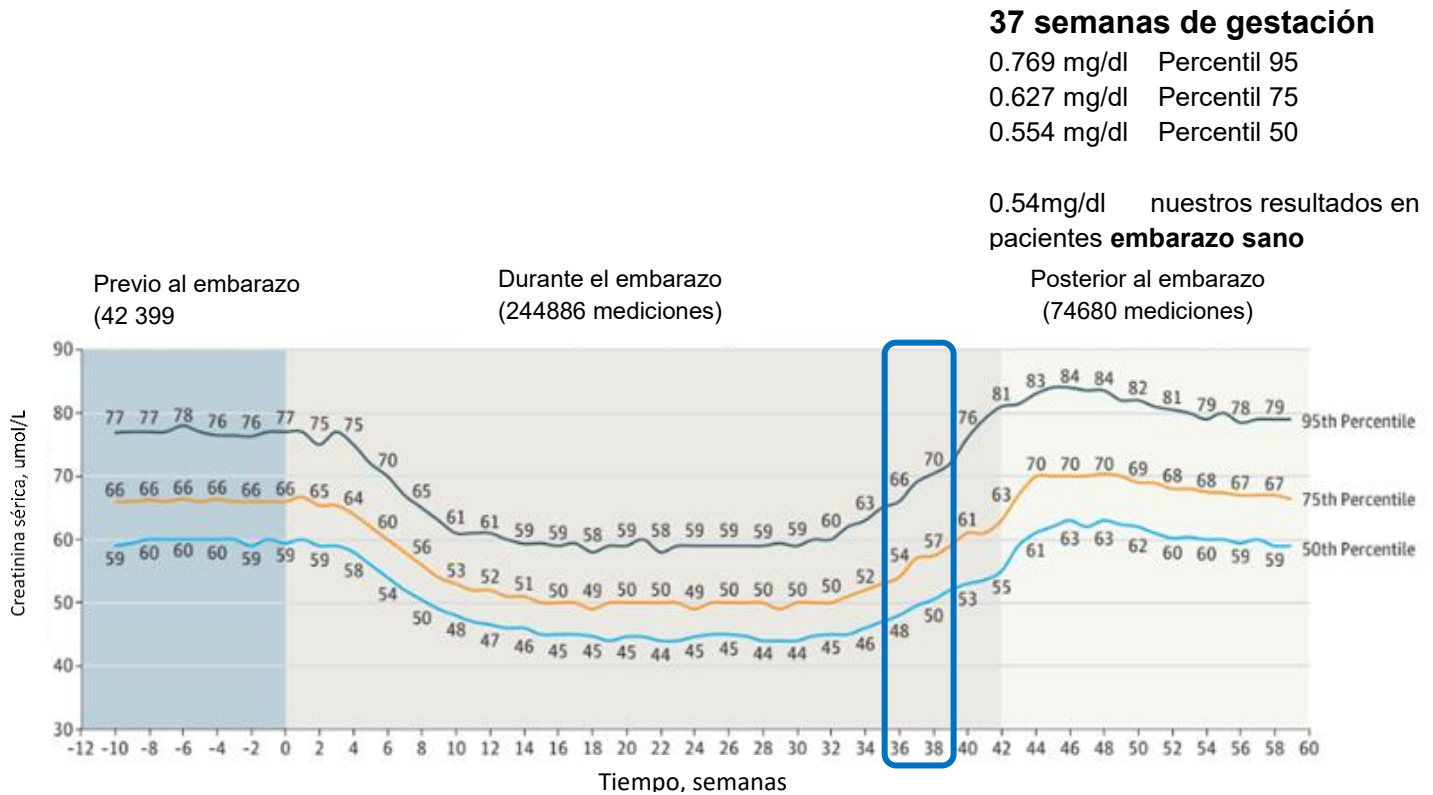


Figura 37. Cifras de creatinina previo a la gestación, durante y posterior al embarazo correspondiente por semana. Los valores adyacentes a cada curva indican el percentil específico correspondiente con el valor de creatinina sérica para cada punto del tiempo en embarazo sano. En la imagen se compara nuestros resultados en pacientes con embarazo sano. Para convertir el valor de creatinina a mg/dl, dividir por 88.4. Tomado de (39)



A pesar de que la creatinina es el biomarcador más ampliamente utilizado para la valoración de daño renal, es insensible para la detección del mismo en etapas tempranas. Los datos de Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) especifican que el nivel normal de creatinina sérica durante el embarazo es de 0.4 a 0.8 debido a una subestimación causada por el estatus de volumen dinámico(40). El daño renal en preeclampsia se ha implicado a varias razones, lo más probable es que sean cambios hemodinámicos y endoteliosis glomerular. La cistatina C ha sido estudiada intensivamente en la mujer embarazada porque es independiente del peso corporal, la masa muscular y otros cambios relacionados con el

embarazo. (40) Niraula(41), evaluó la eficiencia diagnóstica de cistatina C como un marcador temprano de función renal en preeclampsia con cifras tensionales $>140/90$ mmHg, encontrando que cistatina C tenía más alta eficiencia diagnóstica (sensibilidad 88.24%, especificidad 98.04%) comparado con creatinina y ácido úrico, el nivel de cistatina C fue de $1.15 \text{ vs } \pm 0.37 \text{ vs } 0.55 \pm 0.12$ casos vs controles respectivamente(41), en contraste con este estudio, nosotros evaluamos pacientes con preeclampsia severa (cifras tensionales $>160/110$ mmHg, encontrando nivel medio de cistatina C de 1.47 ± 0.31 preeclampsia vs 1.11 ± 0.22 controles, cifras mayores a los reportados(41), lo cual podría ser explicado por nuestro grupo de estudio (preeclampsia severa), a pesar de lo anterior, en nuestro estudio al igual que lo reportado(41), las pacientes con preeclampsia presentaron cifras más altas de Cistatina C en comparación con el grupo control.

Un hallazgo interesante que podría confirmar la presencia de daño renal subclínico al momento del diagnóstico de preeclampsia en nuestras pacientes, es que, al realizar el seguimiento al mes posterior a la resolución del embarazo, la creatinina de este grupo permaneció aumentada (0.71 ± 0.11 mg/dl en preeclampsia vs 0.6 ± 0.75 mg/dl en controles) y por lo tanto la tasa de filtrado glomerular se encontró ligeramente disminuida en los casos en comparación con el grupo control (112.65 ± 12.11 vs 125.62 ± 8.1 mmHg), aunado a lo anterior, persistieron los valores elevados de presión arterial diastólica (77.33 ± 7.9 mmHg preeclampsia vs 64.85 ± 5.01 mmHg controles), estos parámetros podrían ser factores de suma importancia ya que podrían contribuir a la presencia de complicaciones a largo plazo, ya que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, el presentar preeclampsia está asociada con un incremento al cuádruple del riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica etapa terminal en los próximos 10 años al evento de preeclampsia; así como tener uno o más embarazos con preeclampsia, un hijo con bajo peso al nacer o parto pretérmino incrementa este riesgo aún más.(42) Además de tener riesgo incrementado para complicaciones cardiovasculares.(43)

En nuestro estudio solo una paciente curso con lesión renal aguda AKIN I cumpliendo la definición por disminución de volumen urinario, sin embargo, en el embarazo la lesión renal aguda es una enfermedad heterogénea debido a una multitud de etiologías y la mayoría ocurre posparto, siendo una manifestación poco frecuente (1%), a menos que la preeclampsia

sea grave o está asociada con el síndrome de HELLP. En la población general RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss and End Stage) y AKIN (Acute Kidney Injury Network) son comúnmente utilizados para definir y clasificar lesión renal aguda pero no validados en el embarazo. Sin embargo, recientes estudios usan RIFLE y AKIN para reportar la mayoría de los casos de lesión renal aguda en el embarazo(44).

Wattanavaekin(40), evaluó si la cistatina C es un predictor de resultado obstétrico pobre en preeclampsia severa, empleando creatinina sérica y cistatina C sérica para calcular TFG mediante diferentes fórmulas, excluyó a aquellas pacientes con creatinina ≥ 0.8 mg/dL, el nivel de cistatina C encontrado fue de 0.99 a 1.86mg/L (1.43 ± 0.24 mg/L) el promedio de edad gestacional fue 37.07 ± 2.3 semanas(40), en nuestro estudio la media de cistatina C de 1.47 ± 0.31 en el grupo con preeclampsia vs 1.11 ± 0.22 en el grupo control, valores ligeramente superiores a lo reportado(40). Al realizar la comparación de las tasas de filtrado glomerular reportadas por Wattanavaekin vs nuestro grupo de estudio, con diferentes fórmulas, encontramos que con la fórmula CKD-EPI cystatin C equation (2012) la media reportada fue 53.2 ± 12.8 (48.3-58.1) ml/min vs 50.85 ± 11.97 nuestras pacientes; CKD-EPI creatinine equation (2009) 125.2 ± 11.6 (120.7-129.6) vs 102.71 ± 13.04 . MDRD equation (2006) 133.0 ± 28.3 (122.1-143.9), nuestras pacientes tuvieron 88.14 ± 10.79 ml/min, finalmente de acuerdo a la fórmula de Cockcroft-Gault Wattanavaekin et al encontró 186.7 ± 47.0 mL/min vs 123.96 ± 36.438 ml/min en nuestras pacientes. Independientemente de la fórmula empleada nuestro grupo de estudio presentó cifras de filtrado glomerular menores a las identificadas en este grupo, lo cual podría deberse a que en nuestro estudio incluimos a pacientes con niveles de creatinina máximo de 0.9mg/dl, por otro lado, estas cifras de filtrado glomerular podrían estar indicando la presencia de daño renal subclínico en nuestra población.

Además de evaluar variables bioquímicas, en nuestro estudio realizamos la medición de otros parámetros que evalúen daño renal, con la finalidad de evaluar si el incremento en la expresión de exosomas urinarios que identificamos en nuestras pacientes con preeclampsia es debido a daño renal subclínico secundario a daño tubular el cual condicione este hallazgo.

Serpina3K ha sido evaluado en diferentes panoramas, Zhang b en 2008 identificó que en pacientes con Diabetes Mellitus había una disminución de los niveles de Serpina3K, lo cual

podría representar un nuevo mecanismo patogénico para la disfunción de las células de Müller a nivel retiniano y la pérdida neuronal en diabetes.(25) A nivel renal un estudio en proceso de publicación realizado por Sánchez Navarro (*A novel role of urine serpina3k in the recognition of kidney diseases*) con el objetivo de detectar ERC en pacientes con nefritis lúpica, evaluó Serpina3K tanto en exosomas urinarios a nivel renal como a nivel sérico mediante determinación por ELISA, identificando la presencia de estas en las etapas más tempranas de las alteraciones estructurales del riñón, lo que sugiere la posibilidad de que sea un mecanismo de mediación del daño producido. En nuestro estudio, las pacientes con preeclampsia tuvieron incremento a nivel sérico y urinario de SERPIN3K vs embarazo sano sin embargo no hay ningún estudio que evalué SERPINA en el embarazo.

Respecto a Hsp-72 Morales 2014 et al (45) evaluó en pacientes críticamente enfermos los niveles urinarios de hsp72 junto con otros biomarcadores de lesión renal aguda Kim-1, IL-18, NGAL, encontrando que los niveles urinarios de Hsp72 incrementaron desde 3 días antes del diagnóstico de AKI (Acute Kidney Injury). La mejor sensibilidad/especificidad se encontró en kim-1 y Hsp72 (83/95% y 100/90%, respectivamente), donde 1 día antes del diagnóstico de AKI, el valor fue 100/100% y 100/90% respectivamente. La sensibilidad, especificidad y exactitud en la validación de la prueba para Hsp72 fue 100%, 83.3% y 90.0% respectivamente. En pacientes con preeclampsia y/o embarazo no se ha reportado el comportamiento de Hsp72, nosotros encontramos que las pacientes con preeclampsia severa se encontraba elevado los niveles séricos y urinarios, lo que podría apoyar a que estas pacientes cursan o desarrollaran daño renal subclínico.

B2- microglobulina es un polipéptido que es libremente filtrado y por lo tanto principalmente degradado y reabsorbido en el túbulo proximal a nivel renal. B2-microglobulina es un marcador de filtración glomerular en falla renal, donde la B2-microglobulina urinaria es un marcador de disfunción renal proximal. Sudan et al 1998(46) evaluó a nivel renal si la concentración sérica o urinaria era mayor en el grupo con preeclampsia versus hipertensión gestacional versus el grupo de embarazo normal, el estudio encontró que las pacientes con preeclampsia tenían similar creatinina sérica pero una B2-microglobulina sérica incrementada(3.26 ± 0.99 mg/L) en comparación al grupo de hipertensión gestacional

(2.44 ± 0.77 mg/Dl; $p=0.016$) y ambos grupos tienen mayor B2-microglobulina sérica que los controles (1.62 ± 0.54 mg/L; $p=0.001$). Nuestra concentración media de B2 microglobulina en pacientes con preeclampsia severa vs controles fue 3.11 ± 1.54 vs 1.17 ± 0.81 ($p=0.044$). Sudan(46) evaluó también la fracción excretada de B2 microglobulina urinaria no encontrando diferencias entre los grupos, concluyendo que en preeclampsia podría implicar una filtración reducida de B2 microglobulina más bien, que una alteración del manejo tubular; nosotros no realizamos la medición de la fracción excretada de B2 microglobulina urinaria, sin embargo en nuestro estudio los resultados concuerdan con un incremento de la concentración de B2 microglobulina a nivel sérico lo que podría ser resultado de la disminución de la tasa de filtrado glomerular encontrado en nuestras pacientes con preeclampsia vs embarazo sano.

Hormonas

Actualmente se conoce que los estrógenos y progesterona son de suma importancia para mantener el embarazo, incrementándose de manera significativa durante el transcurso del mismo y alcanzando su máximo nivel durante el tercer trimestre. El incremento en estrógenos durante el embarazo permite que el útero y la placenta mejoren la vascularización, transporten nutrientes y apoyen el desarrollo del feto(47),(48). (Wan et al 2018).

Los estrógenos y hormonas femeninas poseen un efecto potente vasodilatador: para prevenir el incremento en la presión sanguínea usualmente asociado con la retención de sal, estas hormonas evitan la ocurrencia de natriuresis por presión, lo cual podría explicar la frecuente queja de retención de volumen asociada con hormonas femeninas que a menudo va acompañada de formación de edema. En este sentido, en 2015 Rojas et al, reportaron que la administración exógena de hormonas femeninas (estrógeno, progesterona y prolactina) incrementaron la expresión del cotransportador Na^+Cl^- en ratas embarazadas(24), por lo que nuestra hipótesis inicial fue que las pacientes con preeclampsia presentarían niveles más altos de estrógenos y progesterona.

Hasta el momento existe controversia con respecto a la participación de estrógenos y progesterona en la preeclampsia; un estudio realizado por Wan et al, en 2018(49) en el que se evaluaron los niveles de 17β -estradiol (E2), progesterona y 2-methoxyestradiol (2-ME, metabolito de estradiol) en suero, de mujeres embarazadas con preeclampsia, y se consideró

el tiempo de inicio de la preeclampsia (temprana o tardía), así como la severidad (leve o severa), reportó que los niveles séricos de E2 (17β -estradiol), progesterona, y 2-ME, al momento del diagnóstico de preeclampsia severa se encontraban significativamente reducidos comparación con mujeres embarazadas normotensas con las mismas semanas de gestación, sin embargo, al clasificar la preeclampsia en temprana (inicio antes de las 34 semanas) y tardía (inicio después de las 34 semanas), los niveles de estrógeno persisten bajos en ambos grupos, mientras que los niveles de progesterona únicamente estuvieron disminuidos en preeclampsia de inicio temprano, en nuestro estudio las mujeres solo fueron clasificadas con y sin preeclampsia, un 27% fueron pacientes con preeclampsia de inicio temprano y 73% de inicio tardío; a pesar de eso, tanto los niveles de estradiol (33537.21 ± 140378 vs 183841.99 pg/L) como de progesterona (156.44 ± 122.29 vs 480.01 ± 264.88 ng/ml) se encontraron significativamente disminuidos en el grupo con preeclampsia ($p < 0.05$) respecto a embarazo sano.

Jobe(50), encontró que la preeclampsia especialmente la preeclampsia severa es caracterizada por una síntesis, metabolismo y niveles de estrógenos, así como de sus metabolitos aberrante. Y que aunque estos niveles están alterados particularmente son específicos y distintos(50). Por lo que no podríamos descartar la influencia hormonal en la expresión/fosforilación de los transportadores de sodio NKCC2 y NCC a pesar de haber encontrado niveles séricos bajos de ellas durante la preeclampsia en nuestro estudio, ya que no sabemos si a nivel renal también exista un metabolismo aberrante de las hormonas, por lo cual las pacientes respondan de forma incrementada con menor cantidad de hormona.

Brown MA. (1992) reportó que los niveles de aldosterona se encuentran incrementados durante el embarazo normal, aunque en preeclampsia por razones hasta ese momento inciertas, los niveles de aldosterona están disminuidos; concordando con nuestros hallazgos al momento del diagnóstico de preeclampsia, posteriormente al mes de seguimiento, las pacientes con preeclampsia presentaron cifras mayores de esta hormona, pero sin diferencia estadísticamente significativa entre los grupos; de acuerdo con Svenningsen la presencia de cifras menores de aldosterona en las mujeres con preeclampsia podría estar explicado por la proteinuria que tiene un efecto de supresión sobre esta hormona.(51)

En cuanto al transportador SGLT2 no hay nada descrito en pacientes embarazadas ni en relación a preeclampsia, sin embargo, un metanálisis (Panagiotis, 2019) evaluó el uso de los inhibidores de SGLT2 sobre la reducción de la presión arterial en pacientes con diabetes tipo 2, el cual mostro que el uso de inhibidores provoca una reducción promedio de presión arterial sistólica /diastólica de 3.62/1.70 mmHg en la presión ambulatoria de 24 horas. Este efecto de la disminución de la presión arterial permanece sin cambios respecto a la dosis del inhibidor SGLT-2 y es comparable con la eficacia de la reducción de la presión arterial con dosis bajas de hidroclorotiazida(52). En nuestro estudio encontramos una expresión incrementada de SGLT 2 en las pacientes con preeclampsia vs controles por lo que el transportador SGLT2 puede estar contribuyendo al desarrollo de hipertensión en preeclampsia.

En 2015 West et al(34), al evaluar ratas vírgenes y ratas embarazadas a mediados y finales del embarazo, observaron que en las ratas la ingesta de Na^+ y K^+ incrementaba progresivamente durante el embarazo, a pesar de un pequeño incremento en la excreción urinaria de sodio a medio término, la ingesta de Na^+ y la excreción urinaria también incrementaron progresivamente, sugiriendo una significativa retención de sodio comparadas con ratas controles virgen, en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de Na^+ y K^+ entre los grupos de estudio.

Con respecto al transportador proximal apical de sodio NHE3, los estudios realizados han sido en modelos animales, como el estudio realizado por Souza et al, que reportó un incremento en la expresión de RNA mensajero de NHE3 en ratas embarazadas, sin embargo, la abundancia de la proteína se encontró disminuida al comparar ratas embarazadas con ratas no embarazadas, en homogenados de riñón completo (Souza, 2018)(33). Este es el primer estudio en el que se evalúa la expresión del transportador NH3 en mujeres embarazadas, nosotros identificamos mayor expresión en el grupo de mujeres con preeclampsia en comparación con las mujeres con embarazo sano, estudios en ratas han reportado incremento en la expresión de RNA mensajero de NHE3.

La diferencia en la expresión del cotransportador Na⁺: Cl⁻ en su forma total y activa con respecto al género fue descrita por Chen et al.(53), quien reportó una mayor natriuresis en respuesta a la administración de diurético tipo tiazida en ratas hembra vs machos. En 2015, Rojas-Vega et al.,(24) reportaron que las hormonas ováricas (prolactina) incrementan la fosforilación y por lo tanto la activación del cotransportador Sodio-Cloro, lo cual se confirmó al realizar gonadectomía y posterior administración exógena en modelo animal, así mismo se han identificado diferencias de género en la expresión en los niveles de cinasa SPAK, no así de OSR 1, sin embargo, en las pacientes con preeclampsia severa se observó incremento en ambas cinasas (SPAK y OSR1)

En 2010 West et al, reportaron que la abundancia de la proteína total de NCC renal se encontraba sin cambios en la mitad del embarazo, tanto en el riñón completo como en la corteza renal de ratas. En 2015, West et al, identificó en tejido cortical renal de ratas los sitios de fosforilación de NCC: Thr 53, Ser 71, y Ser 89, sin que se observaran diferencias entre la abundancia de NCC total y fosforilado, al comparar ratas a mitad del embarazo vs ratas vírgenes, sin embargo, encontró que las ratas a final del embarazo presentaban disminución en la expresión del NCC total y fosforilado en comparación con las ratas vírgenes, pero que la relación entre la expresión de NCC fosforilado vs NCC total era proporcional, mientras que Chiang Hu et al, en 2018 evaluaron el sitio de fosforilación Thr 60 en mujeres embarazadas con preeclampsia y embarazo sano, identificando menor fosforilación en mujeres con preeclampsia.

A diferencia del estudio realizado por Chih-Chiang Hu, en nuestro estudio se incluyeron únicamente mujeres con diagnóstico de preeclampsia severa, de acuerdo a los criterios de la ACOG 2013 (presión arterial sistólica ≥ 160 mmHg, y/o presión arterial diastólica ≥ 110 mmHg), nuestras pacientes tuvieron cifras promedio de 166.43 ± 11.75 mmHg de sistólica y diastólica 100.00 ± 11.06 mmHg, lo que representa una diferencia de aproximadamente 10 mmHg en la presión arterial de la población de estudio, además, de que las semanas de gestación de nuestras pacientes fue mayor (36 vs 32 semanas de gestación), por otro lado, nosotros evaluamos sitios de fosforilación del NCC diferentes a los reportados en otros estudios (Thr 45, Thr 50, Thr 55); lo anterior podría explicar, el que nosotros identificamos

mayor expresión de NCC total y fosforilado en las pacientes con preeclampsia vs las mujeres con embarazo sano.

Mientras que, para el NKCC2, a pesar de que nosotros evaluamos el sitio serina 91, a diferencia de los sitios evaluados por Chih-Chiang Hu (S130, T101/105), nuestros hallazgos coinciden, ya que identificamos un incremento en la expresión de NKCC2 en las mujeres con preeclampsia vs mujeres con embarazo sano.

Tanto NKCC2 y NCC son activados por fosforilación, lo cual es asociado con la expresión en superficie y regulación primaria por la vía WNK-SPAK/OSR-1 (Chih-Chiang Hu 2018), un estudio en ratas (West 2015) reportó que tanto SPAK sitio (pS373) y OSR (S325), no presentaban diferencias en su expresión total al comparar ratas embarazadas y vírgenes, sin embargo, al evaluar la forma fosforilada, tanto SPAK como OSR se mantenían significativamente disminuidas al final del embarazo versus a mitad del embarazo. (54)

El cotransportador ENaC tiene 3 subunidades alfa, beta y gamma, se encuentra ubicado en el túbulo colector, además de ser modulado por la aldosterona. Gambling et al en 2004, reportó que las hormonas sexuales esteroideas incrementan la expresión del cotransportador ENaC en el riñón en ratas y en 2010 (West) reportó que la subunidad alfa del canal epitelial de sodio ENaC, se encontraba incrementado a mediados y al final del embarazo en ratas, posteriormente, en 2018, Chih-Chiang Hu, mostró que las pacientes con preeclampsia tenían mayor expresión de la subunidad alfa del cotransportador ENaC, lo cual coincide con los hallazgos de nuestro estudio.

5.0 Conclusiones

Nuestros resultados iniciales mostraron que la expresión de NCC y NKCC2 estaba incrementada en pacientes con preeclampsia severa. Posteriormente medimos el resto de los transportadores de sal y encontramos que las pacientes con preeclampsia tienen una excreción elevada de todos los transportadores de sodio a lo largo de la nefrona.

Las pacientes con preeclampsia tuvieron al momento del diagnóstico mayor nivel de urea, creatinina, y proteinuria respecto a mujeres embarazadas sanas, lo que sugiere un involucro renal moderado. Esto nos llevó a hipotetizar que la proteinuria condujo a daño tubular como lo sugirió el incremento de Hsp-72 y Serpina A3K, sin embargo, únicamente una paciente curso con lesión renal aguda AKIN I. El daño tubular que conduce a descamación tubular está interfiriendo sobre la estimación real del papel de los transportadores de sodio. Otra hipótesis es que exista una mayor excreción secundario a estrés oxidativo celular.

Lo anterior hace difícil valorar si la expresión de los transportadores esta incrementada a la par de su excreción, produciendo mayor reabsorción de sal y agua contribuyendo al desarrollo de hipertensión en preeclampsia, por lo que es necesario realizar más estudios que evalúen si a lo largo de la nefrona existe mayor reabsorción de sal y evaluar el nivel de sodio a nivel intersticial.

Sin embargo, encontramos incremento en la expresión de otros transportadores de sodio a lo largo de la nefrona, que no estuvieron presentes cuando la preeclampsia se resolvió, por lo que es una condición única del escenario clínico de la preeclampsia.

Identificamos que las pacientes con preeclampsia cursan con daño renal subclínico a pesar de que la cifra de creatinina en ninguna paciente fue mayor de 1.0mg/dl, aunado a esto la persistencia del incremento de la presión arterial diastólica 12mmHg mayor que las mujeres que cursaron con embarazo sano al mes de seguimiento es un factor de suma importancia que contribuye al desarrollo de complicaciones renales y cardiovasculares a largo plazo. Lo anterior da pauta a enfatizar que la mujer con preeclampsia requiere de seguimiento médico posterior al embarazo.

El análisis de exosomas urinarios por Western Blot podría ser una estrategia no invasiva que permite la realización de “biopsias renales moleculares”, por lo que podría ser una buena herramienta.

Por lo que nuestros resultados dan pie a futuros estudios que nos ayuden a entender los mecanismos de estrés celular/daño tubular por el cual la excreción de exosomas esta incrementada.

REFERENCIAS

1. Briones Vega CG, Meneses Calderón J, Moreno Santillán AA, González Díaz JI, M.A. D de LP, Garduño J.C. B. Preeclampsia: Una nueva teoría para un viejo problema. *Rev la Asoc Mex Med Crítica Y Ter INTENSIVA*. 2008;22(2):10–99.
2. Roberts James M, Druzin Maurice, August Phyllis A, Gaiser Robert R, Bakris George, Granger Joey P, Barton John R, Jeyabalan Aurun, Bernstein Ira M JDD. *Hype Rte N Sion*. 2013. 1–100 p.
3. Umesawa M, Kobashi G. Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: Prevalence, risk factors, predictors and prognosis. *Hypertens Res [Internet]*. 2017;40(3):213–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2016.126>
4. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]*. 2013;170(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.05.005>
5. Meiri H, Mandia L, Spencer K, Lapaire O, Soothill P, Burton G, et al. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta [Internet]*. 2010;32:S4–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.022>
6. Dechend R, Rakova N, Muller DN, Staff AC, Luft FC. Novel ideas about salt, blood pressure, and pregnancy. *J Reprod Immunol [Internet]*. 2013;101–102:135–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2013.04.001>
7. Boron Walter F BEL. *Fisiología MÉDICA*. 3era edici. ELSEVIER; 2017.
8. Guyton AC. Blood pressure control- special role of the kidneys and body fluids. *Science (80-)*. 2001;252(June):1813–6.
9. Glover M, Zuber AM, O’Shaughnessy KM. Hypertension, Dietary Salt Intake, and the Role of the Thiazide-Sensitive Sodium Chloride Transporter NCCT. *Cardiovasc Ther*. 2011;29(1):68–76.
10. Ghezzi C, Loo DDF, Wright EM. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia*. 2018;61:2087–97.
11. Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(9):1627–38.
12. Ares GR, Caceres P, Ortíz P. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2011;301(6):F1143-59.
13. David Pearce, Rama Soundararajan, Christiane Trimpert, Ossama B. Kashlan, Peter M.T. Deen and DEK, Abstract. Article 8 Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation. Mark L. Zeidel, MD, Melanie P. Hoenig, Paul M. Palevsky, Gary C. Curhan M, editor. 2015. 135–146 p.
14. Gamba G. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiol Rev*. 2005;85(2):423–93.
15. Gamba G, Unit MP, Nacional I, Me DC. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. 2019;423–93.
16. Ares GR, Caceres PS, Ortíz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2011;301(6):F1143--59.
17. Castañeda-Bueno M, Arroyo JP, Gamba G. Independent Regulation of Na⁺ and K⁺ Balance by the Kidney. *Med Princ Pract*. 2011;21(2):101–14.

18. Moes A.D., Van Der Lubbe N, Zietse R, Loffing J, Hoorn EJ. The sodium chloride cotransporter SLC12A3: New roles in sodium, potassium, and blood pressure regulation. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2014;466(1):107–18.
19. Azad AK, Rauh R, Vermeulen F, Jaspers M, Korbmacher J, Boissier B, et al. Mutations in the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in patients with cystic fibrosis-like disease. *Hum Mutat*. 2009;30(7):1093–103.
20. Musselman TM, Zhang Z, Masilamani SM. DIFFERENTIAL REGULATION OF THE BUMETANIDE-SENSITIVE COTRANSPORTER (NKCC2) BY OVARIAN HORMONES. *Steroids*. 2010;75(11):760–5.
21. Rojas-Vega L, Gamba G. Mini-review: regulation of the renal NaCl cotransporter by hormones. *Am J Physiol Physiol*. 2015;310(1):F10–F14.
22. Dimke H. Exploring the intricate regulatory network controlling the thiazide-sensitive NaCl cotransporter (NCC). *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2011;462(6):767–77.
23. Rojas-Vega L, Gamba G. Mini-review: regulation of the renal NaCl cotransporter by hormones. *Am J Physiol Physiol*. 2015;310(1):F10–4.
24. Rojas-Vega L, Binart N, Gamba G, de los Heros P, Reyes-Castro LA, Arroyo-Garza I, et al. Ovarian hormones and prolactin increase renal NaCl cotransporter phosphorylation. *Am J Physiol Physiol*. 2015;308(8):F799–F808.
25. Zhang B, Ma J. SERPINA3K Prevents Oxidative Stress Induced Necrotic Cell Death by Inhibiting Calcium Overload. 2008;3(12).
26. Bruchim Y, Avital Y, Horowitz M, Mazaki-tovi M, Aroch I, Segev G. Urinary heat shock protein 72 as a biomarker of acute kidney injury in dogs. *Vet J [Internet]*. 2017;225:32–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.008>
27. Mueller T, Bidmon B, Pichler P, Arbeiter K, Ruffingshofer D, VanWhy SK, et al. Urinary heat shock protein-72 excretion in clinical and experimental renal ischemia. *Pediatr Nephrol*. 2003;18(2):97–9.
28. Musia K, Zwoli D. Heat shock proteins in chronic kidney disease. 2011;1031–7.
29. Chebotareva N, Bobkova I, Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress Chaperones*. 2017;22(3):319–43.
30. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Implications for Biomarker Discovery. 2018;13(12):731–49.
31. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics [Internet]*. 2010;73(10):1907–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
32. Rafiqi FH, Morrice NA, Vandewalle A, Moleleki N, Alessi DR, Campbell DG, et al. Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci*. 2008;121(5):675–84.
33. de Souza AM., West CA, Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vázquez N, et al. Adaptive remodeling of renal Na and K transport during pregnancy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2018;14(27):379–83.
34. West CA, Mcdonoug AA, Masilamani SME, Verlander JW, Baylis C. Renal NCC is unchanged in the midpregnant rat and decreased in the late pregnant rat despite avid renal Na- retention. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2015;309:F63–F70.
35. Titze J, Dahlmann A, Lerchl K, Kopp C, Rakova N, Schröder A, et al. Spooky sodium balance. *Kidney Int*. 2014;85(4):759–67.
36. Izzedine H, Ederhy S, Goldwasser F, Soria JC, Milano G, Cohen A, et al. Management of hypertension in angiogenesis inhibitor-treated patients. *Ann Oncol*. 2009;20(5):807–15.
37. Veena P, Perivela L, Raghavan SS. Furosemide in postpartum management of severe preeclampsia: A randomized controlled trial. *Hypertens Pregnancy [Internet]*. 2017;36(1):84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1239735>
38. Gonzalez Suarez ML, Kattah A, Grande JP, Garovic V. Renal Disorders in Pregnancy: Core Curriculum 2019.

- Am J Kidney Dis [Internet]. 2019;73(1):119–30. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.06.006>
39. Harel Z, McArthur E, Hladunewich M, Dirk JS, Wald R, Garg AX, et al. Serum Creatinine Levels Before, During, and After Pregnancy. *JAMA*. 2019;321(2):205–7.
 40. Wattanavaekin K, Kitporntheranunt M, Kreepala C. Cystatin C as a novel predictor of preterm labor in severe preeclampsia. *Kidney Res Clin Pract* [Internet]. 2018;37(4):338–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619689><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6312773>
 41. Khan SA, Basnet P, Majhi S, Baral N, Dahal K, Lamsal M, et al. Cystatin-C as a Marker for Renal Impairment in Preeclampsia. *J Biomarkers*. 2017;2017:1–7.
 42. Lopes van Balen VA, Spaan JJ, Cornelis T, Spaanderman MEA. Prevalence of chronic kidney disease after preeclampsia. *J Nephrol*. 2017;30(3):403–9.
 43. Amaral LM, Cunningham MW, Cornelius DC, LaMarca B. Preeclampsia: Long-term consequences for vascular health. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:403–15.
 44. Rao S, Jim B. Acute Kidney Injury in Pregnancy: The Changing Landscape for the 21st Century. *Kidney Int Reports* [Internet]. 2018;3(2):247–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.01.011>
 45. Morales-Buenrostro LE, Salas-Nolasco OI, Barrera-Chimal J, Aparicio GC, Irizar-Santana S, Rez-Villalva RP, et al. Hsp72 is a novel biomarker to predict acute kidney injury in critically ill patients. *PLoS One*. 2014;9(10).
 46. Saudan PJ, Farrell TJ, Brown MA. β 2-Microglobulin in hypertensive pregnancies. *Am J Kidney Dis*. 1998;31(2):308–12.
 47. Wan J, Hu Z, Zeng K, Yin Y, Zhao M, Chen M, et al. The reduction in circulating levels of estrogen and progesterone in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2018;11:18–25.
 48. Schumacher M, Oudinet J-P, Lefèvre G, Chabbert-Buffet N, Liere P, Berkane N, et al. From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens. *Endocr Rev*. 2017;38(2):123–44.
 49. Wan J, Hu Z, Zeng K, Yin Y, Zhao M, Chen M, et al. The reduction in circulating levels of estrogen and progesterone in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2018;11:18–25.
 50. Jobe SO, Tyler CT, Magness RR. Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction. *Hypertension*. 2013;61(2):480–7.
 51. Buhl KB, Friis UG, Svenningsen P, Gulaveerasingam A, Ovesen P, Frederiksen-Møller B, et al. Urinary plasmin activates collecting duct ENaC current in preeclampsia. *Hypertension*. 2012;60(5):1346–51.
 52. Georgianos PI, Agarwal R. Ambulatory Blood Pressure Reduction With SGLT-2 Inhibitors: Dose-Response Meta-analysis and Comparative Evaluation With Low-Dose Hydrochlorothiazide. *Diabetes Care* [Internet]. 2019;42(4):693–700. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc18-2207>
 53. Chen Z, Vaughn DA, Fanestil DD. Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1994;5(4):1112–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7849251
 54. West CA, Mcdonoug AA, Masilamani SME, Verlander JW, Baylis C. Renal NCC is unchanged in the midpregnant rat and decreased in the latepregnant rat despite avid renal Na- retention. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2015;309:F63–F70.