



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis de los transportadores *BCRP/ABCG2* y *MRP1/ABCC1* en
placenta de mujeres con preeclampsia**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Amanda Bexidiu Castillo Escoto



Ciudad Universitaria, CDMX, 2022



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Gloria Gutiérrez Venegas

VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

SECRETARIO: Profesor: Sonia Nava Salazar

1° SUPLENTE: Profesor: Marina Gavilanes Ruiz

2° SUPLENTE: Profesor: César Luis Cuevas Velázquez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”. Torre de investigación; Departamento de Inmunobioquímica.

ASESOR DEL TEMA:



Dra. Sonia Nava Salazar

SUPERVISOR TÉCNICO:



M. en C. Aurora Espejel Núñez

SUSTENTANTE (S):



Amanda Bexidui Castillo Escoto

Este trabajo se desarrolló en las instalaciones del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) Isidro Espinosa de los Reyes, en el laboratorio de Inmunobioquímica de la torre de investigación.

Investigación realizada gracias al proyecto “Evaluación de cambios epigenéticos en la familia de transportadores de colesterol ABC y su asociación con el desarrollo de dislipidemias en el binomio madre-recién nacido con preeclampsia”, con número de Registro: **212250-3210-21001-02-15**, bajo la dirección de la Dra. Sonia Nava Salazar.

Agradezco a la sede del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por el apoyo del equipo de laboratorio, material y reactivos brindados a lo largo de toda la investigación para la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por ser mi segunda casa y brindarme el conocimiento para desarrollarme profesionalmente.

A mi asesora, la Dra. Sonia Nava Salazar por ayudarme a crecer tanto personal como profesionalmente, por todo su apoyo, confianza, amabilidad y asesoría; por darme la oportunidad de trabajar con ella, por toda la capacitación otorgada y por forjarme como un profesional de Química.

A M. en C. Aurora Espejel Núñez, por apoyarme en los procedimientos experimentales, por sus enseñanzas, su paciencia y por compartir los conocimientos volcados en esta tesis.

A la Dra. Sandra Parra y el Dr. Arturo Flores, que siempre me apoyaron experimentalmente, por todos sus conocimientos y ayuda brindados.

A los sinodales, la Dr. Gloria Gutiérrez Venegas y el Dr. Javier Plasencia de la Parra por aceptar revisar mi trabajo, por sus observaciones y correcciones para enriquecer este trabajo.

A mi padre, que a lo largo de todo mi estudio académico me brindó las necesidades y el apoyo en todo momento.

A mi madre por siempre ser mi segunda mano y nunca dejarme sola a lo largo de la carrera, por ser mi más grande apoyo, por levantarme a diario y nunca dejar que me diera por vencida, por haberme formado, educado y moldeado como la persona que soy en la actualidad.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	1
1) RESUMEN	3
2) INTRODUCCIÓN	5
2.1 PREECLAMPSIA	5
2.1.2 DIAGNÓSTICO.....	9
2.1.3 ETIOLOGÍA	13
2.2 HIPOXIA, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN LA PLACENTA.....	15
2.3 TRANSPORTADORES ABC.....	18
2.4 IMPORTANCIA DE LOS TRANSPORTADORES ABCG2 (BCRP) Y ABCC1 (MRP1) EN LA PLACENTA HUMANA.....	30
2.5 REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCC1/MRP1 Y ABCG2/BCRP	33
3) JUSTIFICACIÓN.....	37
4) PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	38
5) OBJETIVO GENERAL	38
6) OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
7) HIPÓTESIS.....	38
8) MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
8.1 MUESTRA.....	39
8.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CASOS Y CONTROLES	39
8.3 DIAGRAMA DE FLUJO	40
8.4 EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	41
8.4.1 Extracción de RNA.....	41
8.4.2 RT-PCR en tiempo real.....	41
8.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR INMUNODETECCIÓN.....	42

8.5.1 Extracción de proteínas	42
8.5.2 Cuantificación de proteínas por el método BCA	43
8.5.3 Western Blot	43
8.6 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN TEJIDO PLACENTARIO	44
8.6.1 Técnica ELISA	44
9) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
10) RESULTADOS.....	46
10.1 Análisis de expresión de ABCG2/BCRP y ABCC1/ABCG2.....	47
10.2 Análisis de los niveles de proteína de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en tejido placentario	48
10.3 Detección de los niveles de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL-1 β e IL-6 en tejido placentario	50
11) DISCUSIÓN	52
12) CONCLUSIONES	59
ANEXO I.....	60
ANEXO II.....	63
ANEXO III.....	68
13) REFERENCIAS.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a la patología preeclámptica.....	7
Tabla 2. Ensayo controlado aleatorizado con recolección de orina de 6 h y 24 h en mujeres gestacionales con sospecha de PE.....	11
Tabla 3. Marcadores bioquímicos con gran relevancia en la patología de la preeclampsia.....	11
Tabla 4. Transportadores integrales ABC en la placenta humana.....	28
Tabla 5. Criterios de inclusión y exclusión.....	39
Tabla 6. Parámetros bioquímicos y antropométricos de mujeres con embarazo normal y con preeclampsia.....	46
Tabla 7. Curva estándar BSA.....	63
Tabla 8. Gel de acrilamida/bis acrilamida 8%.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Remodelación de las arterias en espiral.....	15
Figura 2. Estructura general de las proteínas transportadoras ABC en la membrana.....	20
Figura 3. Pliegues de ABC importador I y II y exportador.....	22
Figura 4. Representación de la unión de dos ATP en los dominios NBD.....	24
Figura 5. Mecanismo del transporte de las proteínas ABC: Transporte activo.....	25
Figura 6. Localización de las proteínas transportadoras ABC en la placenta.....	26
Figura 7. Estructura de la placenta humana.....	32
Figura 8. Estructura de ABCG2/BCRP.....	34
Figura 9. Elementos regulatorios en el promotor del gen ABCG2/BCRP y factores de transcripción asociados.....	35
Figura 10. Diagrama de flujo.....	40
Figura 11. Método $\Delta\Delta C_t$	42
Figura 12. Expresión de mRNA de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1.....	48
Figura 13. Nivel de expresión de la proteína ABCG2/BCRP.....	49
Figura 14. Nivel de expresión de la proteína ABCC1/MRP1.....	50
Figura 15. Niveles de citocinas proinflamatorias: TNF- α e IL-6.....	51

Figura 16. Nivel de la citocina IL-1 β	52
Figura 17. Tinción de Coomassie	68
Figura 18. Membrana teñida con Rojo de Ponceau	69
Figura 19. Western Blot de ABCG2/BCRP	70
Figura 20. Western Blot de ABCC1/BCRP	71

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I	60
A. Carta de aceptación.....	60
B. Carta de consentimiento informado	61
ANEXO II	63
A. Cuantificación de proteínas por BCA.....	63
Preparación curva estándar (BSA)	63
Preparación del reactivo de trabajo (WR).....	63
Preparación de las muestras	63
B. Reactivos Western Blot y Elisa	64
Preparación de Tris 0.5 M pH=6.8.....	64
Preparación de Tris 1.5 M pH=8.8.....	64
Solución Stock de Coomassie	64
Solución teñidora	64
Solución desteñidora	65
APS al 10%.....	65
Buffer de corrida 10X.....	65
Buffer de transferencia 5X al 10% de metanol.....	65
Solución de lavado de membranas: PBS-T 0.1%.....	65
Buffer Stripping	66
TBS-T 0.05% pH=7.6.....	66
Preparación de muestras para electroforesis	66
Preparación de solución de bloqueo 10%.....	66
Preparación de solución de bloqueo 5%.....	66

Geles de acrilamida/bis-acrilamida al 8%	67
ANEXO III.....	68
A. Tinción de Coomassie	68
b. Membrana teñida con rojo Ponceau (transferencia).....	69
c. Western blot: ABCH2/BCRP, ABCC1/MRP1 y controles de carga (quimioluminiscencia).....	70
A. Western blot ABCG2/BCRP y GAPDH.....	70
B. Western blot ABCC1/MRP1 y α -Tubulina.....	71

ABREVIATURAS

ACOG	Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos
ACVR2A	Receptor de activina tipo 2A
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
BCA	Ensayo de ácido bicinconírico
BSA	Albúmina de suero bovino
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERAP2	Amino peptidasa II del retículo endoplasmático
ET-1	Endotelina 1
GAS6	Gen específico de supresión de crecimiento 6
GCP	Guía Práctica Clínica
GSH	Glutación reducido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IL-1β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INPER	Instituto Nacional de Perinatología
ISSHP	Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en la Gestación
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
NO	Óxido nítrico
PA	Presión Arterial
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Preeclampsia
Pi	Ortofosfato

ROS	Especies reactivas de Oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
sFlt-1	Tirosina cinasa 1 soluble
SIGLEC6	Lectina 6 similar a Ig de unión al ácido siálico
STOX1	Storkhead Box 1
TAC3	Precursor de taquicinina 3
TGF-B1	Factor de crecimiento transformante Beta-1
TMD	Dominio transmembranal
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

1) RESUMEN

El embarazo, es un proceso fisiológico que genera una serie de cambios metabólicos, desde los niveles hormonales, hasta el perfil de lípidos. La preeclampsia es una de las principales complicaciones del embarazo y su etiología aún no es completamente elucidada. Diversos estudios sugieren que alteraciones en el desarrollo de la placenta pueden desencadenar los síntomas característicos de esta patología, tales como hipertensión, proteinuria, edema, acufenos, cefaleas, escotomas, fotopsia, etc. La placenta de mujeres con PE presenta un estado de hipoxia e incremento de citocinas proinflamatorias asociadas a estrés oxidativo e inflamación en comparación con las mujeres con un embarazo normal. La familia de proteínas transportadoras ABC son abundantes en la placenta, y tienen una función muy importante ya que la gran mayoría de ellas tienen un papel en la citoprotección del feto debido a sus propiedades de eflujo activo que limitan el paso de los xenobióticos o fármacos dañinos a la circulación fetal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 ya que ambos están implicados en el transporte de fármacos, xenobióticos y moléculas antioxidantes. Se realizó un estudio observacional, analítico, retrospectivo y transversal. En muestras de tejido placentario de mujeres con un embarazo normal y con preeclampsia, se evaluaron los niveles de transcrito y de proteína de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1, por medio de PCR en tiempo real y Western Blot, respectivamente. Por medio de la técnica de ELISA se midieron las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β para corroborar su participación en la regulación de ambos transportadores. Los resultados experimentales encontrados en PCR en tiempo real y Western Blot indican una menor expresión de ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en la placenta de mujeres con preeclampsia en comparación con aquellas que desarrollaron un embarazo normal. Las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β se encuentran aumentadas en la placenta de mujeres preeclámpticas.

La disminución de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1, mediada probablemente por moléculas proinflamatorias, podría repercutir en la disminución del transporte de diversas moléculas, tales como prostaglandinas, 17β -estradiol, glutatión, y glucosa, entre otros. Dichas moléculas regulan el desarrollo de un embarazo exitoso, por lo que las alteraciones en su transporte podrían estar implicadas en el desarrollo de la preeclampsia.

2) INTRODUCCIÓN

El embarazo humano es un proceso fisiológico que involucra múltiples ajustes anatómicos para el desarrollo y crecimiento del feto. Sin embargo, existen patologías donde la hipertensión arterial juega un papel importante, puesto que altera e impide que el proceso llegue a término.

Algunas de estas patologías son los llamados trastornos hipertensivos del embarazo que tienen implicaciones clínicas importantes ya que comprometen el bienestar de la madre, del feto y al proceso mismo de la gestación. Los síndromes hipertensivos son la principal causa de muerte materna mundial en países desarrollados y la tercera en países en vía de desarrollo¹²⁰, con una incidencia del 6-8% de casos y alrededor del 13-40% se complican y agravan desarrollando PE.^{1,2} Dichos trastornos se clasifican en 4: hipertensión gestacional, hipertensión agregada, preeclampsia y eclampsia, siendo la preeclampsia la de mayor importancia.

2.1 PREECLAMPSIA

El Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) actualmente definen la preeclampsia (PE) como una enfermedad hipertensiva específica del embarazo, es un síndrome multisistémico de severidad variable que se puede presentar después de la semana 20 de gestación y puede desencadenar problemas de salud, tanto para la madre como para el recién nacido, a corto plazo o en la vida adulta.

La PE se caracteriza por hipertensión arterial, edema y proteinuria; es una de las principales causas de muerte para el feto y la madre, afecta del 2 al 8% de las mujeres gestantes y se ha convertido en un problema a nivel mundial por ser la causa importante de morbilidad y mortalidad materna y fetal.³

En México, la PE es la principal causa de muerte materna, en Instituciones del Sistema Nacional de Salud abarca un 25%. Por cada 2.1 millones de embarazos al año, cerca de 250,000 a 300,000 mujeres tienen complicaciones

en su embarazo, y en promedio de las mujeres que tienen esas complicaciones fallecen 1000.¹

La PE puede generar en las mujeres a largo plazo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales, y durante el período de la gestación conducen a una restricción del crecimiento y oligohidramnios que conllevan a partos prematuros; ^{4,5} la restricción del crecimiento intrauterino es uno de los factores más comunes en la mortabilidad fetal y se asocia a un parto prematuro, lesión hipóxica cerebral y un puntaje de Apgar bajo,⁶ los neonatos de mujeres con PE de aparición temprana, tienden a un peso aproximado al nacer 23% más bajo que los de un embarazo normal, y en consecuencia aumenta la tasa de mortalidad fetal. A largo plazo, los bebés en su vida adulta pueden tener complicaciones en su salud parecidos a los de la madre, como enfermedades cardiovasculares.^{7,8}

La incidencia de la hipertensión gestacional en mujeres primigestas es del 6 al 17% de los casos mientras que las mujeres que no lo son presentan de un 2 al 4%, sin embargo, la incidencia de preeclampsia leve en las primigestas oscila entre el 2-7% y aproximadamente el 75% de las mujeres embarazadas desarrollan la PE en la semana 37 de gestación.⁹

La gravedad de la preeclampsia se basa en que puede descontrolarse y con ello desarrollar eclampsia, una complicación neurológica que deriva de la PE, y que se define como una manifestación convulsiva tónico-clónicas generalizadas no relacionadas con otras afecciones médicas en mujeres con trastorno hipertensivo del embarazo. El 10% de los embarazos se complican a trastornos hipertensivos, sin embargo la eclampsia solo se presenta en el 0.8% de las mujeres con dichos trastornos. La eclampsia se asocia a un riesgo mayor de muerte materna en países desarrollados hasta un 7%, además del riesgo de mortabilidad materna, las mujeres que presentan eclampsia tienen un mayor riesgo de complicaciones graves como enfermedades cerebrovasculares (1%), insuficiencia cardíaca (2-4%), miocardiopatía (3-9.5%), paros cardíacos (0.5%) desprendimiento de placenta (7-12%), edema pulmonar (3-12%) e insuficiencia

renal aguda (3-8.8%). Mientras que para la mortalidad perinatal oscila entre 5.6% hasta un 11.8% de casos y sus complicaciones llegan con un mayor riesgo de comprometer el crecimiento fetal y prematuridad (síndrome de dificultad respiratoria y muerte neonatal).^{10,11}

Dentro de los principales factores de riesgo asociados a PE se encuentran la hipertensión crónica, antecedentes de preeclampsia en embarazos anteriores, edad avanzada, diabetes mellitus pregestacional, obesidad, síndrome antifosfolípido, entre otros (*Tabla 1*).

Se sabe que el riesgo de PE se eleva en mujeres gestantes con historia previa de PE, donde el sobrepeso y la insuficiencia renal también comprometen al desarrollo de la enfermedad.^{12,13}

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a la patología preecláptica

Antecedente familiar de preeclampsia	Asociado a los genes <i>ACVR2A</i> , <i>ERAP2</i> , <i>GAS6</i> , <i>SIGLEC6</i> , <i>STOX1</i> , <i>TAC3</i> , <i>TGFB1</i> .
	RR (IC 95%): 8.4 (7.1–9.9)
Primigravida	Estudios cohortes asocian un aumento significativo de la PE en mujeres primigestas. ^{14,15}
	RR (IC 95%): 2.1 (1.9–2.4)
Diabetes pregestacional	Asociada al aumento de estrés oxidativo y un estado inflamatorio placentario.
	RR (IC 95%): 3.7 (3.1–4.3)
Enfermedad renal	Los problemas renales se encuentran asociados a presentar isquemias uteroplacentarias, reducen PIGF.

RR (IC 95%): 1.8 (1.5–2.1)

Síndrome antifosfolípidos

Asociado a generar trombofilias. Los anticuerpos antifosfolípidos (anticardiolipina IgG o IgM, Anti-β2-glicoproteína I IgG o IgM, anticardiolipina o anti-β2 glicoproteína I IgA) causan disfunción placentaria isquémica, abortos espontáneos, partos prematuros, muerte fetal y restricción del crecimiento intrauterino.

RR (IC 95%): 2.8 (1.8–4.3)

Edad avanzada ≥30 años

Vulnerables a presentar enfermedades de aterosclerosis, enfermedades renales e hipertensión. La condición se asocia a un prolongado envejecimiento placentario.

RR (IC 95%): 1.2 (1.1–1.3)

Hipertensión arterial crónica

Asociado a un desprendimiento placentario, aumenta el riesgo de embarazo y aborto prematuro.

RR (IC 95%): 5.1 (4.0–6.5)

IMC de ≥25 Kg/m²* y ≥30 Kg/m²**

Las mujeres con sobrepeso y obesidad durante el embarazo generan un aumento en el estado inflamatorio placentario de manera crónica, riesgo de diabetes, trastornos hipertensivos y anomalías congénitas.

***RR (IC 95%): 2.1 (2.0-2.2)**

****RR (IC 95%): 2.8 (2.6–3.1)**

Lupus Eritematoso sistémico Asociado a una alteración de los linfocitos T Hellper y disfunción inmunológica agravada ocasionando parto prematuro y nefritis lúpica.

RR (IC 95%): 7.8 (4.8–12.9)

Infecciones urinarias* y bacterianas** Asociada a una inflamación y aumento de citocinas e interleucinas proinflamatorias.

***RR (IC 95%): 1.22 (1.03–1.45)**

****RR (IC 95%): 1.76 (1.43–2.18)**

Otros factores asociados: Embarazo multifetal, primipaternidad, apnea obstructiva del sueño, exposición limitada de esperma, periodo intergenésico mayor a 10 años.^{16,17.}

RR: Riesgo relativo; **IC:** Intervalo de confianza; **IMC:** Índice de Masa Corporal

2.1.2 DIAGNÓSTICO

La hipertensión juega un papel importante en la patología preecláptica y es por eso que se define como una presión arterial sistémica; en mujeres embarazadas esta presión arterial oscila entre <120/80 mmHg³ de manera normal, mientras que para definir una preeclampsia este valor tendrá una presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y una presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg en dos mediciones con 4 horas de diferencia de acuerdo a las guías de práctica clínica de México (GCP, IMSS),¹⁸ también viene acompañado de cefaleas, acufenos, visión borrosa y náuseas.¹⁹

El diagnóstico clínico de la PE se basa tomando en cuenta los criterios de la Sociedad Internacional para el estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP) 2018:²⁰

Hipertensión de nueva aparición (PA sistólica ≥ 140 mmHg y PA diastólica ≥ 90 mmHg) después de la semana 20 de gestación acompañada de una o más de las siguientes condiciones:

1. Proteinuria ≥ 0.3 g de proteína en una muestra de orina de 24 horas. La integridad de la recolección de orina de 24 horas se puede estimar a partir de la excreción de creatinina que debe ser de 15-20 mg/kg del peso total magro.
2. Insuficiencia renal (creatinina 1 mg/dL), elevación de transaminasas o dolor abdominal epigástrico, ceguera, cefaleas, acúfenos, escotomas visuales persistentes y trombocitopenias (debajo de 150,000/dL).
3. Disfunción uteroplacentaria (restricción del crecimiento fetal).

Hoy en día, el diagnóstico de preeclampsia se clasifica como de inicio temprano o tardío, mismo que justifica la severidad de la enfermedad, siendo la de inicio temprano la de mayor severidad y con mayor riesgo materno-fetal. El deterioro progresivo del estado de la madre y el feto, se relaciona fuertemente con diversas complicaciones como la restricción del crecimiento fetal intrauterino, desprendimiento prematuro de la placenta, síndrome de HELLP (por sus siglas en inglés Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelets, y que se caracteriza por hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y bajo conteo de plaquetas), eclampsia, y enfermedad cardiovascular.²¹

Otra de las características clínicas de la PE son los niveles elevados de proteína en orina, la proteinuria se debe al edema de las células endoteliales fenestrado en los podocitos renales,²¹ la detección de proteinuria se basa en la recolección de orina en las primeras 24 horas (considerado el tiempo estándar de recolección) donde se miden los niveles de creatinina urinaria que debe ser mayor o igual a 300 mg, este valor se utiliza como criterio para diagnosticar la PE. Algunos estudios han puesto a prueba la precisión de la recolección de orina en las primeras 24 horas donde se han realizado comparaciones entre los tiempos de la toma de muestra, un ensayo control aleatorizado hizo recolecciones de orina a las 6 horas y 24 horas (*Tabla 2*), donde concluyeron que a las 6 horas de

recolección resultó factible para indicar la sospecha de PE con un rango de 168-475mg, sin embargo, se propuso completar la recolección a las 24 horas.²²

Tabla 2. Ensayo controlado aleatorizado con recolección de orina de 6 h (n=51) y 24 h (n=50) en mujeres gestacionales con sospecha de PE.

	Recolección de orina de 6 h.	Recolección de orina a las 24 h.
Edad gestacional	35.3±3.2	35.1±3.6
Proteinuria >300 mg	43.1%	42%
Mujeres que tuvieron PE	45%	26%

Diversos factores involucrados en la fisiopatología de la preeclampsia se han propuesto como predictores de diagnóstico (*Tabla 3*). La medición de factores angiogénicos, tales como sFlt-1, endoglina soluble y pro-angiogénicos como PIGF y VEGF han resultado de gran utilidad como posibles predictores, por lo que ya se encuentran contemplados en la guía práctica de clínica.^{23,24}

Tabla 3. Marcadores bioquímicos con gran relevancia en la patología de la preeclampsia.

↓ Factor de crecimiento placentario (PIGF)	Promueve la viabilidad de las células endoteliales, produce un efecto quimiotáctico sobre los monocitos e interviene en procesos de angiogénesis. Se encuentra aumentado en los dos primeros trimestres de embarazo, sin embargo en PE disminuye.
---	---

↑ **Forma soluble de la tirosina cinasa 1 (sFlt-1).**

Funciona como receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PIGF), una de sus funciones es la angiogénesis y la vasculogénesis. Las concentraciones de sFlt-1 son más altas desde el comienzo de la gestación en mujeres PE.

↑ **Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A)***

Es una hormona producida en el trofoblasto y secretada al suero materno. En el segundo trimestre de embarazo de mujeres PE se asocia una disminución sin embargo, en el tercer trimestre es mayor.

↑ **Endoglina soluble**

Correceptor de los factores de crecimiento transformantes beta. Se encuentra elevada en mujeres con PE y se correlaciona con la severidad de la fisiopatología en las semanas 17 y 20.

↓ **Proteína placentaria 13.**

Es un dímero de un peso molecular aproximado de 32 kDa, se cree que está involucrado en la implantación placentaria, remodelación vascular y regulación de la presión sanguínea. En la semana 11-13 de gestación se encuentra una disminución.

↑ **Inhibina A**

Es una glucoproteína dimérica producida en la placenta y otros tejidos. Aumenta 10 veces más en mujeres PE.

↑ Aumento ↓ Disminución

*Los niveles elevados de proteína plasmática A en preeclampsia y síndrome HELLP no predice la severidad de estas fisiopatologías, contiene una tasa de falsos positivos alta.^{23,25}

Es probable que la PE pueda presentarse sin manifestar la hipertensión, sin embargo la ISSHP mantiene la hipertensión de nueva aparición como diagnóstico definitivo de la preeclampsia.²⁶

2.1.3 ETIOLOGÍA

El origen de la PE es desconocido pero existen teorías que podrían relacionarse y explicar el origen de esta patología. Una de las teorías más estudiadas y aceptadas es la invasión trofoblástica anormal de los vasos uterinos de la placenta. En estudios y ensayos con animales han demostrado una estrecha relación entre una placentación anormal con la isquemia uteroplacentaria, la cual es responsable de la activación de factores tóxicos solubles en la circulación materna que promueven la inflamación y la disfunción endotelial.^{27,28,29}

En las primeras fases del embarazo normal, las arterias espirales localizadas en la decidua materna tienen un cambio histológico donde hay una desintegración de la lámina elástica interna formando una delgada capa de membrana basal entre el endotelio y la capa muscular; posteriormente alrededor de las 6 y 12 semanas de gestación las arterias espirales son invadidas por el tejido trofoblástico extraembrionario y alcanzan las arterias radiales del miometrio a partir de la semana 14 y 20. Las arterias espirales pierden su revestimiento endotelial y el músculo liso de sus paredes formando así arterias de mayor calibre que se dilatan gracias a los efectos vasoactivos de los estrógenos, logrando así un flujo sanguíneo eficiente entre la madre y el feto. En la PE este proceso no ocurre de manera correcta, las células trofoblásticas no alcanzan las arterias espirales provocando una invasión deficiente e impidiendo la remodelación adecuada (*Figura 1*), este evento limita el paso del flujo sanguíneo y el intercambio de nutrientes, debido a la inadecuada vasodilatación de la arteria espiral que aún conserva su músculo liso que actúa como constrictor.^{21,30,31}

Otro efecto del fracaso en la invasión trofoblástica de las arterias espirales, es la entrada limitada de oxígeno hacia la circulación fetal provocando isquemia e hipoxia, lo que conduce a un incremento en la expresión de HIF- α ³² y la liberación de múltiples factores solubles por parte de la placenta hacia la circulación materna. Debido a la disminución gradual de oxígeno se genera estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria exacerbada, lo cual lleva a una disfunción endotelial y activación del sistema de la coagulación. La disfunción endotelial en la placenta de mujeres con PE genera una activación de la coagulación vascular (trombocitopenia), un aumento de la permeabilidad capilar (edemas y proteinuria), y la disminución del óxido nítrico (vasoespasmos e hipertensión).

Se ha demostrado que en la sintomatología de la PE, existe un desbalance entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos que conlleva a una reducción en la perfusión uteroplacentaria. Algunos de los factores angiogénicos más estudiados en la preeclampsia son el factor de crecimiento vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PIGF) los cuales se han reportado que disminuyen; de manera inversa los factores antiangiogénicos, tales como la tirosina cinasa soluble (sFlt-1) y la endoglin soluble (sEng) aumentan. La sFlt-1 actúa como antagonista inhibiendo a VEGF y PIGF, la primera es muy importante para la función de las células endoteliales que se encuentran en los glomérulos y el hígado (órganos afectados en la PE), mientras que PIGF es importante en la angiogénesis.^{12,28,33,34}

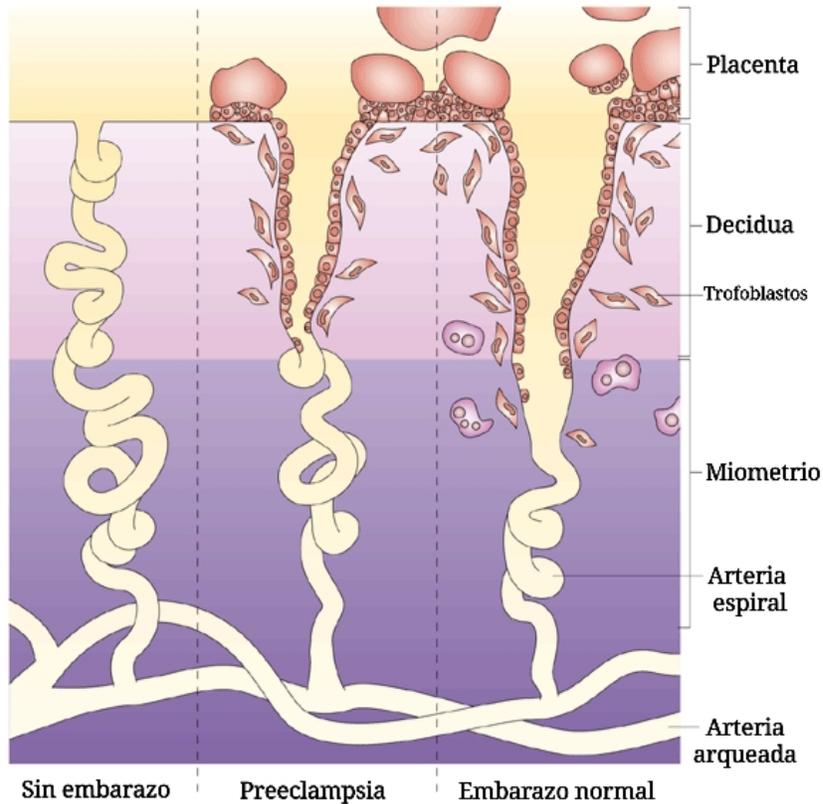


Figura 1. Remodelación de las arterias en espiral. A. Miometrio sin embarazo B. En la PE el revestimiento de las células trofoblásticas disminuye, en consecuencia existe menor flujo placentario, provocando isquemia e hipoxia crónica. C. Durante la gestación normal los vasos quedan revestidos por células trofoblásticas permitiendo una adecuada perfusión placentaria. (Modificada de Bell et al.; 2004)³⁵

2.2 HIPOXIA, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN LA PLACENTA

El tejido placentario en condiciones normales requiere de una gran cantidad de oxígeno, en este proceso las arterias espirales denominadas arterias utero-placentarias al atravesar el espacio intervelloso del utero juegan un papel importante, ya que son las encargadas del intercambio de oxígeno de la madre hacia el feto. En el caso de la preeclampsia, la invasión trofoblástica deficiente en las arterias radiales maternas así como la mala perfusión uteroplacentaria son la causa primordial que genera isquemia placentaria y a su vez, hipoxia crónica.

La hipoxia es el estado en donde hay una deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos del organismo. Durante la PE, en la placenta se produce una vasculopatía decidual, caracterizada por una lesión aterosclerótica aguda de los vasos sanguíneos (placas de ateromas cargadas de lípidos), hipertrofia de la capa media con una mayor capacidad contráctil y linfocitos perivasculares que aumentarán las citocinas proinflamatorias, provocando disfunción endotelial y la vasoconstricción, en consecuencia rupturas membranales del tejido placentario y aborto prematuro.³⁶

Dos de los principales propósitos en la remodelación de las arterias espirales son reducir la velocidad y la presión de la sangre materna al ingresar a los espacios intervillosos. Cuando la sangre materna ingresa a través de las intervillosidades intercambia nutrientes con la vasculatura fetal, el requerimiento de oxígeno durante la gestación aumenta para satisfacer las demandas tanto de la placenta como del feto. Una arteria radial de gran calibre en la placenta reduce en gran medida la presión arterial,³⁷ esta reducción de la presión arterial es indispensable dentro del espacio intervilloso placentario para prevenir el colapso de los capilares vellosos del feto y permitir que la circulación fetal con baja presión perfunda en la red capilar vellosa inmersa de la circulación materna que se encuentra a una presión más alta, además de reducir la contractibilidad vasomotor materno para evitar que la sangre materna se desvíe fuera de la placenta.^{37,38} En la PE esto no sucede así, la conversión deficiente de las arterias espirales dispara la presión arterial y disminuye el transporte de oxígeno entre la madre y el feto, ocasionando trombosis, deposición de fibrina dentro de los vasos ayudando gradualmente a mantener la hipertensión y dependiendo de la gravedad, causar un estrés del retículo endoplásmico y restricción del crecimiento fetal relacionado con estrés oxidativo.

La isquemia es producida por una obstrucción en los vasos sanguíneos maternos, al mantener una longitud del vaso menor, exceso de plaquetas y microtrombos impiden el buen paso de los glóbulos rojos y se generan coágulos en la sangre debido a la hemólisis de estos, el impedimento del oxígeno producirá

que el organismo busqué formas de mantener el buen funcionamiento y se activará un mecanismo en donde se encuentren los factores de transcripción HIF-1 α , se sabe que este factor e HIF-2 α se encuentran aumentadas en la placenta durante condiciones de hipoxia.³⁹ HIF-1 α , activa la apoptosis por la vía p53, generando muerte celular en los tejidos, la importancia de este factor en la PE radica en que es clave para la estimulación de genes como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), mismo que se ve aumentando en la hipoxia.

La liberación de factores vasoactivos debido a la respuesta de hipoxia para ayudar a aumentar la perfusión placentaria, como sFlt-1, citocinas e interleucinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , anticuerpos de angiotensina II tipo 1 (AT1-AA) y tromboxanos como A₂, promueven la disfunción endotelial placentaria debido a la grave disminución de vasodilatadores como óxido nítrico (NO), prostaglandina I₂ y el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y endotelina-1 (ET-1).⁴⁰

Estos desequilibrios angiogénicos y antiangiogénicos provocan un desbalance en la placenta generando daño en los tejidos, lisis de células endoteliales, disrupción del endotelio, incremento en la permeabilidad vascular y la peroxidación lipídica ya que los mecanismos antioxidantes no pueden contrarrestar el proceso de oxidación.

Un periodo de hipoxia prolongado, como sucede en la mujer preecláptica va a ocasionar una disminución de la fosforilación oxidativa mitocondrial, activando la vía anaeróbica y en consecuencia una reducción en el trifosfato de adenosina (ATP) y aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lactato. Un estudio ha demostrado que el ATP disminuye y el lactato aumenta después del parto.⁴¹ Además, se ha relacionado con la hipoxia la necrosis del sincitiotrofoblasto.^{42,43}

De manera general la hipoxia genera el estrés oxidativo y contribuye a la producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6 generando así un proceso inflamatorio, evento que podría explicar los infartos que caracteriza a las mujeres de PE grave.⁴⁴

El estrés oxidativo en el tejido endotelial placentario se va a presentar cuando existe una sobreproducción de especies reactivas de oxígenos como anión superóxido O_2^- y H_2O_2 , provocando un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes de las células, favoreciendo a las moléculas oxidantes, esta alteración es provocada por la activación incrementada de leucocitos, la perturbación del transporte de electrones en las mitocondrias, y las alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico, estas activaciones son causa de factores endógenos como la isquemia y la mala perfusión.^{111,121}

Las ROS generan daños oxidativos en los trofoblastos de la placenta, la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa y el aumento de la expresión en las subunidades se producen en respuesta a una serie de estímulos como la angiotensina II, las citocinas y los factores de crecimiento derivado de plaquetas.⁴⁵

El daño que pueden ocasionar las ROS es a la alteración de proteínas, donde la oxidación de éstas resulta en un plegamiento anormal del retículo endoplasmático o la disfunción de las enzimas o sus receptores.⁴⁶

Desde el punto de vista fisiopatológico se pueden considerar tres puntos fundamentales para el inicio de la PE: 1) la isquemia que conlleva a hipoxia placentaria; 2) el desequilibrio de factores angiogénicos y antiangiogénicos, y 3) la disfunción endotelial y el estrés oxidativo que se genera en la placenta por esta patología. Estas alteraciones pueden contribuir a hiperuricemia y alterar el funcionamiento y actividad de ciertos transportadores proteicos que se encuentran en la placenta como son los transportadores ABC, y así, afectar la protección y salud fetal.

2.3 TRANSPORTADORES ABC

La expresión y la actividad de los transportadores placentarios humanos durante el embarazo podrían verse alteradas por varios factores, incluidos los cambios patológicos asociados con la PE, las proteínas ABC son uno de los

principales transportadores activos primarios en la placenta que ayudan a expulsar sustancias clínicamente importantes.

La familia de transportadores dependientes de ATP (ABC, por sus siglas en inglés: ATP-Binding Cassette) son proteínas transmembranales ubicuas, altamente conservadas tanto en eucariontas, como en procariontas. En las células eucariotas los transportadores ABC cumplen diversas funciones y son transportadores de eflujo (exportadores) y se encuentran implicados principalmente en la salida de xenobióticos, metabolitos y fármacos a través de las membranas celulares y el movimiento de algunas moléculas endógenas, para realizar el correcto transporte de sustratos a través de las membranas requieren de energía de la hidrólisis de ATP para el transporte de algunos lípidos, ácidos biliares, medicamentos y compuestos hidrófobos. La mayoría de los transportadores ABC en humanos se encuentran en la membrana plasmática pero también pueden ser encontrados en organelos intracelulares como el retículo endoplasmático y las mitocondrias.^{47,48}

Se clasifican en siete subfamilias, esta clasificación se basa de acuerdo a las organizaciones de sus dominios y la homología de su secuencia primaria: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF y ABCG, que a su vez se dividen en subgrupos.⁴⁹

La subfamilia ABCC tiene trece miembros de los cuales nueve son conocidos como proteínas de farmacoresistencia múltiple (MRP), mientras que ABCG consta de seis transportadores; se han identificado más de 40 transportadores específicos. De las subfamilias ABCG/BCR y ABCC/MRPs, al menos 11 transportadores están involucrados en la resistencia a múltiples fármacos.^{50,51,52}

La estructura de los transportadores ABC consisten principalmente en cuatro dominios funcionales característicos: Dos dominios transmembranales (TMD) que son los responsables de que las moléculas transportadas atraviesen la membrana y dos dominios citosólicos o dominios de unión a nucleótidos (NBD) que unen ATP y transfieren la energía para transportar el sustrato a través de la membrana

(Figura 2). Los dos dominios TMD están conformados generalmente por hélices α que se extienden a lo largo de la membrana y forman una vía a través de la cual el sustrato o molécula transportada atraviesa la membrana y determina la especificidad del sustrato de cada una de las proteínas ABC, es decir, la especificidad está determinada por uno o más sitios de unión ubicados en los TMD, algunos transportadores ABC transportan una sola molécula de sustrato en su ciclo de transporte involucrando un solo sitio de unión, sin embargo, en algunas proteínas MRP como MRP1/ABCC1 y MRP4/ABCC4 contienen múltiples sitios de unión al sustrato, al transportar fármacos citotóxicos y glutatión reducido (GSH), este se une a diferentes sitios de unión, ya que cada tipo de proteína ABC está especializado en transportar un sustrato específico o varios sustratos parecidos entre sí.^{51,53,54} En las células eucariotas la mayoría de los transportadores ABC están constituidos por un solo polipéptido que contiene los cuatro dominios funcionales, pueden ser un homodímero como en el caso de ABCG2/BCRP o heterodímero como ABCC1/MRP1.

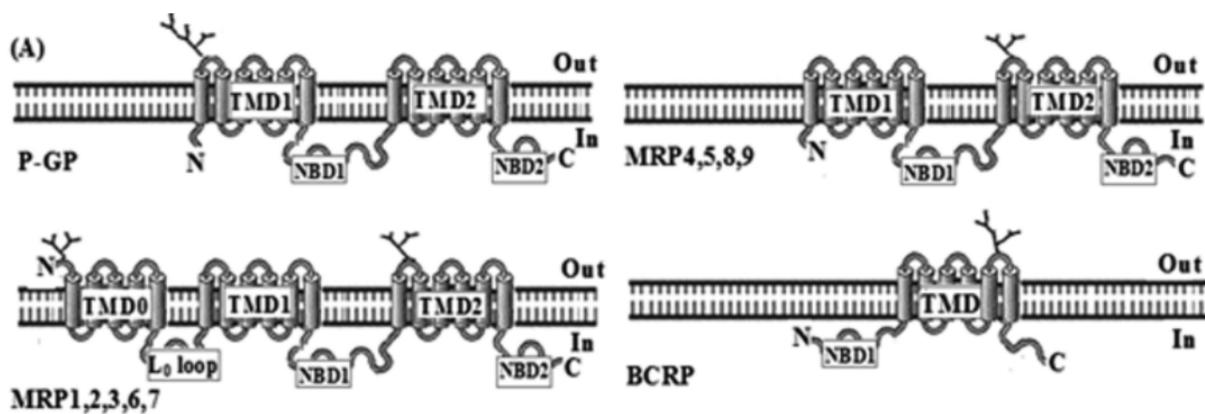


Figura 2. Estructura general de las proteínas transportadoras ABC en la membrana. Los dominios de unión a nucleótidos (NBD) se encuentran en la parte citoplasmática, (TMD) son los dominios transmembranales, el compartimiento “Out” representa el espacio extracelular y el compartimiento “In” el espacio intracelular. **A.** Representación esquemática secundaria de la **Glicoproteína P o ABCB1**, primer transportador de tipo ABC descubierto, consta de una sola cadena polipéptica de 1281 aminoácidos con extremos NH₂ y COOH, contiene 2 TMD (cada uno de los TMD consta de 6 hélices α que atraviesan la membrana celular) y 2 sitios NBD que actúan como sitio de unión de ATP, el primer bucle

extracelular contiene tres sitios de glicosilación. **B.** Representación esquemática secundaria general de **MRP 4,5,8 y 9** su estructura es similar a ABCB1, la diferencia radica en sus sitios de glicosilación y el número de aminoácidos. **C.** Representación esquemática secundaria general de **MRP 1,2,3,6, y 7** estos transportadores cuentan con una característica única que se encuentra solo en estas cinco proteínas transportadoras con la presencia de un dominio transmembranal NH₂ terminal adicional (TMD₀) ausente en la glicoproteína P y algunos MRP's, los dominios TMD₀ y TMD₁ se encuentran unidos por el bucle citoplasmático "Loop", este enlazador es fundamental para el plegamiento y función. **D.** Representación esquemática secundaria general de **BCRP/ABCG2**, con un solo TMD, la estructura membranal de solo 6 hélices α no es funcional. (Tomado de Liu et al.; 2019)^{51,56}

Los dominios TMD contienen un total de doce hélices α (seis para cada dominio), estas subunidades que atraviesan la membrana son estructuralmente heterogéneas con tres diferentes conjuntos de pliegues: ABC importador tipo I, ABC importador tipo II y ABC exportador; los pliegues de los importadores tipo I y II generan la nomenclatura y refleja la secuencia de pliegues distintos entre cada una de las proteínas ABC (Figura 3), tanto los transportadores ABC importadores como los exportadores se encuentran en bacterias, mientras que la gran mayoría de los miembros de la familia eucariota funcionan en la dirección exportadora puesto que los pliegues de tipo ABC exportador es el que predomina en las proteínas ABC de las células eucariotas.^{57,58}

Los TMD no muestran en general una conservación de secuencia significativa, pero comparten una topología similar dentro de cada una de las clases de los transportadores al menos en células eucariotas, la falta de conservación de la estructura primaria de los dominios TMD puede asociarse a la naturaleza diversa de cada sustrato transportado que interactúa con los residuos de las hélices α , un ejemplo de ello es la glicoproteína P donde se han asociado varios sitios de unión a fármacos generando una poliespecificidad en esta proteína.^{59,60,61}

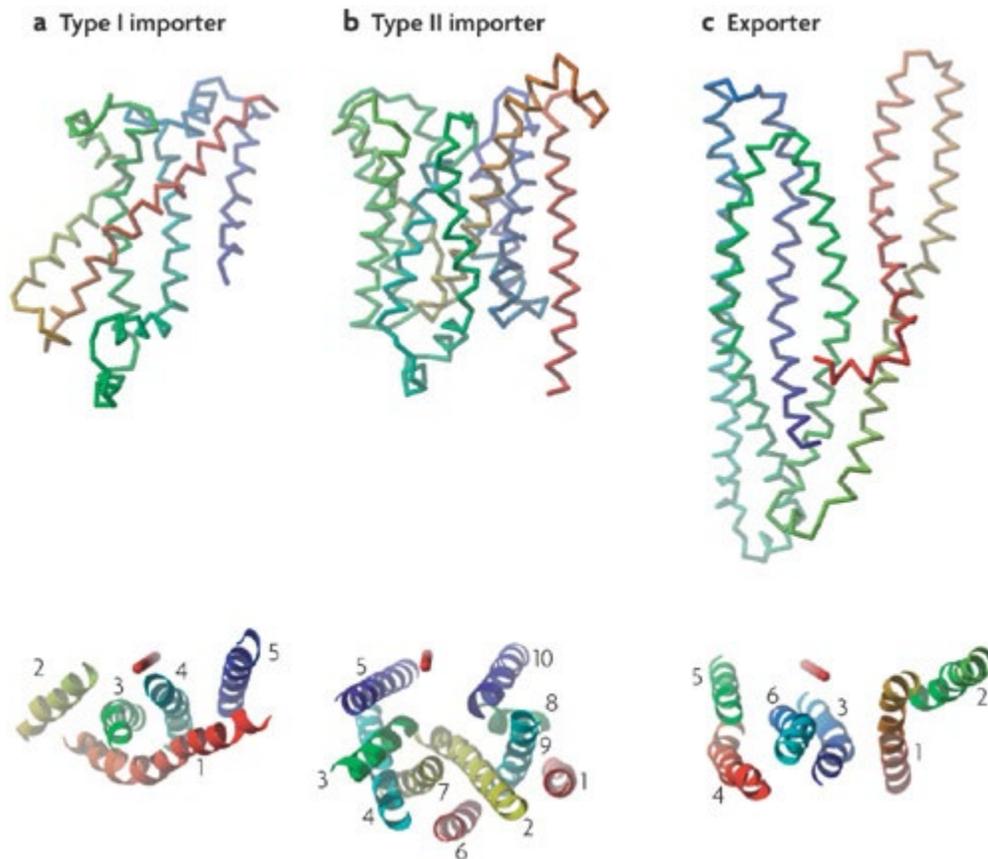


Figura 3. Pliegues de ABC importador I, II y exportador. El pliegue importador ABC Tipo I se organiza alrededor de un conjunto de mínimo cinco hélices, la primer hélice rodea la superficie exterior del haz formado por las otras hélices; el pliegue ABC tipo II contiene diez hélices por cada subunidad; el pliegue exportador tipo III o Sav1866 contiene seis hélices por cada subunidad y se organiza en dos alas, cada una está compuesta por dos monómeros que contienen las hélices uno y dos y tres y seis respectivamente para cada monómero. Los importadores también cuentan con la presencia de bucles intracelulares largos que extienden las hélices transmembranales de la superficie de la membrana hacia el citoplasma.^{62,63} (Tomado de Ress et al.; 2009)

Cada uno de estos tres tipos median la funcionalidad de la proteína, los importadores tipo I y II median la absorción de nutrientes en las células procariotas, dada la amplia naturaleza de los sustratos incluyendo monosacáridos, polisacáridos, iones orgánicos e inorgánicos, péptidos, metales, cationes de poliamidas o vitaminas, mientras que las proteínas de tipo exportadores participan

en la expulsión de diversas moléculas, cómo péptidos, lípidos, fármacos hidrófobos, polisacáridos, etc.⁶⁴

La estructura primaria de los dominios de unión a nucleótidos se dividen a su vez en dos subdominios:

1. **Dominio central catalítico:** Este dominio contiene los motivos conservados Walker A (P-loop o bucle P de unión a fosfato) y el motivo Walker B que funge el papel de la unión e hidrólisis de ATP. Walker A es un dominio de glicina altamente conservado que interactúa con los grupos fosfato del nucleótido, mientras que el motivo Walker B contiene una secuencia de consenso hhhhD (donde “h” es cualquier residuo hidrofóbico) y glutamato. El residuo hidrofóbico de glutamato actúa como una base general para activar una molécula de agua para el ataque nucleofílico en el fosfato y del ATP, además se encuentran una secuencia de bucles como D-loop que se comunica con otro NBD y H-loop, ambos importantes para la estabilización del ATP; Q-loop involucra la coordinación del metal catalítico (Mg^{2+}) y H-motif (región de cambio).^{51,65}

2. **Dominio α -helicoidal:** El dominio consta de un motivo LSGGQ conocido como motivo de firma ABC (o C-loop) que se encuentra altamente involucrado en la unión del nucleótido y es distinguible de otras proteínas de unión a ATP.

Los NBD forman un sitio de unión e hidrólisis de ATP tras la dimerización a través de interacciones con el bucle D. El sitio de unión de ATP se forma a partir de los motivos Walker A y B de una subunidad y el bucle Q de la otra subunidad, de esta forma dos moléculas de ATP se unen e hidrolizan (*Figura 4*). En ausencia de los nucleótidos, los NBD se separan y mantienen una conformación abierta, sin embargo al unirse el ATP ambos NBD se juntan para intercalar las moléculas de ATP y formar una interfaz completa.^{54,57}

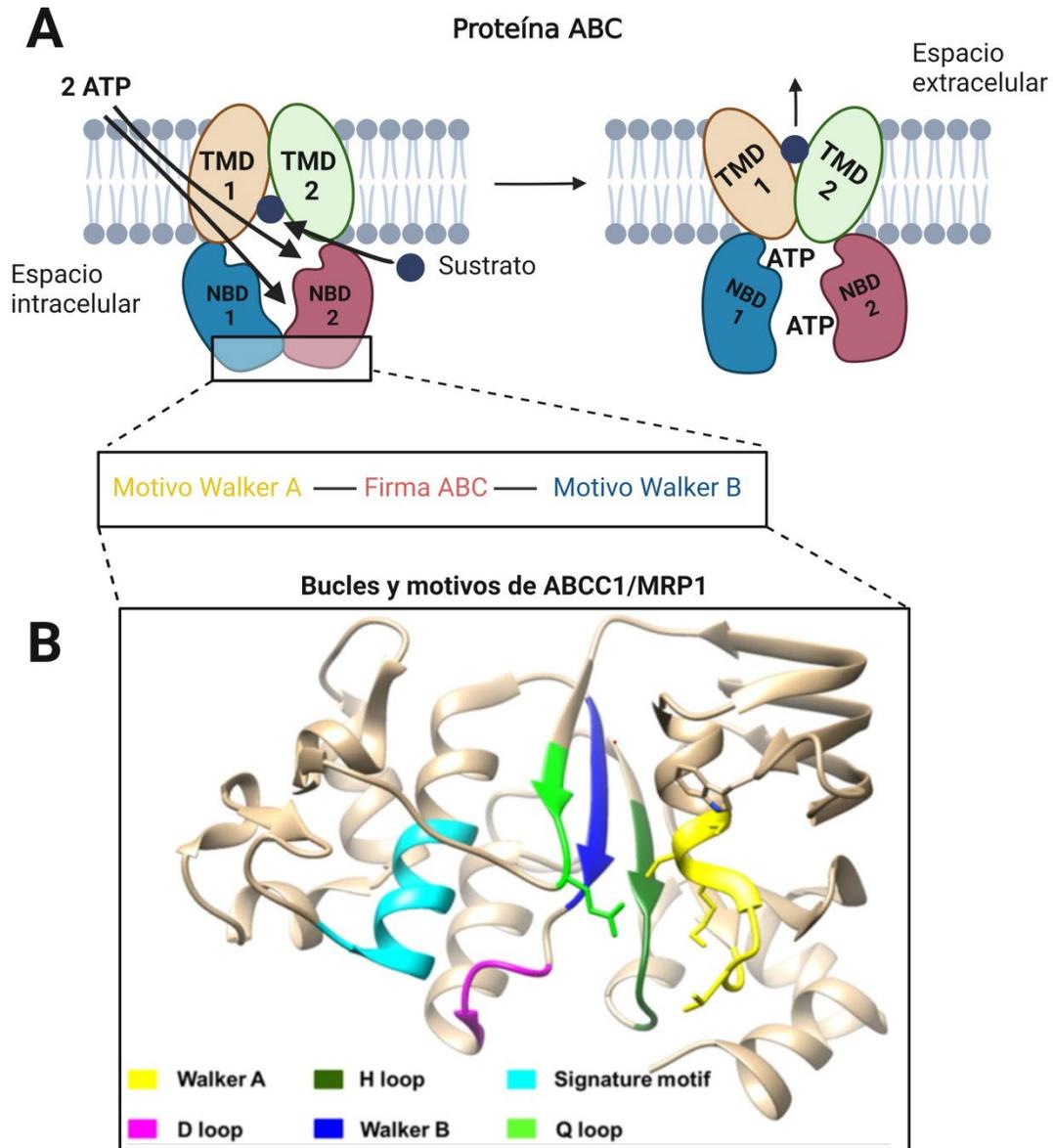


Figura 4. A. Representación de la unión de dos ATP en los dominios NBD. El sustrato se une a ambos dominios que atraviesan la membrana ya que mantienen una estructura abierta, después de la unión de dos ATP en los dominios NBD estos se dimerizan y cambian la conformación de los TMD permitiendo pasar el sustrato. B. Esquematación del dominio NBD de ABCC1/MRP1, en cada dominio se encuentran tres motivos principales denominados Walker A, Walker B y LSGGQ o firma ABC. El ciclo de transporte que implica la unión y en consecuencia la hidrólisis de ATP depende de los motivos Walker A, B, bucles D, H y Q. Los residuos de Walker A son responsables de la formación de los enlaces H entre los fosfatos α , β y γ . El motivo Walker B es responsable de estabilizar el ADP, así como la

coordinación del ión magnesio; los residuos del bucle D y H (Asp792 y 793 e His827 respectivamente) estabilizan el ATP; El residuo Gln713 del bucle Q entra en contacto con el ión magnesio y la molécula de agua atacante; la firma ABC forma una interfaz correcta para los dímeros NBD.^{61,65,67}

Las secuencias de los NBD son de aproximadamente 30-40% homólogas en todos los miembros de la superfamilia lo que indica un origen evolutivo común, se encuentran altamente conservadas entre especies, la primera proteína eucariótica ABC reconocida se encontró en células tumorales y cultivadas que demostraban resistencia a fármacos con estructuras químicamente diferentes, a esta proteína se le denominó MDR1 conocida actualmente como ABCB1.⁵³

Las proteínas ABC realizan un transporte activo, el mecanismo de translocación de los transportadores ABC inicia cuando el sustrato se une a los dominios transmembranales (TMD) formando un complejo entre la proteína-sustrato (*Figura 5*) donde existe un cambio en la estructura conformacional de la proteína con ayuda de energía ATP hidrolizada por los dominios de unión a nucleótidos (NBD) para permitir el paso de las moléculas que serán transportadas. Los NBD son proteínas altamente conservadas y su función en las proteínas transportadoras es hidrolizar ATP para obtener ADP y Pi por medio de una ATPasa, que genera la energía necesaria para su translocación.^{56,57}

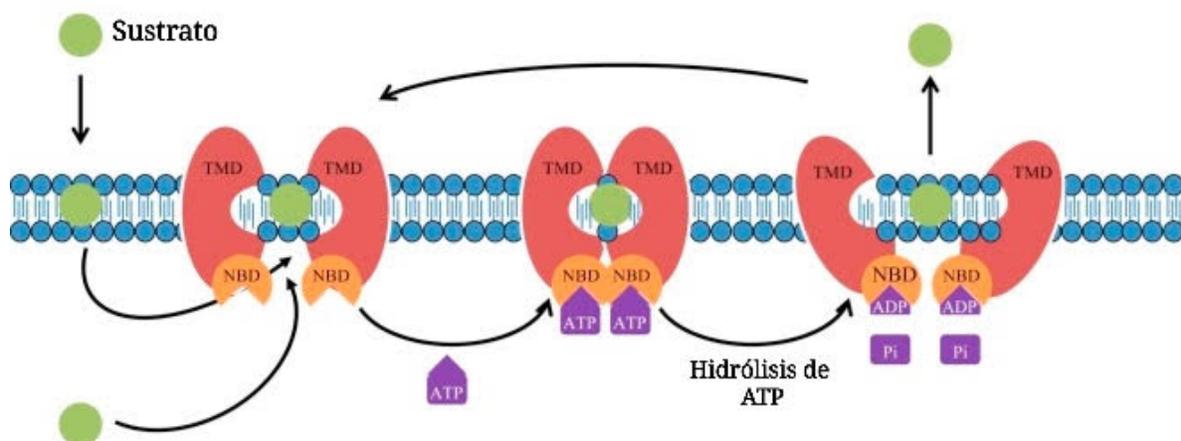


Figura 5. Mecanismo del transporte de las proteínas ABC: Transporte activo. El sustrato se une a los dominios transmembranales (TMD), donde la proteína sufre un cambio

conformacional, lo que conlleva a la dimerización de los dominios de unión a nucleótidos (NBD), la molécula de ATP se une al dominio y se induce la separación de ambos NBD para que el sustrato sea liberado al espacio extracelular. La hidrólisis de ATP, la liberación de ADP y Pi y la disociación de los NBD restablecen al transportador hacia su estructura original. (Modificado de Zhaolin, Tianlu et al.; 2016)⁶⁶

Estos transportadores tienen una función muy importante en la placenta humana ya que la gran mayoría de ellos tiene un papel en la citoprotección del feto debido a sus propiedades de eflujo activo que limitan el paso de los xenobióticos o fármacos dañinos a la circulación fetal (Figura 6). La superfamilia de transportadores de cassette de unión a ATP al consistir de tres tipos evolutivamente distintos de transportadores con pliegues transmembranales diferentes entre sí como en el caso de ABCC1 que contiene un tercer dominio transmembranal, puede ayudar en su proceso de transporte.⁶⁷

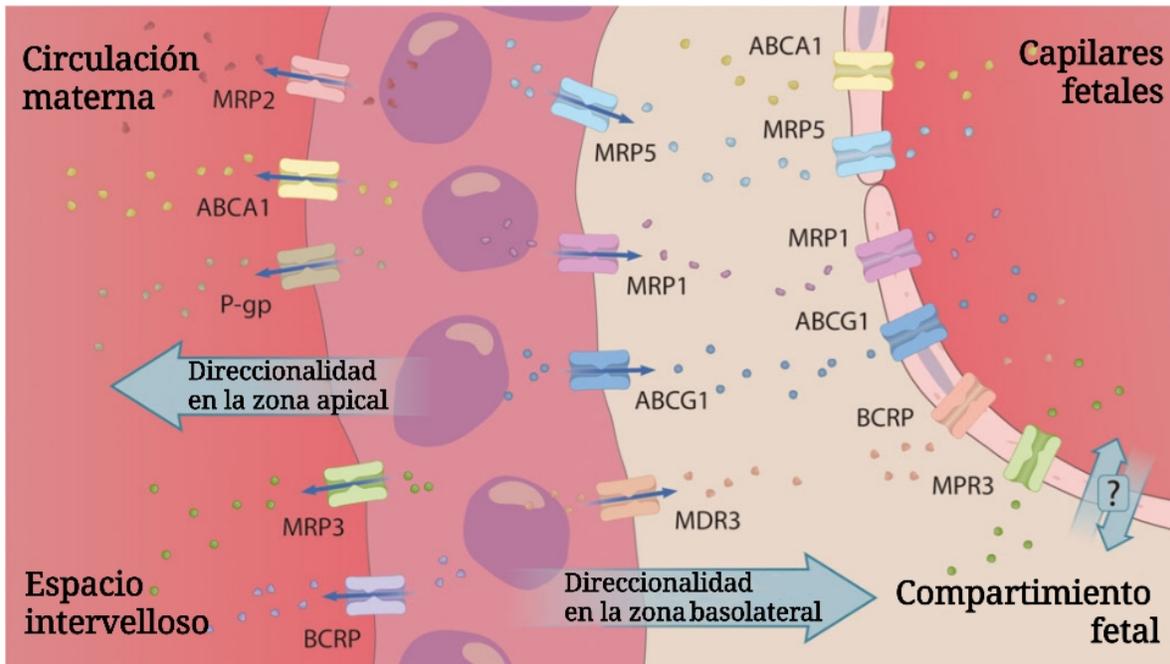


Figura 6. Localización de las proteínas transportadoras ABC en la placenta. Estos transportadores expulsan sustratos hacia la cara materna o cara fetal, dependiendo de su direccionalidad de eflujo. En algunos transportadores ABC ubicados en los capilares fetales su direccionalidad de eflujo aún sigue siendo estudiada y aún es desconocida. (Modificado de Bloise, Ortiga et al.; 2016)⁶⁸

Varios transportadores ABC que son encontrados en el sincitiotrofoblasto del lado apical de la placenta, en los citotrofoblastos, en el cepillo de las microvellosidades y en el endotelio de los capilares fetales, desempeñando un papel importante en la transferencia transplacentaria en donde la gran mayoría expulsa xenobióticos y son unidireccionales como P-gp.⁶⁹

Se ha reportado que los transportadores ABC podrían tener una función importante en mejorar la supervivencia celular al expulsar sustratos de las células diana y se ha sugerido que estas proteínas pueden proteger a las células contra la apoptosis en presencia de moléculas estresantes.^{70,71,72}

Los transportadores ABC de eflujo ABCB, ABCC y ABCG desempeñan un papel importante en el transporte de xenobióticos a lo largo de la placenta y de compuestos endógenos (*Tabla 4*). La actividad de ciertas enzimas en la placenta que metabolizan xenobióticos se encuentran restringidas en la placenta, sin embargo, los transportadores expresan niveles altos en el tejido y su gran diversidad y distribución es importante para la transferencia transplacentaria y para desempeñar una protección a las células y el feto.^{73,74}

El mal funcionamiento o la disminución de la expresión de estas proteínas transportadoras en la placenta podrían causar un descenso de los nutrientes al feto y provocar una restricción del crecimiento y riesgos concomitantes para el recién nacido, incluidos el riesgo cardiovascular y la diabetes tipo II.⁷⁵

Tabla 4. Transportadores integrales ABC en la placenta humana.

	Localización en la placenta	Función principal	Sustratos
ABCB1/P-gp/MDR1	Sincitiotrofoblasto apical, trofoblasto.	Resistencia a fármacos (antibióticos, antieméticos, fármacos cardíacos, inhibidores de la proteasa del VIH) Exporta sustancias lipofílicas.	7-hidroxiprogesterona, aldosterona, citocinas antiinflamatorias (IL-4), quimiocinas (CCL2), glucocorticoides endógenos (cortisol), estradiol-17 β -glucurónido, estriol, estrona, flavonoides, PAF, pregnenolona, citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN γ , GM-CSF, TNF- α), esfingomielina, amoxicilina, amprenavir, atorvastatina, bromocriptina. ^{76,77,78}
ABCA1	Sincitiotrofoblasto apical, endotelio de vasos fetales.	Transporte de colesterol y lipoproteínas.	Colesterol, eflujo de lipoproteínas de alta densidad (HDL). ⁶⁸
ABCC1/MRP1	Trofoblasto, endotelio de vasos fetales y sincitiotrofoblasto apical y basolateral.	Resistencia a fármacos.	Antraciclinas, alcaloides, irinotecán, SN-38, metotrexato, camptotecinas, saquinavir, ritonavir, difloxacina, conjugados de fármaco (glucuronato, glutatión, sulfato, folato), 4-hidroxinonenal. ^{68,76,77}
ABCC2/MRP2	Sincitiotrofoblasto apical.	Quimioprotección y desintoxicación	17 β -glucuronosil estradiol, sulfato de dehidroepiandrosterona,

			estrona 3-sulfato; leucotrieno C, bilirrubina, conjugados de glucurónidos y sulfatos de sales biliares, metotrexato, pravastatina, doxorubicina. ^{68,76,77,78}
ABCC3/MRP3	Sincitiotrofoblasto apical y endotelio de vasos fetales.	-----	17 β -glucuronosil estradiol, leucotrieno C4, bilirrubina, glucurónidos, 3-sulfato de dehidroepiandrosterona, conjugados de glucurónido de sales biliares, Metotrexato, glucurónido de Paracetamol, fexofenadina. ^{68,76,77,78}
ABCC5/MRP3	Sincitiotrofoblasto basolateral, endotelio de vasos fetales	-----	Nucleótidos cíclicos: AMPc, GMPc, folato. Adefovir, Metotrexato. ^{68,78}
ABCG1	Sincitiotrofoblasto basolateral y endotelio de vasos fetales.	Transporte de colesterol.	Esterol, colesterol ⁶⁸
ABCG2/BCRP	Sincitiotrofoblasto apical y endotelio de vasos fetales.	Transporte de colesterol, resistencia a fármacos y eflujo de toxinas.	Estradiol-17 β -glucurónido, dehidroepiandrosterona, estrona-3-sulfato, folato, porfirinas, esfingolípidos, prostaglandinas, adefovir, betalactámicos, diclofenaco, doxorubicina, fluoroquinolonas, gliburida, nifedipina, nitrofuranos. ^{68,76,77,78}

La placentación anormal en el desarrollo de la PE provocan disfunción endotelial, inducir estrés oxidativo y estimular la respuesta inflamatoria mediante la activación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), radicales libres y peroxidación de lípidos, los cuales pueden contribuir a hiperuricemia y alterar proteínas que se encuentran en la placenta como los transportadores ABC.

La salud fetal puede verse afectada por factores que alteren la expresión de los transportadores ABC, polimorfismos genéticos o por algún inhibidor (además de fármacos) como citocinas y/o productos dependientes de las ROS.

2.4 IMPORTANCIA DE LOS TRANSPORTADORES ABCG2 (BCRP) Y ABCC1 (MRP1) EN LA PLACENTA HUMANA.

La placenta humana se forma en la interfaz de la circulación materna y fetal y tiene funciones como la biosíntesis, el metabolismo y controla el transporte del colesterol, glucocorticoides y algunas hormonas; es un órgano importante y efímero. Su función óptima es esencial para el desarrollo fetal normal y un embarazo exitoso, además es una barrera protectora que gracias a sus transportadores ubicados en los tejidos placentarios evita la entrada y ayuda a la salida de xenobióticos y otras moléculas que pueden causar daño fetal.⁷⁵

El embarazo es un periodo vulnerable para la salud materna y fetal, la placenta es un órgano multifuncional que transfiere nutrientes esenciales y se caracteriza por dos capas; el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto, este último es una capa epitelial polarizada multinucleada que funciona como barrera de transporte y responsable de producción de hormonas. La parte apical se encuentra en contacto con la circulación materna, mientras que la parte basolateral se encuentra en la circulación fetal y con la capa citotrofoblástica.⁷⁷

El intercambio entre las circulaciones materno y fetal se lleva cabo en las vellosidades coriónicas, éstas vellosidades son una unidad funcional muy importante en la placenta humana. La estructura de la barrera placentaria humana a término se encuentra constituida por las capas celulares de las vellosidades,

desde el lado de la sangre materna, el sincitiotrofoblasto, células citotrofoblásticas, células del estroma y endotelio vascular fetal, que actúan para separar la circulación fetal de la circulación materna (*Figura 7A*). A medida que una molécula pasa por el torrente sanguíneo materno al fetal, los componentes deben atravesar el sincitiotrofoblasto, ya sea por el citoplasma del trofoblasto o a través de proteínas transportadoras. Por lo tanto, el transporte a través de la placenta se realiza a través de transportadores, e implica el movimiento de moléculas entre tres compartimientos: la sangre y los vasos maternos, el citoplasma del sincitiotrofoblasto y membranas basales y por último, la pared capilar fetal.⁷⁹ En la placenta, el sincitiotrofoblasto y el endotelio capilar fetal expresan los transportadores ABC.

La proteína ABCG2/BCRP se localizan en el endotelio capilar fetal, en las células citotrofoblásticas, y en la membrana microvellosa apical de los sincitiotrofoblastos placentarios, donde el transporte se realiza en un solo sentido hacia la circulación materna; mientras que ABCC1/MRP1 se encuentra en la membrana apical con dirección de eflujo hacia la circulación materna, su localización en la membrana microvellosa apical de los sincitiotrofoblastos y los capilares fetales tienen una unidireccional inversa que va hacia la circulación fetal,⁵² (*Figura 7B*).

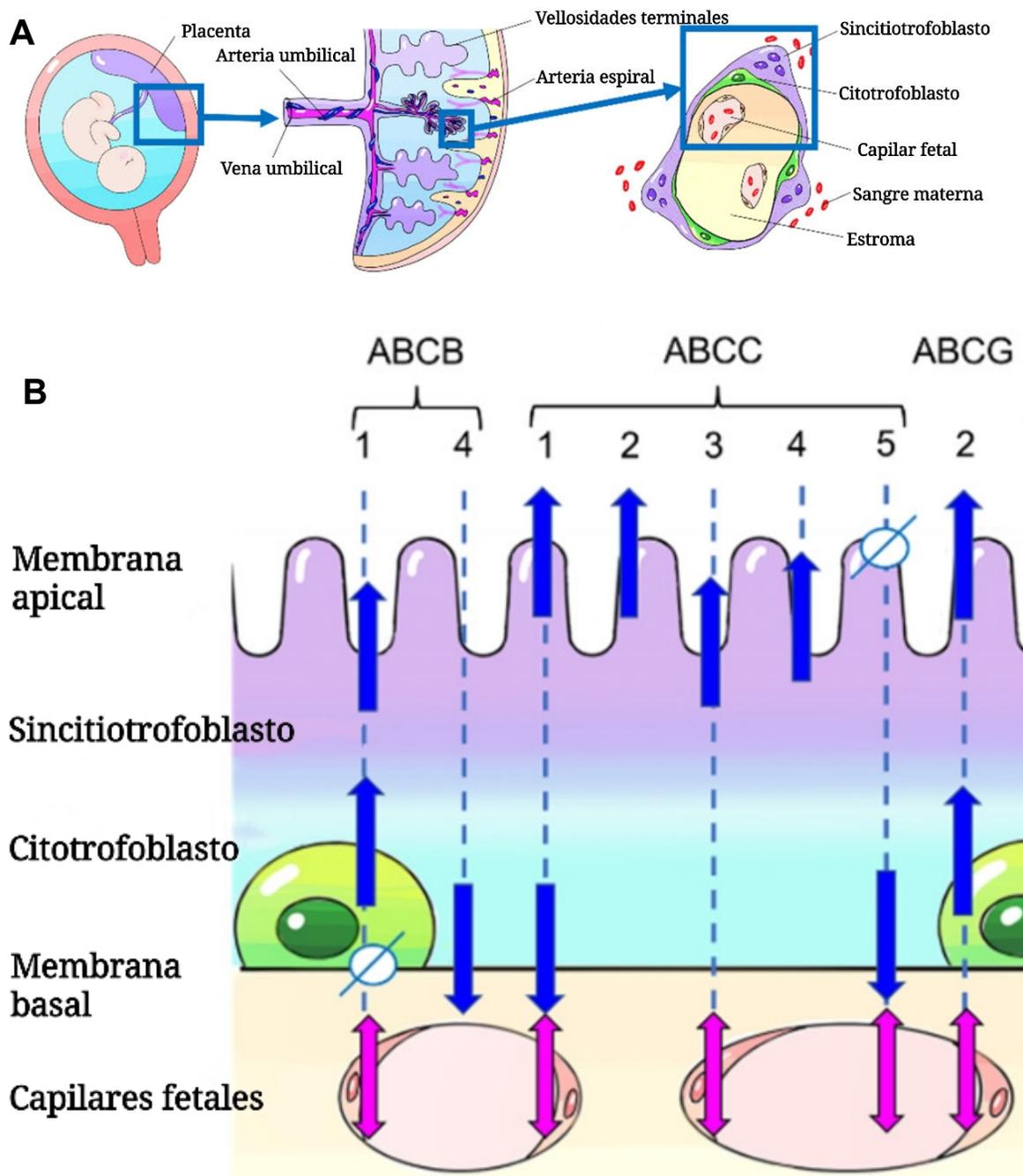


Figura 7. A. Estructura de la placenta humana, se muestra en mayor aumento una arteria espiral en donde se observan células sincitiotrofoblásticas, citotrofoblastos, capilares fetales y el estroma. **B. Localización de los transportadores ABC en la placenta humana.** Las flechas azules indican la unidireccionalidad que tiene la proteína con respecto al tipo de célula o compartimento específicamente. La dirección de transportadores ABC en los capilares fetales se establece en ambas direcciones dependiendo de su ubicación exacta en el endotelio. (Modificado de Yamashita, Markert et al.; 2021)⁸⁰

2.5 REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCC1/MRP1 Y ABCG2/BCRP

ABCG2/BCRP es una proteína transportadora de 72 kDa y consta de un dominio transmembranal y un dominio de unión a nucleótidos (*Figura 8*) y se expresa en la membrana apical de los sincitiotrofoblastos. Se ha descrito que ABCG2 protege al feto de xenobióticos debido a su localización, su unidireccionalidad hacia la sangre materna y su elevada expresión en la placenta. Desempeña muchas funciones en el transporte de compuestos en diversos tejidos, por ejemplo, se expresa en el tejido mamario y media el transporte de la vitamina B2 y riboflavina en la leche materna, además también está implicado en la secreción de urato en la orina, por lo que se ha reportado una asociación entre polimorfismos y el desarrollo de gota,^{81,82} esta proteína en la placenta a lo largo de toda la gestación normal no sufre cambios en cuanto a sus niveles de expresión.^{83,84}

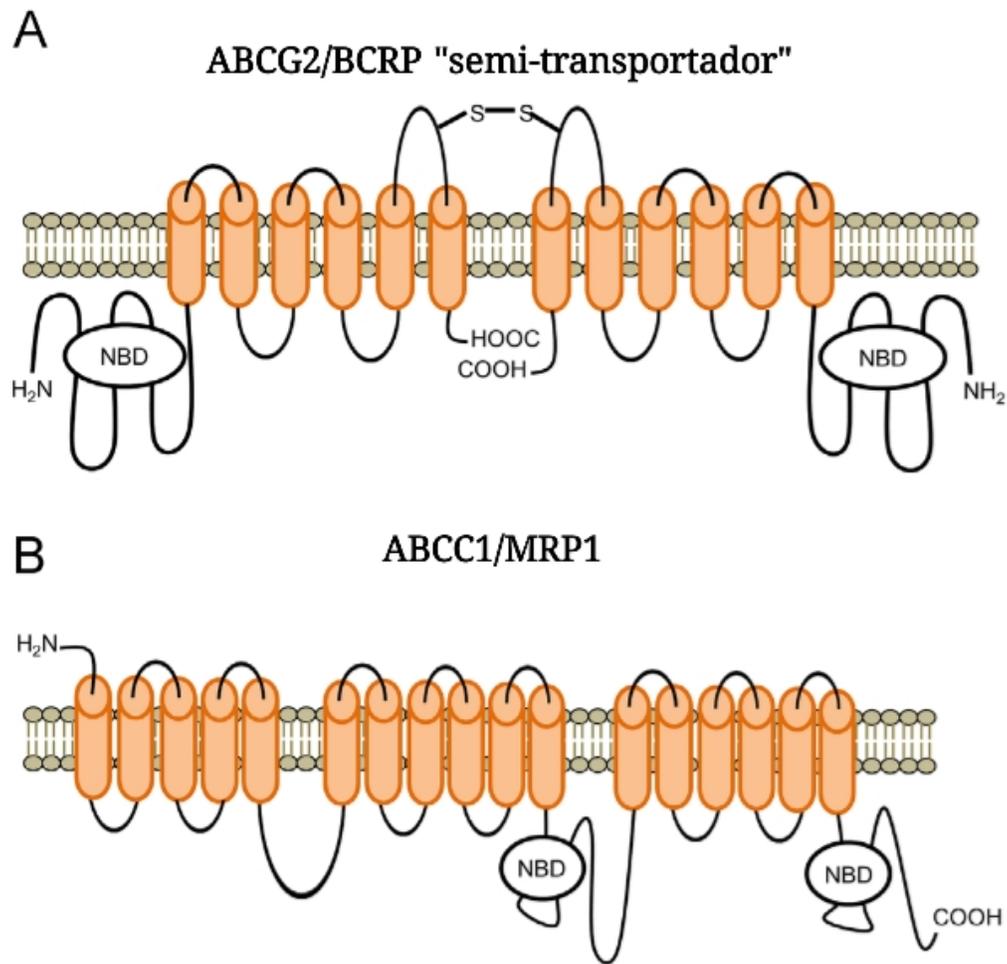


Figura 8. A. Estructura de ABCG2/BCRP. La proteína transmembranal se presenta en forma de homodímero con dos dominios transmembranales iguales (TMD) y un solo dominio de unión a nucleótidos. Su homodimerización es fundamental para realizar su función. **B. Estructura de la proteína ABCC1/MRP1,** su estructura consta de tres dominios transmembranales (TMD0, TMD1 y TMD2), y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2). (Modificado de Liming *et al.*; 2019)⁸⁵

ABCG2/BCRP protege al feto al limitar la transferencia transplacentaria y previene la apoptosis de los trofoblastos, hay estudios en donde se demuestra que cuando se inhibe ABCG2/BCRP con un inhibidor selectivo existe un aumento de la apoptosis en los trofoblastos placentarios mediada por citocinas como TNF- α e IFN- γ , por lo que este transportador puede estar implicado en la protección de las células trofoblásticas placentarias, la destrucción de dichas células podrían alterar

el desarrollo de la gestación ya que este tipo de células son de importancia en la contribución de los tejidos membranales y de la placenta.⁷²

ABCG2/BCRP se encuentra localizado en el cromosoma 4 en la posición q22.1 y codifica una proteína de 663 aminoácidos; la expresión del gen de esta proteína es regulada por el estradiol, la progesterona y factores de crecimiento que alteran y suprimen la expresión de la proteína.⁸⁶ Asimismo, algunas interleucinas y citocinas proinflamatorias,^{87,88} tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 regulan a la baja su expresión. En estados de hipoxia, en células derivadas de trofoblasto (BeWo), la expresión de ABCG2 disminuye a nivel mRNA.⁸⁶ ABCG2 es regulado por el receptor G activado por PPAR y también es regulado a través del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR)⁸⁹ por tanto se puede inferir que los factores de transcripción del gen ABG2/BCRP (*Figura 9*) sean inhibidos por diversos sustratos o moléculas generadas en diversas patologías que surgen en el embarazo, puesto que hormonas esteroides, xenobióticos relacionados con el embarazo y factores de crecimiento afectan su expresión.

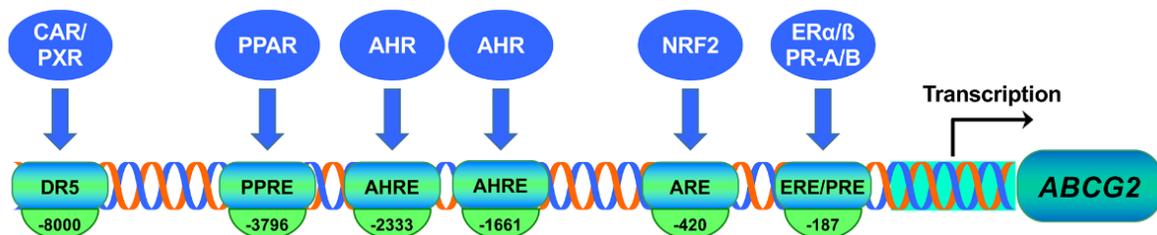


Figura 9. Elementos regulatorios en el promotor del gen ABCG2/BCRP y factores de transcripción asociados. La región promotora contiene elementos de respuesta para los reguladores de la transcripción, se incluyen el Receptor de Pregnano X (PXR) y el Receptor de Androstano (CAR), Receptor del Peroxisoma y (PPAR), Receptor de Hidrocarburo de arilo (AHR), Factor Nuclear Eritroide II (NRF2) y, los Receptores de Estrógeno α y β (ER α / β) y Receptor de progesterona (PR). NFR2, PPAR y Era/ β también se encuentran presentes en ABCC1/MRP1 (Tomado de Gorczyca, Aleksunes *et al.*; 2020)⁹⁰

Esta familia de transportadores tienen funciones citoprotectoras al limitar la transferencia de compuestos citotóxicos como mitoxantrona, topotecán, SN-38, flavopiridol, metotrexato, nitrofurantoína y gliburida hacia la circulación fetal. Por

ejemplo, en la diabetes gestacional a las mujeres se les administra gliburina,³² la cual es transportada eficazmente por los transportadores ABCG2/BCRP Y ABCC3/MRP3, sin embargo, también se ha indicado que este fármaco es un inhibidor de varios miembros de la familia de transportadores ABC entre los cuales se incluye ABCG2/BCRP, P-gp y MRP, esta inhibición solamente es producida cuando existen concentraciones demasiado altas de gliburida en las pacientes.^{92,93,122} De igual forma, durante la PE se administran fármacos que pueden entrar a la circulación fetal a través de estos transportadores, por lo que su regulación en esta patología puede cobrar gran relevancia.

La familia de transportadores ABCC son denominadas MRP, a excepción de ABCC13,⁹⁴ estos transportadores suelen tener dos dominios de unión a nucleótidos (NBD), aunque son variables en cuanto a su tamaño y estructura. Se han encontrado funciones de transporte de iones orgánicos conjugados y no conjugados debido a su localización opuesta del sincitiotrofoblasto, también actúan en la salida de algunos fármacos. La expresión de ABCC1/MRP1 en la placenta es mayor en comparación con otros tejidos, como el hígado o el riñón y su localización se encuentra en la membrana apical, basolateral y el endotelio fetal.⁷⁵

ABCC1/MRP1 es una proteína transmembranal de aproximadamente ~190 kDa,⁹⁵ se identificó como un mediador de la resistencia a diversos fármacos en una línea celular de cáncer de pulmón expuesta a doxorrubicina,⁵¹ contiene 1531 aminoácidos y está conformada por dos sitios de unión a nucleótidos, tres dominios transmembranales (TMD0, TMD1 Y TMD2) y 17 TM en cada uno de los TMD (hélices α).^{96,97}

ABCC1/ MRP1 y ABCC2/MRP2 tienen relevancia en la desintoxicación, ya que actúan de forma sinérgica con varias enzimas metabólicas de fase II como las GST y las UGT.⁷⁷ Transporta aniones orgánicos anfipáticos que se encuentran conjugados con glutatión, ácido glucorónico y sulfato por lo que de manera más concisa transporta activamente conjugados de glucurónido y glutatión.^{78,51}

El transportador ABCC1/MRP1 tiene una direccionalidad de la circulación fetal hacia la materna y viceversa (como ABCG2/BCRP que tiene una dirección de la circulación materna hacia la fetal, evitando la entrada de xenobióticos), esta orientación implicaría la funcionalidad de evitar la acumulación de xenobióticos en la cara fetal y expulsarlos hacia la cara materna para evitar que se acumulen en el compartimiento fetal, además de evitar al mismo tiempo la entrada de xenobióticos, aunque también este transportador es muy importante para el transporte de nutrientes para el desarrollo y crecimiento fetal como el folato.^{98,99}

Las moléculas derivadas del estado inflamatorio que caracteriza la placenta de mujeres con PE, pueden disminuir estos transportadores y ocasionar que el feto sea más susceptible a agentes teratogénicos, carcinogénicos y moléculas tóxicas que alteren su crecimiento y desarrollo.⁷⁴

3) JUSTIFICACIÓN

La PE es un desorden hipertensivo durante el embarazo y una de las principales causas de muerte materna, tanto en nuestro país como en el mundo. La placenta de mujeres con preeclampsia se caracteriza por presentar un estado de hipoxia, niveles altos de moléculas asociadas a estrés oxidativo y citocinas proinflamatorias; la placenta desempeña un papel fundamental en la absorción de compuestos y nutrientes endógenos que son esenciales para mantener un embarazo saludable. En la placenta, los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 son altamente expresados y limitan el paso de agentes nocivos y teratogénicos para el feto, así como diversos sustratos. Los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 son susceptibles a estados de estrés oxidativo y citocinas proinflamatorias, y no se sabe si el estado de la placenta de mujeres con PE podría modificar el funcionamiento de estas proteínas o disminuir su expresión. Por lo anterior es importante saber si en la placenta de mujeres con preeclampsia, los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 se encuentran alterados, pues una disminución en los niveles de estos transportadores podría estar implicado en la función protectora contra xenobióticos en el embarazo.

4) PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una disminución en la expresión de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en la placenta de mujeres con preeclampsia en comparación con aquellas que desarrollan un embarazo normal?

5) OBJETIVO GENERAL

5.1 Analizar el nivel de expresión de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en mujeres con preeclampsia y embarazo normal.

6) OBJETIVOS PARTICULARES

6.1 Evaluar la expresión a nivel de mRNA de ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en muestras de placenta de los grupos de estudio.

6.2 Evaluar los niveles de proteína ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 por medio de la técnica Western Blot de tejido placentario en mujeres de gestación normal y preecláptica.

6.3 Medir las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en la placenta de mujeres con preeclampsia y con embarazo normal.

7) HIPÓTESIS

Debido al estado de hipoxia, estrés oxidativo, inflamación y alteraciones bioquímicas que caracterizan la placenta de mujeres con PE, los niveles de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 se verán disminuidos en mujeres que padecen esta patología en comparación con mujeres con una gestación normal; dicha regulación podría ser mediada por citocinas proinflamatorias.

8) MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Analítico, observacional, retrospectivo, transversal.

8.1 MUESTRA

Se utilizaron biopsias de tejido placentario obtenidos al nacimiento de mujeres que aceptaron participar, con previo consentimiento informado, en el proyecto “Estudio de la regulación epigenética en el desarrollo de dislipidemias en el binomio madre-recién nacido con preeclampsia y con embarazo normal”, con número de Registro INPer: 212250-3210-21001-02-15, captadas durante el período 2018-2019. En dicho periodo se tomaron 21 pacientes que desarrollaron preeclampsia (casos) y 36 controles. De cada una de la muestras fueron capturadas sus historias clínicas y procesadas en una base de datos.

8.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CASOS Y CONTROLES.

Tabla 5. Criterios de inclusión y exclusión

	Criterios de Inclusión	Criterios de no inclusión	Criterios de exclusión
Casos	Mujeres en gestación diagnosticadas con PE. Mujeres que aceptaron participar en el estudio con consentimiento informado firmado.	Mujeres con enfermedad sistémica crónica como lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, glomerulonefritis, epilepsia, diabetes, hipertensión arterial sistémica crónica, púrpura trombocitopenia trombótica, enfermedades de la colágena, patología renal.	Pérdida de las condiciones de almacenamiento. Que durante el estudio, a la paciente se le diagnosticara alguna de las enfermedades de los criterios de no inclusión. Mujeres cuyo material genético o muestreo no pudo ser recolectado o analizado por dificultades técnicas.

Controles	Mujeres en gestación sin diagnóstico de PE al momento de la resolución obstétrica.	Mujeres con enfermedad sistémica crónica como lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos,	Pérdida de condiciones de almacenamiento.
	Mujeres que aceptaron participar en el estudio con consentimiento informado firmado.	glomerulonefritis, epilepsia, diabetes, hipertensión arterial sistémica crónica, púrpura trombocitopenia idiopática, púrpura trombocitopenia trombótica, enfermedades de la colágena, patología renal.	Que durante el estudio, a la paciente se le diagnosticara alguna de las enfermedades de los criterios de no inclusión.
			Mujeres cuyo material genético o muestreo no pudo ser recolectado o analizado por dificultades técnicas.

8.3 DIAGRAMA DE FLUJO

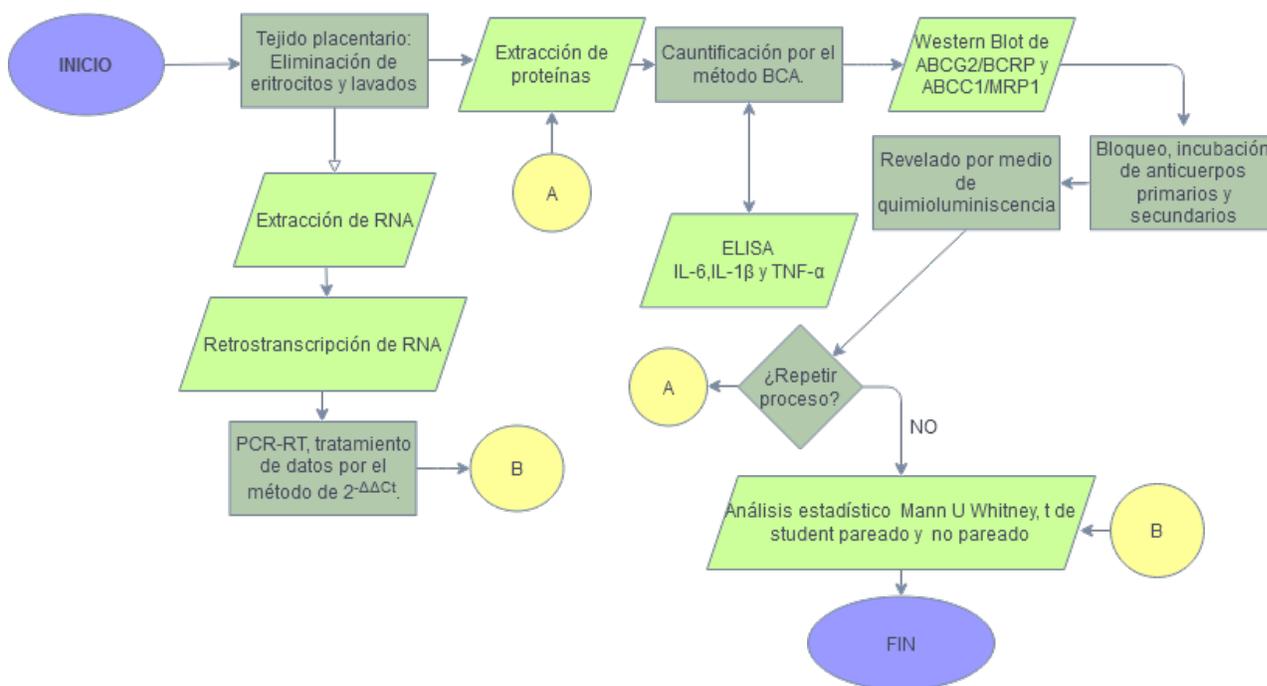


Figura 10. Diagrama de flujo. Procedimiento experimental realizado durante este estudio. Las muestras fueron tomadas de placentas de mujeres al dar a luz, el tejido fue tratado y lavado, posteriormente se realizaron las extracciones de RNA y proteínas, se cuantificaron para realizar las técnicas PCR en tiempo real, Western Blot y ELISA.

8.4 EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.

8.4.1 Extracción de RNA

Los fragmentos de tejido de placenta obtenidos al nacimiento, fueron procesados para eliminar la mayor cantidad de sangre del tejido y conservados a -70°C en RNAlater, para preservar la integridad del RNA, hasta su procesamiento. El RNA fue extraído utilizando el Kit RNeasy®/Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, cat.74704) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Aproximadamente 30 mg de tejido se colocaron en el Buffer de lisis RLT3 con proteinasa K.¹⁰⁰ Los tejidos se homogenizaron y se adicionaron 590 µL de agua libre de RNAsas y 10 µL de proteinasa K, los restos de tejido se sedimentaron mediante centrifugación a 10,000 x g por 3 min a 25°C. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 500 µL de etanol al 100%, y 700 µL se pasaron a la columna RNeasy® Mini, se centrifugó a 8,000 x g por 15 segundos. El RNA se unió a la una columna que contiene una membrana de sílice. Las trazas de DNA que pueden co-purificarse con el RNA se eliminaron mediante el tratamiento con 80 µL de DNasa en la columna. La DNasa y cualquier contaminante se eliminaron eficazmente por lavados y centrifugación. El RNA total se diluyó en 54 µL de agua libre de RNasa y se cuantificó por medio de espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000.

8.4.2 RT-PCR en tiempo real

A partir de las muestras de RNA extraído previamente del tejido de placenta, se realizó la síntesis de cDNA por medio del kit Superscript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante.¹⁰²

Se utilizaron 5 µL de RNA, aproximadamente 4-5 µg de RNA, 1 µL de primer oligo dT, 1 µL de buffer de alineación, y 1 µL de H₂O, se incubaron en el termociclador (Mastercycle gradient) a 65°C por 5 minutos, inmediatamente se colocaron en hielo por 1 minuto y posteriormente se le adicionó 10 µL del buffer 2x first-strand (10 mM MgCl₂ y 1mM de dNTP) y 2 µL de la superscrip-enzima mix. Se incubaron nuevamente en el termociclador a 25°C por 10 minutos, 50°C por 50

minutos y 85°C por 5 minutos. Posteriormente se colocaron en hielo por 1 minuto. El cDNA sintetizado se cuantificó por medio de espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 y se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 40 ng/μL.

Se realizó una PCR en tiempo real por medio de sondas TaqMan (Applied Biosystems) para examinar la expresión génica del mRNA de *ABCG2/BCRP* y *ABCC1/MRP1* en el equipo StepOne plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizaron las sondas *ABCG2/BCRP* FAM Hs01053790_m1 y *ABCC1/MRP1* FAM Hs01561502_m1, como gen endógeno se utilizó 18S Eucaryotic 18S ribosomal RNA VIC Hs99999901_s1, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Los resultados obtenidos fueron expresados y analizados como valores de C_T (threshold cycle, ciclo umbral), que significa el número de ciclos para detectar gen blanco. Se realizó el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para evaluar la expresión génica de *ABCG2/BCRP* y *ABCC1/MRP1* (Figura 11).

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés\ (ABCG2\ \acute{o}\ ABCC1)} - Ct_{gen\ end\acute{o}geno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra\ interés\ (ABCG2\ \acute{o}\ ABCC1)} - \Delta Ct_{calibrador}$$

$$= 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{1}{2^{\Delta\Delta Ct}}$$

Figura 11. Método $\Delta\Delta Ct$. Fórmulas empleadas para realizar el cálculo de $\Delta\Delta Ct$ de las muestras analizadas. Una vez obtenido el valor se emplea como exponente 2 y esto refleja la proporción de cambio que existe entre las muestras. ΔCt calibrador siempre tendrá un valor de 1.

8.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR INMUNODETECCIÓN

8.5.1 Extracción de proteínas

Las muestras de placentas se recolectaron inmediatamente después de la cesárea y se disecó la cara materna y la cara fetal. Las biopsias del tejido

placentario se lavaron con buffer de lisis para eliminar los eritrocitos y posteriormente con PBS 1X frío. Las proteínas fueron extraídas del tejido placentario de la cara materna y la cara fetal en el buffer RIPA (RIPA™)⁴⁷ con inhibidores de proteasas (Roche, ULTRA Tablets, Mini, Protease). Se tomaron aproximadamente 50 mg de tejido y se homogenizó en 500 µL del reactivo, con 5 µL de proteasas (Roche, ULTRA Tablets, Mini, Protease) y EDTA, se homogenizaron y se centrifugaron a 13,400 rpm por 40 minutos a 4°C, el sobrenadante se pasó a tubos tipo eppendorf previamente etiquetados, se desechó el botón celular y los tubos fueron guardados a -20°C para su posterior uso.

8.5.2 Cuantificación de proteínas por el método BCA.

La cuantificación de proteínas solubles totales se realizó por el método de ácido bicinonínico (BCA) con el kit Pierce™ BCA Protein Assay. En una placa de 96 pozos se adicionó por triplicado 25 µL del extracto de proteínas con una dilución 1:20 y 200 µL del reactivo WR, se agitó la placa por 45 segundos y se incubó a 37°C por 30 minutos. Finalmente fueron cuantificadas por espectrofotometría a 562 nm con el equipo para microplacas BioTek.

8.5.3 Western Blot

Las muestras de proteína de la cara materna de la placenta, se utilizó para ABCG2/BCRP y la cara fetal para determinar ABCC1/MRP1. Se cargaron 75µg de proteína en cada pozo, a la cual se le adicionó como agente reductor DTT y solución de carga Laemmli 4X (BIO-RAD, cat. 161-0747), se calentaron a 95°C por 5 minutos. Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, por sus siglas en inglés) en donde las proteínas se separan bajo un campo eléctrico de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida al 8% para ambas proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Potran® cat. 10600003) utilizando un sistema de transferencia húmedo. Se realizó el bloqueo con leche descremada, para las membranas dónde

se detectó ABCG2/BCRP se utilizó leche descremada al 10% en PBS y se bloquearon toda la noche a 4°C, mientras que para las membranas de ABCC1/MRP1 se usó leche descremada al 5% y se incubó por 2 h a temperatura ambiente.

La detección de las proteínas fue realizada utilizando el anticuerpo primario Anti-BCRP/ABCG2 (Abcam, Anti-BCRP/ABCG2 antibody [BXP-53] ab24115) y Anti-MRP1/ABCC1 (ThermoFisher Scientific, MRP1 Monoclonal antibody, Cat. #MAS-16079), ambas se incubaron a 4°C toda la noche. Los anticuerpos secundarios anti-Rat conjugado a HRP (Invitrogen, 61-9520) y anti-Mouse (Santa Cruz Biotechnology) respectivamente, se incubaron 1.5 hr a temperatura ambiente. Los lavados fueron realizados con PBS Tween20 al 0.1% y la detección fue realizada en un cuarto oscuro utilizando los reactivos SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate.⁴⁸ Los controles de carga utilizados fueron GAPDH (GeneTex, GTX627408) y α -Tubulina (GeneTex, GTX628802) para ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 respectivamente. El anticuerpo primario se incubó por 1.5 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS Tween20 al 0.1% y se incubó el anticuerpo secundario anti-Mouse (Santa Cruz Biotechnology) para ambos. Se utilizó como control positivo 20 μ g de proteína de la línea celular A549 y HepG2.

Las placas radiográficas obtenidas se digitalizaron en un archivo TIFF, por medio de un fotodocumentador (EPSON). Se utilizó el programa Image Lab v.6.0.1 para el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados de la expresión de proteínas de interés se normalizaron con la expresión de la proteína de control de carga correspondiente.

8.6 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN TEJIDO PLACENTARIO.

8.6.1 Técnica ELISA

Se evaluaron las citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α por medio de la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) con el kit

ELISA R&D Human (DuoSet® ELISA, cat. DY206-05; DY201-05; DY210-05). La técnica se realiza en 3 fases: 1) Las placas de 96 pozos son recubiertas con 100 µL del anticuerpo captura en la dilución de trabajo recomendada por el fabricante y se incuban toda la noche a 4°C. 2) Al día siguiente, se desecha el contenido y se realizan 3 lavados con solución PBS-Tween20 al 0.1% pH=7.4 y se adicionan 300 µL de solución de bloqueo fresca (1% de BSA y 5% de sacarosa), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se preparan las curvas estándares (rango de 4.7-300 pg/mL) y las diluciones 1:2 de los extractos proteicos. Se adicionaron 100 µL por pozo de los estándares o muestra y se incubaron toda la noche a 4°C. 3) Al tercer día, se desechó el contenido de la placa y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween20 al 0.1% pH=7.4. Se adicionaron 100µL de la dilución de trabajo del anticuerpo secundario correspondiente, y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Al término de la incubación se desechó el contenido y se repitió el proceso de lavado nuevamente por 3 veces, seguido de incubación con 100 µL de estreptavidina-HRP diluida en PBS 1X durante 30 minutos, con agitación constante. Finalmente, nuevamente es desechado el contenido y posterior al lavado de placas se adicionan 100 µL de sustrato para peroxidasas OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina) diluido en solución de fosfato cítrico pH 5.0. La reacción colorimétrica se leyó a una longitud de onda de 450nm. Y la concentración de las muestras se realizó con la regresión lineal de la curva estándar. Los valores de densidad óptica se transformaron en unidades de concentración (ng/mg).

9) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos clínicos y experimentales se expresaron como la media \pm SEM. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas con pruebas estadísticas de U de Mann-Whitney para la determinación de la expresión de las proteínas a nivel mRNA y la expresión de la proteína ABCG2/BCRP en tejido placentario, t de student para la expresión de la proteína ABCC1/MRP1, para el análisis estadístico

de las citocinas proinflamatorias en tejido placentario se utilizaron pruebas t de student no pareadas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), y también fue utilizado para las características clínicas y demográficas de la población con el programa Graph Pad Prism V.8.4.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con el corte de $p < 0.05$.

10) RESULTADOS

Se realizó un estudio de casos y controles, en donde se incluyeron 21 pacientes que desarrollaron preeclampsia (casos) y 36 mujeres que desarrollaron un embarazo normal (controles) que contaba con tejido placentario y que tenían los datos clínicos completos.

Las características clínicas y demográficas de las mujeres incluidas en el presente estudio se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos y antropométricos de mujeres con embarazo normal y con preeclampsia.

	Embarazo Normal	Preeclampsia	Valor de p
N	36	21	
Edad (años)	31.1 \pm 5.3 (23-44)	29.6 \pm 7.1 (19-43)	NS
Peso pregestacional (Kg)	69.85 \pm 11.8 (51-92)	67.56 \pm 15.2 (46-94)	NS
Ganancia de peso (Kg)	10.7 \pm 4.3 (1.6-21)	9.8 \pm 4.4 (1.4-19.3)	NS
IMC (Kg/m²)	32.5 \pm 4.1 (25.24-43.15)	28.04 \pm 6.6 (24.20-44.10)	<0.01
Semanas de gestación	38.9 \pm 1.3 (37.1-41.1)	34.9 \pm 3.8 (26-40.5)	<0.0001

Peso (g) recién nacido	3244.5 ± 466.2 (2550-4515)	2060.5 ± 721.5 (825-3198)	<0.0001
Antecedentes de preeclampsia	NA	29%	NA
Presentación acúfenos y cefaleas	NA	14%	NA
Proteinuria (mg)	NA	527 ± 327.7	NA
Antecedentes hereditarios de hipertensión	36%	38%	NA

IMC: Índice de Masa Corporal, **HDL:** colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; **NA=**No aplicable; **NS=**No significativo.

Los valores se presentan en promedio ± desviación estándar y el rango entre paréntesis.

10.1 Análisis de expresión de ABCG2/BCRP y ABCC1/ABCG2

Las muestras de RNA con un índice de absorbancia 260/280 nm cercano a 2 fueron consideradas para la retrotranscripción.

Se evaluó la expresión génica de los transportadores *ABCG2/BCRP* y *ABCC1/MRP1* por medio de una RT-PCR en tiempo real, de acuerdo al análisis realizado por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión en placenta de mujeres que padecieron preeclampsia (n=21), en comparación con las que desarrollaron un embarazo normal (n=36) (Figura 12).

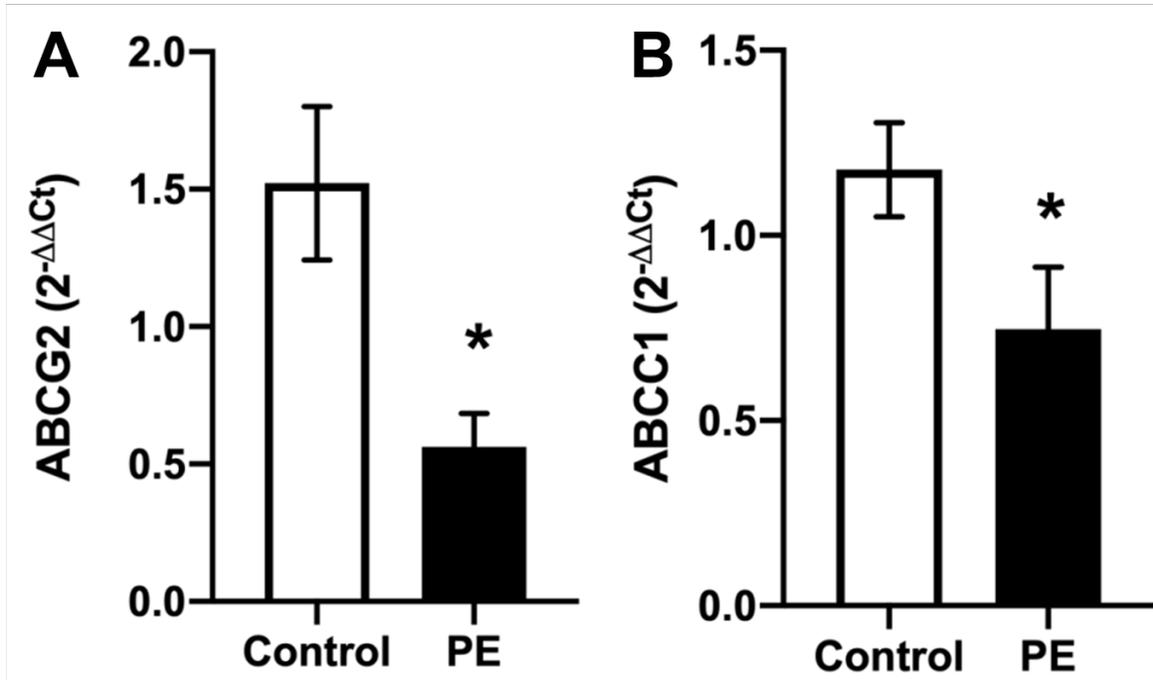


Figura 12. Expresión de mRNA de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1. Análisis de expresión génica por medio del método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los genes (A) ABCG2/BCRP y (B) ABCC1/MRP1 de la placenta de mujeres con preeclampsia ($n=21$) vs grupo control ($n=36$), para ambos genes se observa una disminución estadísticamente significativa en el grupo de casos. Método estadístico U Mann-Whitney, $*p < 0.05$. Para el caso de ABCG2/BCRP el gen disminuyó en la placenta de las mujeres que padecieron PE en un 68% mientras que para ABCC1/MRP1 la disminución fue menor con un 37%.

10.2 Análisis de los niveles de proteína de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en tejido placentario.

Los extractos de tejidos placentarios utilizados para la técnica de Western blot fueron divididos en cara materna y cara fetal debido a la localización de los transportadores analizados. Para ABCG2/BCRP se utilizó el extracto proteico de la cara materna y para el transportador ABCC1/MRP1 se empleó la cara fetal. Las bandas obtenidas corresponden a los pesos moleculares esperados para cada una de las proteínas, para ABCG2/BCRP se detectó una banda con un peso molecular debajo de los 72 kDa, entre 67-70 kDa, ya que se ha reportado que para

esta proteína los pesos moleculares pueden variar dependiendo del tejido seleccionado, su normalización fue realizada con la proteína GAPDH, cuyo peso molecular es de 37 kDa. Para ABCC1/MRP1 se encontraron bandas entre 150-250 kDa y se normalizó con α -Tubulina, con un peso molecular de 52 kDa.

En la figura 13 y 14 se observa que la placenta de mujeres con preeclampsia tienen una disminución en los niveles de proteína de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1, en comparación con la placenta de mujeres que desarrollaron un embarazo normal, dicha diferencia para ambos transportadores es estadísticamente significativa.

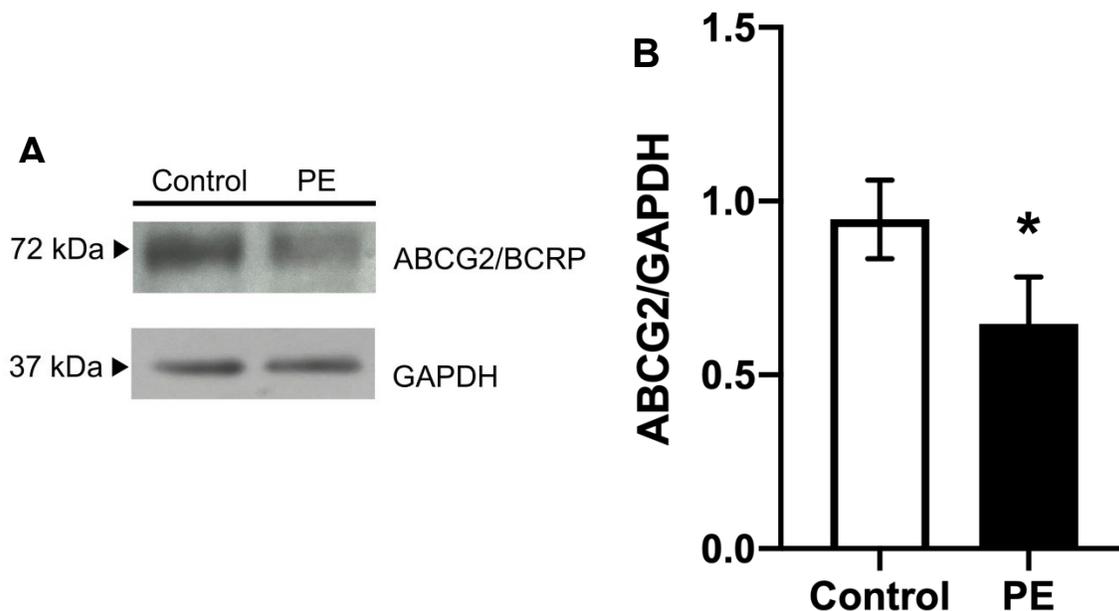


Figura 13. Nivel de expresión de la proteína ABCG2/BCRP. (A) Western Blot representativo para ABCG2/BCRP, el carril 1, representan una muestra control de extracto de proteínas placentario de mujer normal, el carril 2 representa una muestra problema de mujer preecláptica. Se observaron bandas de aproximadamente ~72 kDa. (B) Análisis densitométrico de ABCG2/BCRP, normalizado con GAPDH, el análisis estadístico demostró que la proteína ABCG2/BCRP se encuentra disminuida en un 32% en la placenta de mujeres preeclápticas. Se realizó una prueba estadística no paramétrica Mann U Whitney debido a que la prueba de normalidad indicó que los datos de cada grupo no se distribuyeron de

manera normal, por lo que se optó por utilizar un análisis no paramétrico. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, (* $p < 0.05$).

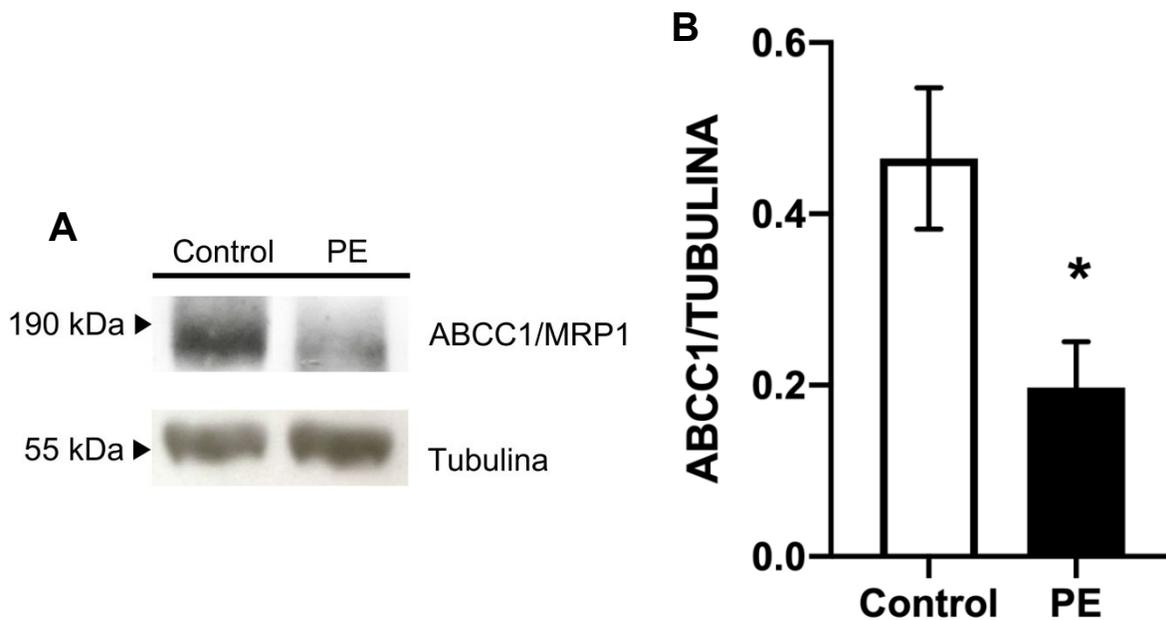


Figura 14. Nivel de expresión de la proteína ABCC1/MRP1. (A) Western Blot representativo para ABCC1/MRP1, se observó una banda entre los pesos moleculares 150-250 kDa, el carril 1 representa el control de mujeres con un embarazo sano, el carril 2 la muestra problema de una mujer con preeclampsia (B) Análisis densitométrico de ABCC1/MRP1, normalizado con α -Tubulina, el análisis estadístico demostró una disminución de la proteína ABCC1/MRP1 de un 58% en la placenta de mujeres con preeclampsia. Prueba estadística *t* de student. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, $p < 0.05$.

10.3 Detección de los niveles de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL-1 β e IL-6 en tejido placentario.

Las concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 fueron determinadas en extractos completos de proteína abarcando ambas caras de la placenta, y corregidos por mg de proteína total.

En la figura 15 y 16 se muestra el análisis de las concentraciones de las citocinas analizadas y se encontró que en la placenta de mujeres con PE hay un incremento estadísticamente significativo de las tres citocinas proinflamatorias, en comparación con las placentas de mujeres sanas.

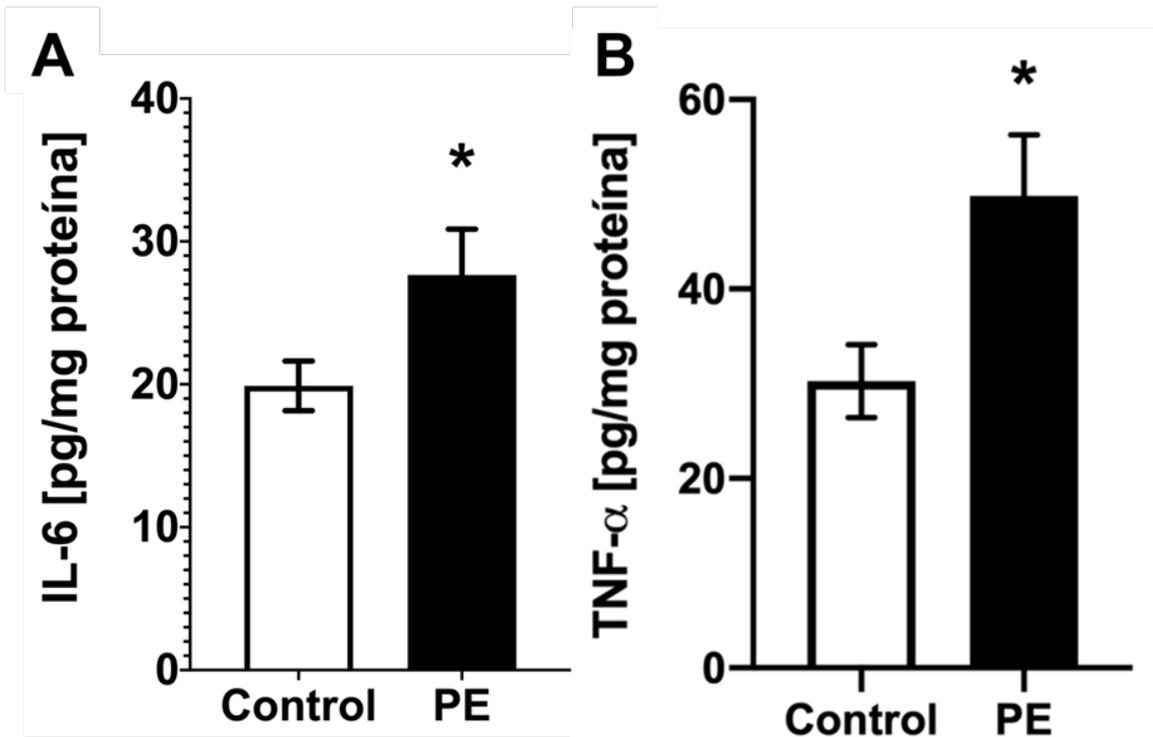


Figura 15. Niveles de citocinas proinflamatorias: TNF- α e IL-6. Se evaluó los niveles de las citocinas (A) TNF- α e (B) IL-6 en la placenta de mujeres con PE y en mujeres sanas. Existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de ambas citocinas en la placenta de las mujeres con preeclampsia contra las de gestación normal. La IL-6 se incrementó en mujeres embarazadas con PE cerca del 39%, mientras que para TNF- α el aumento se duplicó hasta un 64%. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Estadístico t de student no pareado, * $p < 0.05$.

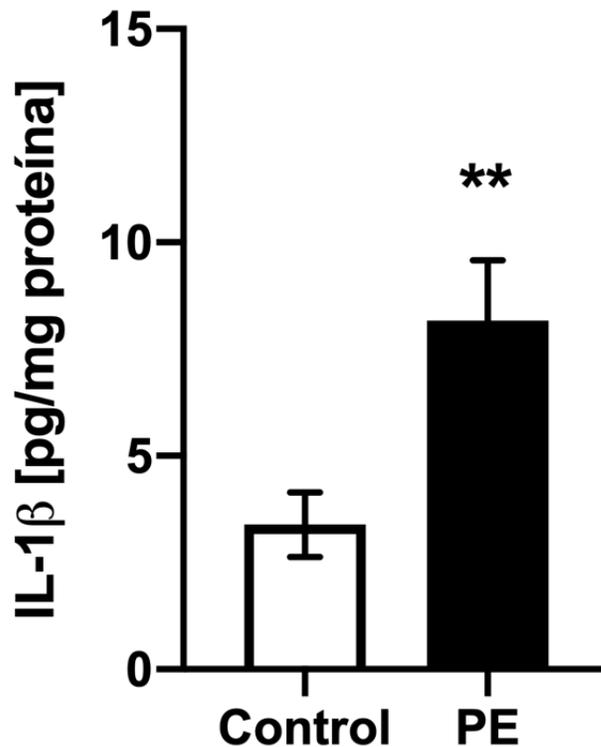


Figura 16. Nivel de la citocina IL-1 β en la placenta de mujeres con PE y embarazo normal. La placenta de las mujeres con PE tienen un aumento estadísticamente significativo en comparación con la placenta de mujeres con un embarazo normal, la IL-1 β tuvo un aumento mucho mayor en comparación con IL-6 y TNF- α , el aumento obtenido fue mayor al 100% contra el control. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Análisis estadístico t de student no pareado , ** $p < 0.01$.

11) DISCUSIÓN

La PE es una patología multisistémica que afecta principalmente a mujeres primigestas, con edad materna avanzada, preeclampsia en embarazo anterior, obesidad y con comorbilidades, tales como diabetes mellitus, enfermedades inmunológicas e hipertensión crónica. Las mujeres incluidas en este estudio tuvieron un 29% de antecedentes de preeclampsia y el 38% antecedentes hereditarios hipertensión, además de la hipertensión arterial alta tuvieron otros síntomas asociados a PE, tales como proteinuria, acufenos y cefaleas. A pesar de que la obesidad se considera un factor de riesgo, en nuestro grupo de estudio no

se observó esta tendencia, al contrario, el grupo de casos presentó un IMC mayor en comparación con el grupo de mujeres con PE. En cuanto al recién nacido, el peso al nacer de los bebés de madres con PE fue menor, así como las semanas de gestación; lo cual refuerza que esta patología es un factor de riesgo para un nacimiento prematuro, y esto a su vez un factor de riesgo para enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida adulta. De acuerdo a lo anterior y dado que la etiología de la enfermedad es desconocida, es importante en la práctica clínica poner atención en los factores de riesgo y primeros síntomas para intentar diagnosticar de manera temprana la enfermedad, mejorando así el manejo y tratamiento oportuno que lleven a buen término del embarazo.

Los resultados obtenidos de los ensayos de expresión y nivel de proteína de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 en placenta, muestran una disminución significativa en mujeres embarazadas con preeclampsia en comparación con mujeres que tuvieron una gestación normal. Los resultados indican que es posible que en la patología PE al verse implicado por varios mecanismos de estrés oxidativo e interleucinas derivadas de la inflamación interfiera con la expresión de las proteínas transportadoras ABC.

El desarrollo fetal es muy frágil durante la gestación, su desarrollo depende de un equilibrio óptimo entre la madre y el feto, la placenta es considerada el órgano crucial importante y responsable de ejercer el intercambio de nutrientes, oxígeno y no permitir que moléculas tóxicas entren y alteren al feto, además de ser considerada una barrera mecánica existen membranas que separan los compartimientos maternos y fetales (como los sincitiotrofoblastos). Al principio se tenía la idea de que la placenta era una excelente barrera contra todo tipo de exposición para que no llegase al compartimiento fetal, hoy en día se sabe que la mayoría de los fármacos pueden atravesar la barrera placentaria. Los transportadores ABC son importantes en la placenta gracias a su capacidad de actuar como transportadores primarios o bombas exportadoras de moléculas citotóxicas y teratogénicas que pueden afectar y comprometer el desarrollo fetal. En el presente estudio se observó una tendencia hacia la disminución de dos de

los transportadores abundantes en la placenta ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 afectados muy posiblemente por la patología de la mujer preecláptica, se sabe que ambos transportadores se encuentran implicados en la expulsión de xenobióticos y glutatión respectivamente, ayudando así a una citoprotección y protección celular del estrés y daño oxidativo placentario.

ABCG2/BCRP cumple un papel muy importante en la fetoprotección, y diversos estudios han evaluado esta función de la proteína. Un estudio en ratones gestantes knockout para ABCG2/BCRP, reveló que la concentración en la cara fetal del fármaco topotecán administrada aumentó, el topotecán es un fármaco utilizado contra el cáncer y es un sustrato de ABCG2/BCRP.¹⁰² Otro estudio en placenta humana indicó que al inhibir este transportador y al perfundir con el fármaco hiperglucemiante gliburida, obtuvieron un aumento significativo de este fármaco en la circulación fetal¹⁰³ lo que se asoció a su función directa en la salida de gliburida. La gliburida induce que el páncreas produzca mayor insulina, por lo que un incremento en su transporte podría causar un incremento en la insulina fetal y potenciar sus efectos como factor de crecimiento. ABCG2/BCRP limita el paso de fármacos a la circulación fetal, contribuyendo a la reducción del riesgo de teratogenicidad y efectos secundarios de fármacos en el feto, Los estudios encontrados de sustratos y transporte de ciertos fármacos mediado por ABCG2/BCRP podría generar un mayor riesgo para el feto de sufrir efectos secundarios.

El estado de hipoxia generado por una inadecuada remodelación de las arterias espirales de la placenta de mujeres con PE, provoca un incremento en el estrés oxidativo y una reacción inflamatoria exacerbada, llevando a un desbalance entre factores angiogénicos y no angiogénicos, además del aumento de citocinas proinflamatorias. La placenta de las mujeres con preeclampsia se encuentra en un estado inflamatorio donde debido a sus condiciones patológicas, la respuesta antiinflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria o aumentar de forma exagerada para inhibir el sistema inmune por lo que se

midieron citocinas proinflamatorias de la placenta para corroborar su aumento en las mujeres preeclámpicas.

La liberación de factores proinflamatorios provocan un daño endotelial, y es de esperarse que esta respuesta cause daños en los tejidos placentarios donde se encuentran las proteínas transportadoras ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1, pues es bien sabido que el estrés oxidativo causa problemas a niveles del sincitiotrofoblasto y las células endoteliales.¹⁰⁴ Diversos estudios han reportado que el transportador ABCG2/BCRP es de los más abundantes en el tejido placentario y su expresión durante las semanas de gestación aún se encuentra en debate, algunos autores han encontrado una menor expresión al final de la gestación, y otros estudios han encontrado que aumenta,^{84,105} sin embargo, todos los estudios llegan a la conclusión de que la proteína transportadora se encuentra presente en toda la gestación incluso al final. Para ABCC1/MRP1 sus niveles de expresión no cambian con el tiempo gestacional, lo que nos indicaría que la expresión de ambas proteínas encontradas en los Western Blot y la disminución de estas proteínas en placentas de término de mujeres que padecieron PE podrían asociarse directamente con la enfermedad.

Las células del trofoblasto en la placenta son importantes en las primeras semanas de gestación, sin embargo, la apoptosis celular de los trofoblastos en el tejido placentario de mujeres con PE podría alterar la estructura placentaria, existen estudios que demuestran que durante la patología se encuentra un aumento de apoptosis celular de células trofoblásticas y sincitiotrofoblásticas en el tejido placentario,^{106,107} la ruptura de membranas en las células sincitiotrofoblásticas y trofoblásticas podría deberse al aumento de citocinas, la mala perfusión placentaria y el aumento de aniones superóxido provocan un aumento de Ca^{2+} intracelular, favorecido del influjo de calcio, sodio y agua en el citoplasma provocando hinchazón y la activación de proteasas dependientes del calcio, conduciendo a la pérdida del citoesqueleto y lesión en la membrana en ambas células, ocasionando la muerte celular y la disminución progresiva de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 debido a la localización que tienen

ambos transportadores en las membranas celulares. Se sabe que una disminución de ABCG2/BCRP aumenta la apoptosis de los trofoblastos placentarios debido a los factores de estrés, esto conlleva a una relación dependiente con el estrés oxidativo y que ABCG2/BCRP no pueda efectuar su función de evitar la apoptosis debido a su disminución y la pérdida de las membranas por la misma causa.^{72,108} Otra alteración por la formación de ROS podría verse implicada en las células del sincitiotrofoblasto, ya que este tipo de células contiene bajos niveles de enzimas antioxidantes y se puede deteriorar el tejido fácilmente,¹⁰⁹ se sabe que ABCC1/MRP1 se encuentra localizado en éste tipo celular y en el endotelio de los vasos fetales,¹¹⁰ lo que puede asociarse también a la disminución de dicho transportador, esta disminución podría evitar la entrada de glutatión a las células por lo que de manera dependiente existiría menos control de moléculas antioxidantes y aumento de ROS.

En el ciclo de Krebs se requiere de oxígeno para llevar a cabo el mecanismo de la cascada de electrones y se genera ATP, debido a la falta de intercambio y transporte de oxígeno en la madre por la patología PE, no se activa la vía aeróbica, y en su lugar se activa la vía anaeróbica,¹¹¹ generando un menor número de ATP. Por lo anterior, la ATP-sintasa no funcionaría de manera correcta, causando un cese de producción de ATP's, lisis mitocondrial y muerte celular (apoptosis), este déficit energético podría afectar la función de los transportadores ABCC1/MRP1 y ABCG2/BCRP. Los dominios de unión a nucleótidos (NDB) actúan como una ATP-sintasa para hidrolizar el ATP y generar ADP y Pi, para abrir los dominios TMD; estos cambios conformacionales le confieren su funcionalidad; la disminución de la energía ocasionaría diversas alteraciones en el transporte de ambas proteínas, lo cual afecta directamente su funcionalidad celular al ser exclusivamente dependientes de ATP.

La peroxidación de lípidos se genera cuando los componentes lipídicos de las membranas celulares cuentan con la presencia de dobles enlaces en sus estructuras lo que los hace más vulnerables a su oxidación formando lípidos hidroperoxidados que alteran la permeabilidad y la funcionalidad celular, los

hidroperóxidos formados a partir de la oxidación de los lípidos poliinsaturados se descomponen en aldehídos reactivos como el 4-hidroxinonal, un producto electrofílico α - β insaturado, cuyo transporte está mediado por ABCC1/MRP1.^{51,55} Se ha reportado que la acumulación de este producto en las mitocondrias del hígado fetal en ratas, contribuye al daño oxidativo observado en los tejidos fetales además altera la proliferación y viabilidad de las células hematopoyéticas.^{112,113} La disminución de la proteína ABCC1/MRP1 localizada en la membrana basal del citotrofoblasto y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, incrementaría la acumulación de este producto tóxico, comprometiendo el desarrollo fetal. ABCC1/MRP1 también está implicado en el transporte del glutatión oxidado y reducido (mencionado anteriormente), un antioxidante que cataliza la reducción de H_2O_2 y elimina radicales libres, la menor expresión del transportador por parte del mismo proceso de estrés e inflamación que ocurre en mujeres PE, altera la disponibilidad del glutatión en las células epiteliales placentarias provocando un desequilibrio y aumento de ROS en la placenta, que pueden repercutir en daño fetal.

Se ha demostrado que en placentas de mujeres con preeclampsia existe una disminución de NRF2, y en otros casos evidencian su presencia pero no su actividad, un elemento regulatorio importante para la transcripción de las proteínas ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 placentarios, es posible que NRF2 se encuentra unido a INRF2; INRF2 retiene a NRF2 en el citoplasma y la degrada, esta interacción impide a NRF2 unirse a ARE, regulando así negativamente la expresión génica mediada por ARE, esto podría evidenciar la disminución de mRNA de ambas proteínas de las placentas preeclámpticas en este estudio.^{127,128,129}

Se sugiere que el estrés oxidativo desregula a la baja la expresión de los transportadores ABCG2 y ABCC1 en respuesta a ROS, y la expresión anormal de estos transportadores placentarios puede contribuir a una disminución del transporte del colesterol (al menos para ABCG2), tal disminución del transporte de colesterol de la madre hacia el feto puede comprometer directamente al desarrollo fetal, ya que el colesterol, es importante en las primeras semanas de embarazo¹¹⁴

y se ha demostrado que una disminución de LDL, HDL y colesterol total restringen el crecimiento intrauterino.¹²³⁻¹²⁶

Como se mencionó anteriormente, durante la PE, existe una activación del proceso inflamatorio con el incremento de granulocitos, monocitos y citocinas proinflamatorias, los mediadores de la inflamación desencadenan una activación de neutrófilos polinucleares, los neutrófilos se adhieren al endotelio vascular, donde se aumenta la demanda de oxígeno y en consecuencia se activan NADPH-oxidasa de membrana y la producción de radicales libres. La reacción de los radicales libres desencadena mecanismos que constituyen a su vez y nuevamente una reacción inflamatoria. Dado que el estrés oxidativo genera una inflamación, es de esperar que se activen citocinas proinflamatorias, de las cuales TNF- α , IL-6 e IL-1 β pueden alterar las expresiones de ABCG2/BCRP Y ABCC1/MRP1, se ha detallado que estas tres moléculas se encuentran aumentadas en la PE.

Se realizaron inmunoensayos para medir la expresión de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en los extractos de proteína obtenida de las placentas, mismas que fueron utilizadas para medir la expresión de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 a nivel proteico. Los resultados obtenidos tras la disminución de ambos transportadores y el aumento significativo de estas citocinas en la placenta de mujeres PE en comparación con aquellas mujeres que llevaron embarazos normales, podría asociarse a que las citocinas en la patología preecláptica inhiben la expresión de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1, aunque un estudio in vitro de trofoblastos tratados con TNF- α e IL-1 β no mostró cambios significativos en mRNA de ABCC1/MRP1 pero sí una disminución en ABCG2/BCRP.⁷²

La expresión de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 pueden ser reguladas por factores exógenos como endógenos. Se sabe que ABCG2/BCRP tiene una regulación a la baja por estrógenos, pero se regula a la alta con 17 β -estradiol.^{115,116} Se sabe, que en las mujeres con preeclampsia los niveles de estradiol y estrógenos disminuyen debido a la actividad de la aromatasa placentaria, por lo que posiblemente el 17 β -estradiol estaría implicado en la

disminución del transportador, mientras que los estrógenos no tendrían ninguna relevancia, sin embargo, un estudio demostró que el tratamiento con ambas hormonas en células BeWo resultó en el aumento de ABCG2/BCRP,^{117,118} aunque en este estudio no se determinó el efecto directo de 17 β -estradiol y progesterona existen estudios que han reportado la disminución de estas hormonas en la PE y que se relaciona con la regulación directa del transportador, lo cual correlacionaría con los hallazgos encontrados en este estudio de la disminución de mRNA de ABCG2/BCRP en mujeres preeclámpicas.

En un estudio con células trofoblásticas, el tratamiento con TNF- α e 1L-1 β resultó en la disminución del mRNA de ABCG2/BCRP.¹¹⁹

ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1 pueden desempeñar un papel importante en la eficacia de la barrera placentaria y, por lo tanto, deben tenerse en cuenta para prevenir la sobreexposición fetal a la medicación administrada por la madre. Además, el estado inflamatorio y de estrés en el que se encuentra la placenta de una mujer con preeclampsia, puede alterar la expresión de diversos transportadores, no solo los de la familia ABC, exacerbando las complicaciones maternas y fetales.

12) CONCLUSIONES

La placenta de mujeres con preeclampsia se caracteriza por un estado de hipoxia, estrés oxidativo y con un incremento significativo de citocinas proinflamatoria (IL-6, IL-1 β y TNF α), las cuales, modulan negativamente la expresión de los transportadores ABCG2/BCRP y ABCC1/MRP1. La disminución de dichos transportadores, podrían exacerbar el daño al feto, ya que están involucrados en la citoprotección del feto y regulación de moléculas anti-oxidantes y paso xenobioticos.

ANEXO I.

A. CARTA DE ACEPTACIÓN



INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

INPER-DG-DI- 0362-2017

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución
Política de los Estados Unidos Mexicanos"

CIUDAD DE MÉXICO, A 27 DE SEPTIEMBRE DE 2017

DRA. SONIA NAVA SALAZAR
INVESTIGADORA EN CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
P R E S E N T E

Me es grato informar a usted y a su grupo de colaboradores que los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad, han revisado y emitido el dictamen de **APROBADO**, correspondiente a su proyecto:

Evaluación de cambios epigenéticos en la familia de transportadores de colesterol ABC y su asociación con el desarrollo de dislipidemias en el binomio madre-recién nacido con preeclampsia

Registro: 212250-3210-21001-02-15

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un atento saludo.

ATENTAMENTE


DRA. GUADALUPE DEL CARMEN ESTRADA GUTIÉRREZ
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

GUG/PIG

Montes Urales 800. Col. Lomas Virreyes, Deleg. Miguel Hidalgo Distrito Federal C.P. 11000
Commutador: 5520 9900
www.inper.mx

B. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



ANEXO 2



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES
(INPerIER)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

NOMBRE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
ESTUDIO DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE DISLIPIDEMIAS EN EL BINOMIO MADRE - RECIÉN NACIDO CON PREECLAMPSIA

Lugar y fecha: Ciudad de México, México
Num. Registro: 212250-3210-21001-02-15
Responsable: Dra. Sonia Nava Salazar
Departamento de Inmunobiología, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 359

Mediante este documento se le solicita su autorización para tomarle a usted una muestra de sangre del cordón umbilical de su bebé y placenta, la cual es un tejido de desecho después de la cesárea, para un proyecto de investigación que ha sido aprobado por las comisiones de Investigación y ética del INPerIER.

Justificación del estudio: Mujeres con presión arterial alta en el embarazo pueden presentar niveles altos de grasas en la sangre, ambas condiciones se han asociado con un riesgo mayor de presentar niveles altos de azúcar en sangre y enfermedades del corazón, no sólo en la mamá, sino también en la vida adulta de los hijos de estas mujeres. El objetivo del presente trabajo es evaluar cambios que no se encuentran codificados en los genes relacionados a niveles altos de grasas en sangre de la mamá, de la placenta y del bebé en mujeres con presión alta durante el embarazo.

Procedencia del Financiamiento: El proyecto será financiado por el Instituto Nacional de Perinatología IER.

Propósito del estudio: En este proyecto queremos evaluar cambios que no se encuentran en el material genético (ADN) que regulan genes involucrados en el metabolismo de grasas en sangre en la mamá, su bebé y placenta. Esto nos permitirá conocer más sobre la regulación de grasas en sangre y su probable participación en el desarrollo de enfermedades asociadas a la misma.

Selección de participantes: Solicitamos su colaboración porque requerimos de muestras de sangre, cordón umbilical y tejido placentario de mujeres con un embarazo normal y con presión alta.

Uso, manejo y eliminación de muestras: inicialmente se realizará una historia clínica completa y un cuestionario sobre hábitos alimenticios, esta información será estrictamente confidencial y de suma importancia para el logro de los objetivos de este estudio. Posteriormente se le tomará una muestra de sangre en un tubo comparable con una jeringa de 10 mL. Una vez concluida la cesárea, obtendremos la muestra de sangre del cordón umbilical de su bebé y placenta, la cual es material de desecho una vez concluida la cesárea, para el análisis en el laboratorio.

Aclaraciones: El aceptar participar en el estudio no implicará la administración de medicinas ni exámenes diferentes a los que recibe actualmente. La decisión de participar implica que tendrá un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional, podrá ser aclarada por los investigadores responsables. Si no desea participar en el estudio, su tratamiento y atención no cambiará en calidad y podrá retirarse en el momento que lo desee. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

Riesgos: al recolectar la muestra de sangre se corre el riesgo de que aparezca un moretón en su brazo que no tiene ninguna consecuencia y que desaparecerá en 2 o 3 días; estos riesgos se reducen al emplear personal especializado para la obtención de muestras. La obtención de la muestra de sangre del recién nacido no representa ningún riesgo para su salud ni la del bebé, ya que se tomará del cordón umbilical de la placenta, una vez concluida su cesárea.

Efectos secundarios: Ninguno.

Beneficios: usted no obtendrá ningún beneficio al participar en el estudio. El presente protocolo sólo persigue fines académicos y de investigación.

Atención médica: Si usted decide participar o no en el estudio, no cambiará en nada la atención médica que recibirá en el instituto.

Privacidad y confidencialidad: Sus datos y la información obtenida en este estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Los resultados derivados del estudio podrán ser presentados en congresos científicos, informes y/o



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



publicaciones nacionales y/o internaciones. Los pacientes solo serán identificados por una clave asignada durante la tomas de muestra.

Costos financieros: Este estudio no tiene ningún costo para usted.

Compensación: usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio

Del paciente:

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta, que al momento de firmar el presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha informado que el participar en este estudio no aumentará los costos de la atención médica que se me deba brindar, y que toda información que se otorgue sobre mi identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice. Si ya no deseo participar en el estudio, la calidad de mi tratamiento y atención, no cambiará.

Autorizo que los resultados derivados del estudio sean presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones y mi nombre no será revelado, ya que solo será identificado por una clave asignada durante la toma de muestra

Gracias por su Cooperación

Yo _____
Nombre y firma del participante

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en este protocolo de investigación cuyo objetivo, procedimiento, beneficios y riesgos se especifican en la primera sección de este documento.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.
Para dudas y aclaraciones, deberá dirigirse con el/la Presidente (a) del Comité de ética en investigación.

Responsable _____ Firma _____

Testigo _____

Firma _____
Nombre, dirección y relación

Testigo _____

Firma _____
Nombre, dirección y relación

ANEXO II.

REACTIVOS

A. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA

Preparación curva estándar (BSA):

Diluir la albúmina de suero bovino (BSA) de acuerdo a la siguiente tabla:

Vial	PBS (μL)	BSA (μL)	Concentración final ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
A	0	300 stock	2000
B	125	375 stock	1500
C	325	325 stock	1000
D	175	175 del vial B	750
E	325	325 del vial C	500
F	325	325 del vial E	250
G	325	325 del vial F	125
H	400	100 del vial G	25
I	400	0	0=Blanco

Stock BSA estándar: 2 mg/mL

Preparación del reactivo de trabajo (WR):

Mezclar 50 partes del reactivo A de BCA con 1 parte del reactivo B (50:1 reactivo A:B), por cada pozo, se adicionaron 200 μL .

Preparación de las muestras:

Las muestras extraídas obtuvieron un volumen final alrededor de 300 μL , se realizó una dilución 1:20 y posteriormente se añade a cada pozo 25 μL de la

muestra por triplicado y 25 μ L de cada vial de la curva estándar por duplicado. La lectura se realiza en un espectro a 562 nm.

B. REACTIVOS WESTERN BLOT Y ELISA.

Preparación de Tris 0.5 M pH=6.8

- Pesar 6.05 g de Tris-base (Peso molecular 121.15 g/mol)
- Disolver en aproximadamente 80 mL de H₂O Mili-Q
- Ajustar a pH 6.8 adicionando HCl concentrado
- Aforar la solución a 100 mL con H₂O Mili-Q
- Filtrar solución y guardar a 4°C.

Preparación de Tris 1.5 M pH=8.8

- Pesar 18.17 g de Tris-base (Peso molecular 121.15 g/mol)
- Disolver en aproximadamente 80 mL de H₂O Mili-Q
- Ajustar a pH 8.8 adicionando HCl concentrado
- Aforar la solución a 100 mL con H₂O Mili-Q
- Filtrar solución y guardar a 4°C.

Solución Stock de Coomassie

- 0.5 g de azul de coomassie R-250 se diluyen en 50 mL de H₂O Mili-Q
- Filtrar y guardar en bote ámbar y evitar exposición a la luz.

Solución teñidora

- 10% de metanol
- 10% de ácido acético
- 10% de azul de coomassie R-250 de solución stock
- Aforar a 500 mL con H₂O Mili-Q.
- Filtrar y guardar en bote ámbar y evitar exposición a la luz.

Solución desteñidora

- 10% de metanol
- 10% de ácido acético
- Aforar a 500 mL con H₂O Mili-Q.

APS al 10%

- Pesar 0.010 g de Persulfato de Amonio (Peso molecular: 228.20 g/mol)
- Disolver en 100 µL con H₂O Mili-Q.

Buffer de corrida 10X

- Pesar 72 g de glicina (Peso molecular: 75.07 g/mol).
- Pesar 5.0 g de SDS
- Pesar 15.1 g de Tris-Base (Peso molecular: 121.15 g/mol)
- Diluir en 500 mL con H₂O Mili-Q.

Para cada corrida se tomaron 100 mL de Buffer de corrida 10X y se aforo a 1000 mL con H₂O Mili-Q.

Buffer de transferencia 5X al 10% de metanol

- Pesar 72 g de glicina (Peso molecular: 75.07 g/mol).
- Pesar 15.15 g de Tris-Base (Peso molecular: 121.15 g/mol)
- Diluir en 1000 mL con H₂O Mili-Q.

Para cada transferencia se tomaron 200 mL de Buffer de transferencia 5X y 100 mL de metanol, posteriormente se aforo a 1000 mL con H₂O Mili-Q.

Solución de lavado de membranas: PBS-T 0.1%

- Por cada sobre de PBS pH=7.4 0.01 M (SIGMA Lot: SLBM8788V) se disuelve en 1000 mL de H₂O Mili-Q. (Stock)
- Medir 250 mL de PBS Stock y adicionar 250 µL de Tween 20.

Buffer Stripping

- Pesar 15 g de glicina (Peso molecular: 75.07 g/mol).
- Pesar 1.0 g de SDS
- Medir 10 mL de Tween20.
- Disolver en 900 mL con H₂O Mili-Q.
- Ajustar pH a 2.2
- Aforar a 1000 mL con H₂O Mili-Q

TBS-T 0.05% pH=7.6

- 20 mM Tris-Base (Pesar 2.42 g)
- 150 mM NaCl (Pesar 8.8 g)
- Disolver en 1000 mL con H₂O Mili-Q
- Adicionar 0.5 mL de Tween20.

Preparación de muestras para electroforesis

Se cargaron en cada pozo 75 µg de proteína (se calculó el volumen para cada una de las muestras). El volumen de la muestra fue mezclado con 8 µL de Buffer laemmli (BIO-RAD, cat. 161-0747) y 1 µL de DTT 1M.

Preparación de solución de bloqueo 10%

- Pesar 3.5 g de leche descremada.
- Diluir en 35 mL de PBS-T 0.1%

Preparación de solución de bloqueo 5%

- Pesar 1.75 g de leche descremada.
- Diluir en 35 mL de PBS-T 0.1%

Geles de acrilamida/bis-acrilamida al 8%

Tabla 8. Gel de acrilamida/bis-acrilamida 8%		
Reactivo	Gel concentrador	Gel separador
H₂O Mili-Q	1.44 mL	2.60 mL
Tris-HCl 1.5 M pH=8.8	-----	1.30 mL
Tris-HCl 0.5 M pH=6.8	250 µL	-----
SDS 10%	25 µL	50 µL
Acrilamida 40%	10 µL	1.0 mL
APS 10%	10 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL

ANEXO III.

A. TINCIÓN DE COOMASSIE.

GEL 1. ABCG2/BCRP

GEL 2. ABCC1/MRP1

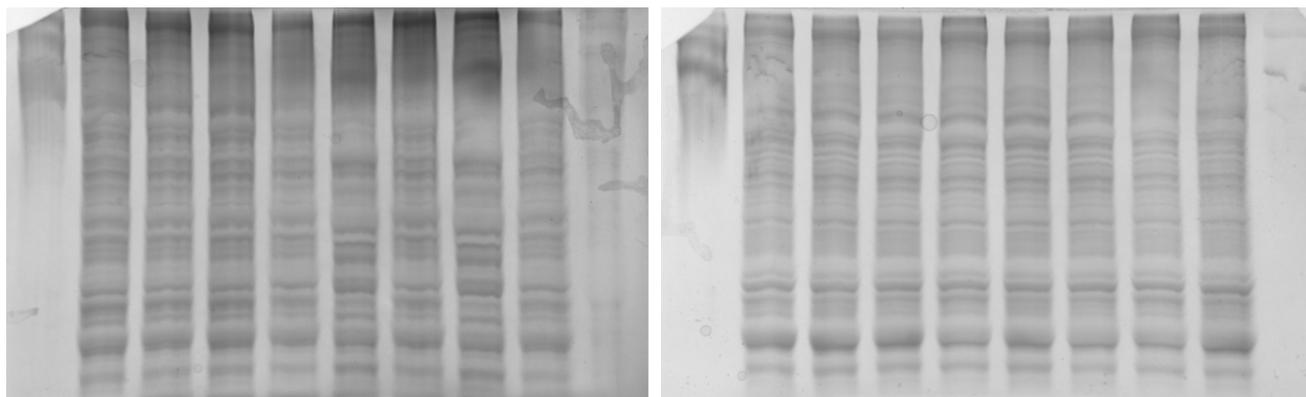


Figura 17. Tinción de Coomassie. Cada carril del gel 1 fue cargado con 75 μ g de proteína de caras maternas de placenta, cada muestra control y problema contenían 7 μ L de Buffer Laemmli y 1 μ L de DDT para la detección de la proteína ABCG2/BCRP; el gel 2 fue cargado con la misma concentración de proteína para ABCG2/BCRP, cada carril corresponde a caras fetales para la detección de la proteína ABCC1/MRP1.

B. MEMBRANA TEÑIDA CON ROJO PONCEAU (TRANSFERENCIA)

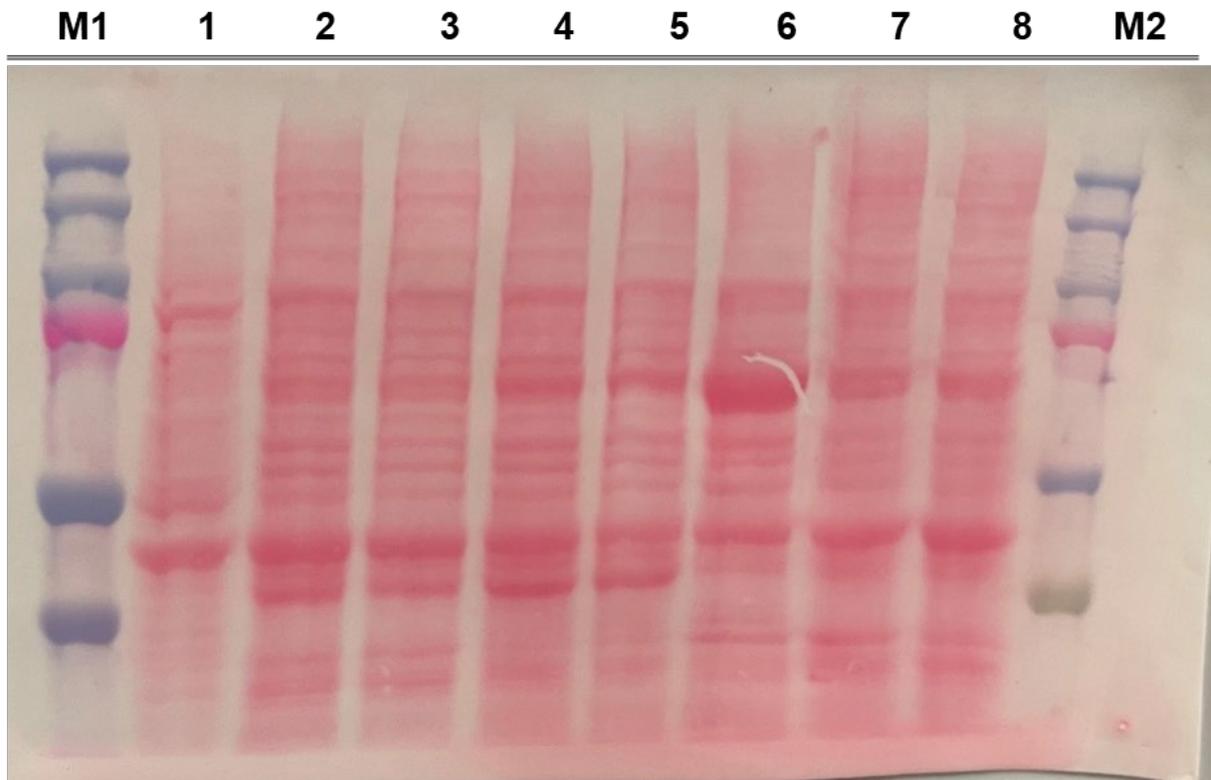


Figura 18. Membrana teñida con Rojo de Ponceau después de transferir. M1. Marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color*). Los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a los controles obtenidos de placenta de mujeres con un embarazo normal; los carriles 5, 6, 7 y 8 corresponden a las mujeres que padecieron preeclampsia. M2. Marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Kaleidoscope*)

C. WESTERN BLOT: ABCG2/BCRP, ABCC1/MRP1 Y CONTROLES DE CARGA (QUIMIOLUMINISCENCIA)

A. WESTERN BLOT ABCG2/BCRP Y GAPDH

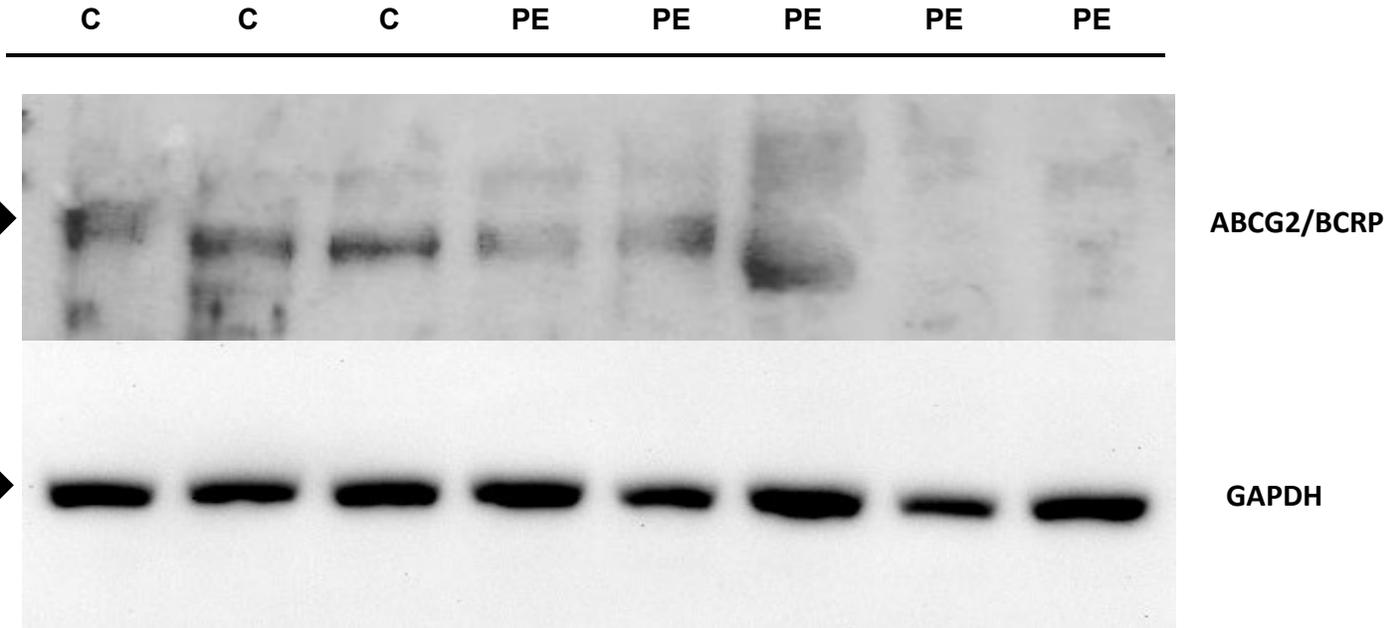


Figura 19. Western Blot de ABCG2/BCRP. Las bandas señaladas corresponden al peso molecular de cada proteína. Los primeros 3 carriles representan las muestras control de placenta de un embarazo normal, los últimos 5 carriles representan las muestras de placenta de mujeres que padecieron preeclampsia, abajo se encuentra la proteína control de carga GAPDH.

B. WESTERN BLOT ABCC1/MRP1 Y α -TUBULINA

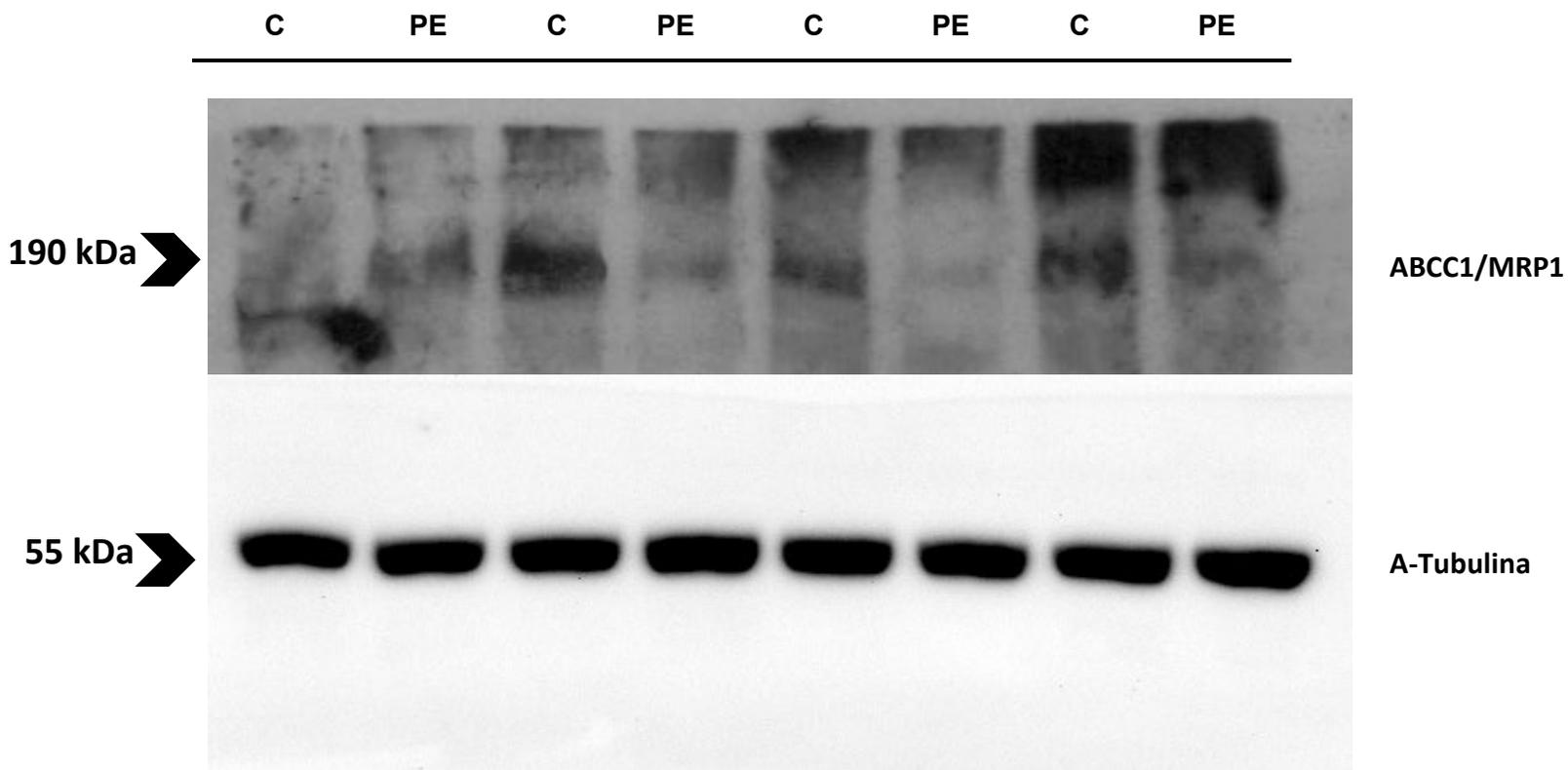


Figura 20. Western Blot de ABCC1/BCRP. Las bandas señaladas corresponden al peso molecular de cada proteína. Los carriles fueron alternados entre los controles y las muestras de placenta de mujeres que padecieron preeclampsia, abajo se encuentra la proteína control de carga α -Tubulina.

13) REFERENCIAS

1. Briones-Garduño JC, Díaz de León-Ponce M, Briones-Vega CD. Muerte Materna por Preeclampsia. En: Colección Medicina de Excelencia. Academia Mexicana de Cirugía. Ed. Alfil. México 2013. Disponible en: <http://cvoed.imss.gob.mx/COED/home/normativos/DPM/archivos/coleccionmedicinadeexcelencia/24%20Mortalidad%20materna-Interiores.pdf>
2. Korkes, H. A., Bauer, R. J., & Sass, N. (2022). Chronic Hypertension in Pregnancy. *Perinatology*. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-83434-0_21
3. Steegers, E. A., von Dadelszen, P., Duvekot, J. J., & Pijnenborg, R. (2010). Pre-eclampsia. *The Lancet*, 376(9741), 631–644. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60279-6)
4. Gestational Hypertension and Preeclampsia. (2020). *Obstetrics & Gynecology*, 135(6), 1492–1495. <https://doi.org/10.1097/aog.0000000000003892>
5. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. (2018, July 01). Elsevier. doi: 10.1016/j.preghy.2018.05.004
6. Cosmi, E., Fanelli, T., Visentin, S., Trevisanuto, D., & Zanardo, V. (2011). Consequences in Infants That Were Intrauterine Growth Restricted. *Journal of Pregnancy*, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2011/364381>
7. Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. (2016, November 01). Elsevier. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2016.09.007
8. Preeclampsia - ClinicalKey. (2022, May 04). Retrieved from <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/playContent/1-s2.0-S0889854515000212?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0889854515000212%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F>
9. Evans, Arthur T.. *Manual de Obstetricia*, Wolters Kluwer, 2015. *ProQuest Ebook Central*, <https://www.proquest.com/legacydocview/EBC/6359425?accountid=14598>

10. Eclampsia in the 21st century. (2022, February 01). Mosby. doi: 10.1016/j.ajog.2020.09.037
11. Éclampsie. (2010, April 01). Elsevier Masson. doi: 10.1016/j.annfar.2010.02.021
12. Álvarez-Fernández, I., Prieto, B., & Álvarez, F. V. (2016). Preeclampsia. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 9(2), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2016.04.002>
13. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. (2016, April 19). BMJ. doi: 10.1136/bmj.i1753
14. Lisonkova, S., & Joseph, K. S. (2013). Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 209(6), 544.e1–544.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.08.019>
15. Acho Mego, S., Díaz, J., & Navarro, R. (2015). Riesgo de preeclampsia en gestantes nulíparas de 24 a 26 semanas de gestación con muesca protodiastólica e índice de resistencia >0,58 en las arterias uterinas. *Revista Peruana de Ginecología Y Obstetricia*, 55(4), 260–265. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v55i302>
16. UV Ukah, B Payne, AM Côté, Z Hoodbhoy (2016). Risk factors and predictors of pre-eclampsia. https://www.glowm.com/pdf/new-pregnancy_hypertension-chapter5.pdf
17. Guevara-Ríos, Gonzales-Medina (2019) Rev Peru Investig Matern Perinat. Factores de riesgo de preeclampsia, una actualización desde la medicina basada en evidencias. <https://investigacionmaternoperinatal.inmp.gob.pe/index.php/rpinmp/article/download/140/144>
18. De, G., & Rápida, R. (n.d.). GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA GPC Detección, Diagnóstico y Tratamiento DE LAS ENFERMEDADES HIPERTENSIVAS DEL EMBARAZO. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/058GRR.pdf>

- 19.** Gaus, D., Guevara, A., & Herrera, D. (2019). Preeclampsia / Eclampsia. *Práctica Familiar Rural*, 4(2), 6. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7527382>
- 20.** Bouter, A. R., & Duvekot, J. J. (2020). Evaluation of the clinical impact of the revised ISSHP and ACOG definitions on preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 19, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.11.011>
- 21.** Gómez Carbajal, L. M. (2014). Actualización en la fisiopatología de la preeclampsia: update. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 60(4), 321–332. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322014000400008
- 22.** Management of pregnancies with suspected preeclampsia based on 6-hour vs 24-hour urine protein collection—a randomized double-blind controlled pilot trial. (2021, September 01). Elsevier. doi: 10.1016/j.ajogmf.2021.100429
- 23.** Camacho-Méndez, K., Ventura-Arizmendi, E., Zárate, A., & Hernández-Valencia, M. (2018). Utilidad de los biomarcadores séricos involucrados en la fisiopatología de la preeclampsia como predictores tempranos de diagnóstico. *Perinatología y Reproducción Humana*, 32(1), 39–42. doi: 10.1016/j.rprh.2018.04.002
- 24.** Prevención, diagnóstico y tratamiento de la preeclampsia en el segundo y tercer niveles de atención – CATÁLOGO MAESTRO. (2022, April 30). Retrieved from <https://cenetec-difusion.com/gpc-sns/?p=1471>
- 25.** Noroña Calvachi, C. D. (2014). Preeclampsia: la Era de los Marcadores Bioquímicos. *Revista Científica Ciencia Médica*, 17(2), 32–38. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332014000200008
- 26.** Tranquilli, A. L., Dekker, G., Magee, L., Roberts, J., Sibai, B. M., Steyn, W., Zeeman, G. G., & Brown, M. A. (2014). The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 4(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2014.02.001>

- 27.** Palei AC, Spradley FT, Warrington JP, George EM, Granger JP. Pathophysiology of hypertension in pre-eclampsia: a lesson in integrative physiology. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013; 208:224–233. doi: 10.1111/apha.12106
- 28.** Rana, S., Lemoine, E., Granger, J. P., & Karumanchi, S. A. (2019). Preeclampsia. *Circ. Res.* Retrieved from https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCRESAHA.118.313276?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003%ED%94%AF_id=ori%3Arid%3Acrossref.org#R21
- 29.** Repositorio de Tesis DGBSDI: Estudio de la regulación del HIF-1 α y de polimorfismos genéticos asociados al desarrollo de preeclampsia. (2021, December 30). Retrieved from https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000670692
- 30.** Heazell, Alexander, et al. *Hypertension in Pregnancy*, Cambridge University Press, 2010. ProQuest Ebook Central, <https://www.proquest.com/legacydocview/EBC/564399?accountid=14598>
- 31.** Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction*, 69(1), 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014977>
- 32.** Repositorio de Tesis DGBSDI: Estudio de la regulación del HIF-1 α y de polimorfismos genéticos asociados al desarrollo de preeclampsia. (2021, December 30). Retrieved from https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000670692
- 33.** Granger, J. P., Alexander, B. T., Llinas, M. T., Bennett, W. A., & Khalil, R. A. (2001). Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. *Hypertension*, 38(3), 718–722. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.38.3.718>
- 34.** Tannetta, D., & Sargent, I. (2013). Placental Disease and the Maternal Syndrome of Preeclampsia: Missing Links? *Current Hypertension Reports*, 15(6), 590–599. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0395-7>

- 35.** Bell, E. (2004). A bad combination. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 927–927. doi: 10.1038/nri1514
- 36.** Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2005). Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*, 308(5728), 1592–1594. <https://doi.org/10.1126/science.11111726>
- 37.** Moll W, Nienartowicz A, Hees H, Wrobel KH, Lenz A. Blood flow regulation in the uteroplacental arteries. *Troph Res.* 1988;3:83–96
- 38.** Charnock-Jones, D. S., Jauniaux, E., & Burton, G. J. (2022). The Placental Circulations. Benirschke's Pathology of the Human Placenta. Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-84725-8_9
- 39.** Ernesto Valdivia-Silva, J., González-Altamirano, J. C., López-Molina, K., Lazo-Velásquez, J. C., & García-Zepeda, E. (2008). Relación de la expresión del factor inducido por hipoxia-2 α (HIF-2 α) y sVEGF-R1/sFlt-1: implicación en la fisiopatología de preeclampsia. *Clínica E Investigación En Ginecología Y Obstetricia*, 35(1), 11–23. [https://doi.org/10.1016/s0210-573x\(08\)73033-8](https://doi.org/10.1016/s0210-573x(08)73033-8)
- 40.** *Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction | American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* (2020). American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.01113.2007>
- 41.** Serkova, N., Bendrick-Peart, J., Alexander, B., & Tissot van Patot, M. C. (2003). Metabolite Concentrations in Human Term Placentae and Their Changes Due to Delayed Collection After Delivery. *Placenta*, 24(2-3), 227–235. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0908>
- 42.** Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press. <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>
- 43.** Huppertz, B., Kingdom, J., Caniggia, I., Desoye, G., Black, S., Korr, H., & Kaufmann, P. (2003). Hypoxia Favours Necrotic Versus Apoptotic Shedding of

Placental Syncytiotrophoblast into the Maternal Circulation. *Placenta*, 24(2-3), 181–190. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0903>

44. Malek, A., Sager, R., & Schneider, H. (2001). Effect of Hypoxia, Oxidative Stress and Lipopolysaccharides on the Release of Prostaglandins and Cytokines from Human Term Placental Explants. *Placenta*, 22, S45–S50. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0635>

45. Hernandez, I., Fournier, T., Chissey, A., Therond, P., Slama, A., Beaudeau, J.-L., & Zerrad-Saadi, A. (2019). NADPH oxidase is the major source of placental superoxide in early pregnancy: association with MAPK pathway activation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50417-4>

46. Schoots, M. H., Gordijn, S. J., Scherjon, S. A., van Goor, H., & Hillebrands, J.-L. (2018). Oxidative stress in placental pathology. *Placenta*, 69, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.03.003>

47. Rang, H., Ritter, J., & Flower, R. (2016). *Rang y dale. farmacología*. Elsevier Health Sciences Spain - T.

48. Calvo, A. (Ed.). (2015). *Biología celular biomédica*. Elsevier Health Sciences Spain - T.

49. Xiong, J., Feng, J., Yuan, D., Zhou, J., & Miao, W. (2015). Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep16724>

50. Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2014). *Berne y levy. fisiología + studentconsult*. Elsevier.

51. Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity. (2019). In X. Liu & G. Pan (Eds.), ABC Family Transporters. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4>

52. Han, L. W., Gao, C., & Mao, Q. (2018). An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14(8), 817–829. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1499726>

53. Lodish, H., et al. *Biología celular y molecular*. 7th ed., 2015. Editorial médica panamericana.

- 54.** Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7(14). <https://facultyopinions.com/prime/reports/b/7/14/>
- 55.** Céspedes Miranda, E., & Castillo Herrera, J. (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso: Realidad o mito. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 27(2), 0–0. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002008000200003
- 56.** Ford, R. C., & Beis, K. (2019). Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 23–36. <https://doi.org/10.1042/bst20180147>
- 57.** Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893. <https://doi.org/10.1042/bst20150047>
- 58.** Choi, C. C., & Ford, R. C. (2021). ATP binding cassette importers in eukaryotic organisms. *Biological Reviews*, 96(4), 1318–1330. <https://doi.org/10.1111/brv.12702>
- 59.** Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., & Chang, G. (2009). Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, 323(5922), 1718–1722. <https://doi.org/10.1126/science.1168750>
- 60.** Linton, K. J., & Higgins, C. F. (2006). Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 453(5), 555–567. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0126-x>
- 61.** El-Awady, R., Saleh, E., Hashim, A., Soliman, N., Dallah, A., Elrasheed, A., & Elakraa, G. (2017). The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00535>
- 62.** Rees, D. C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 218–227. <https://doi.org/10.1038/nrm2646>

- 63.** El-Awady, R., Saleh, E., Hashim, A., Soliman, N., Dallah, A., Elrasheed, A., & Elakraa, G. (2017). The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00535>
- 64.** *Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems | Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (2022). Microbiology and Molecular Biology Reviews. https://journals-asm-org.pbidi.unam.mx:2443/doi/10.1128/MMBR.00031-07?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
- 65.** Dhasmana, D., Singh, A., Shukla, R., Tripathi, T., & Garg, N. (2018). Targeting Nucleotide Binding Domain of Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP1) for the Reversal of Multi Drug Resistance in Cancer. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30420-x>
- 66.** Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., & Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters*, 370(1), 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>
- 67.** Orengo, C. A., & Bateman, A. (Eds.). (2014). *Protein families : Relating protein sequence, structure, and function*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- 68.** Bloise E, Ortiga-Carvalho TM, Reis FM, Lye SJ, Gibb W, Matthews SG. ATP-binding cassette transporters in reproduction: a new frontier. *Hum Reprod Update*. 2016 Mar-Apr;22(2):164-81. doi: 10.1093/humupd/dmv049. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26545808; PMCID: PMC4755438.
- 69.** Nova, S. P. I. (2013). *Placenta : Development, function and diseases*. Nova Science Publishers, Incorporated.
- 70.** Evseenko D.A., Paxton J.W., Keelan J.A. The Xenobiotic Transporter ABCG2 Plays a Novel Role in Differentiation of Trophoblast-like BeWo Cells. *Placenta*. 2007;28:S116–S120. doi: 10.1016/j.placenta.2006.12.003.
- 71.** Aye I.L.M.H., Keelan J.A. Placental ABC transporters, cellular toxicity and stress in pregnancy. *Chem. Biol. Interact*. 2013;203:456–466. doi: 10.1016/j.cbi.2013.03.007.

- 72.** Evseenko, D. A., Murthi, P., Paxton, J. W., Reid, G., Emerald, B. S., Mohankumar, K. M., Lobie, P. E., Brennecke, S. P., Kalionis, B., & Keelan, J. A. (2007). The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *The FASEB Journal*, 21(13), 3592–3605. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8688com>
- 73.** Behravan, J., & Piquette-Miller, M. (2007). Drug transport across the placenta, role of the ABC drug efflux transporters. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 3(6), 819–830. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.6.819>
- 74.** Gupta, R. C. (Ed.). (2011). *Reproductive and developmental toxicology*. Elsevier Science & Technology.
- 75.** Walker, N., Filis, P., Soffientini, U., Bellingham, M., O’Shaughnessy, P. J., & Fowler, P. A. (2017). Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences†. *Biology of Reproduction*, 96(4), 733–742. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox012>
- 76.** Mao. (2011). ATP-Binding Cassette Efflux Transporters in Human Placenta. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(4), 674. [https://www.ncbi.nlm-nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/pmc/articles/PMC3081393/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/pmc/articles/PMC3081393/)
- 77.** Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>
- 78.** Vähäkangas, K., & Myllynen, P. (2009). Drug transporters in the human blood-placental barrier. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 665–678. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x>
- 79.** Koren, G., & Ornoy, A. (2018). The role of the placenta in drug transport and fetal drug exposure. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(4), 373–385. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1425615>
- 80.** Yamashita, M., & Markert, U. R. (2021). Overview of Drug Transporters in Human Placenta. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13149. <https://doi.org/10.3390/ijms222313149>

- 81.** Woodward, O. M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B., & Köttgen, M. (2009). Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(25), 10338–10342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901249106>
- 82.** Van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J. W., Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2007). Multidrug Transporter ABCG2/Breast Cancer Resistance Protein Secretes Riboflavin (Vitamin B₂) into Milk. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(4), 1247–1253. <https://doi.org/10.1128/mcb.01621-06>
- 83.** Mathias, A. A., Hitti, J., & Unadkat, J. D. (2005). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *289*(4), R963–R969. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00173.2005>
- 84.** Yeboah, D., Sun, M., Kingdom, J., Baczyk, D., Lye, S. J., Matthews, S. G., & Gibb, W. (2006). Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *84*(12), 1251–1258. <https://doi.org/10.1139/y06-078>
- 85.** Chen, L., Manautou, J. E., Rasmussen, T. P., & Zhong, X. (2019). Development of precision medicine approaches based on inter-individual variability of BCRP/ABCG2. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *9*(4), 659–674. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.01.007>
- 86.** Vore, M., & Leggas, M. (2007). Progesterone Acts via Progesterone Receptors A and B to Regulate Breast Cancer Resistance Protein Expression: Fig. 1. *Molecular Pharmacology*, *73*(3), 613–615. <https://doi.org/10.1124/mol.107.044289>
- 87.** Englund, G., Jacobson, A., Rorsman, F., Artursson, P., Kindmark, A., & Rönnblom, A. (2007). Efflux transporters in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *13*(3), 291–297. <https://doi.org/10.1002/ibd.20030>
- 88.** PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine). (2012). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8411623/>

- 89.** Ebert, B., Seidel, A., & Lampen, A. (2005). Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*, *26*(10), 1754–1763. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi139>
- 90.** Gorczyca, L., & Aleksunes, L. M. (2020). Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2efflux transporter: a review across tissues and species. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *16*(3), 239–253. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1732348>
- 91.** Bouchghoul, H., Alvarez, J.-C., Verstuyft, C., Bouyer, J., & Senat, M.-V. (2020). Transplacental transfer of glyburide in women with gestational diabetes and neonatal hypoglycemia risk. *PLOS ONE*, *15*(5), e0232002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232002>
- 92.** *ClinicalKey*. (2022). Unam.mx. <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/book/3-s2.0-B9780323673204000754?scrollTo=%23t0025>
- 93.** Mao, Q. (2008). BCRP/ABCG2 in the Placenta: Expression, Function and Regulation. *Pharmaceutical Research*, *25*(6), 1244–1255. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9537-z>
- 94.** Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity. (2019). In X. Liu & G. Pan (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4>
- 95.** Granitzer, S., Ellinger, I., Khan, R., Gelles, K., Widhalm, R., Hengstschläger, M., Zeisler, H., Desoye, G., Tupova, L., Ceckova, M., Salzer, H., & Gundacker, C. (2020). In vitro function and in situ localization of Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)1 (ABCC1) suggest a protective role against methyl mercury-induced oxidative stress in the human placenta. *Archives of Toxicology*, *94*(11), 3799–3817. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02900-5>
- 96.** McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2011). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- 97.** Leong, S. L., Chaiyakunapruk, N., & Lee, S. W. H. (2017). Candidate Gene Association Studies of Anthracycline-induced Cardiotoxicity: A Systematic Review

and Meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00075-1>

98. Nagashige, M., Ushigome, F., Koyabu, N., Hirata, K., Kawabuchi, M., Hirakawa, T., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Ohtani, H., & Sawada, Y. (2003). Basal Membrane Localization of MRP1 in Human Placental Trophoblast. *Placenta*, 24(10), 951–958. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(03\)00170-x](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(03)00170-x)

99. Afrouzian, M., Al-Lahham, R., Patrikeeva, S., Xu, M., Fokina, V., Fischer, W. G., Abdel-Rahman, S. Z., Costantine, M., Ahmed, M. S., & Nanovskaya, T. (2018). Role of the efflux transporters BCRP and MRP1 in human placental bio-disposition of pravastatin. *Biochemical Pharmacology*, 156, 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.09.012>

100. RNeasy Mini Kit. (2012). RNeasy® Mini Handbook. <http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf>

101. SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Catalog Number 18080-400. (n.d.). Retrieved June 23, 2021, from

102. Evans, Arthur T.. *Manual de Obstetricia*, Wolters Kluwer, 2015. *ProQuest Ebook Central*, <https://www.proquest.com/legacydocview/EBC/6359425?accountid=14598>

103. Pollex, E., Lubetsky, A., & Koren, G. (2008). The Role of Placental Breast Cancer Resistance Protein in the Efflux of Glyburide across the Human Placenta. *Placenta*, 29(8), 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.05.001>

104. Jauniaux, E., Hempstock, J., Greenwold, N., & Burton, G. J. (2003). Trophoblastic Oxidative Stress in Relation to Temporal and Regional Differences in Maternal Placental Blood Flow in Normal and Abnormal Early Pregnancies. *The American Journal of Pathology*, 162(1), 115–125. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63803-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63803-5)

105. Langmann, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., & Schmitz, G. (2003). Real-Time Reverse Transcription-PCR Expression Profiling of the Complete Human ATP-Binding Cassette Transporter Superfamily in Various Tissues. *Clinical Chemistry*, 49(2), 230–238. <https://doi.org/10.1373/49.2.230>

- 106.** Allaire, A. (2000). Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 96(2), 271–276. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(00\)00895-4](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)00895-4)
- 107.** Ishihara, N., Matsuo, H., Murakoshi, H., Laoag-Fernandez, J. B., Samoto, T., & Maruo, T. (2002). Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 186(1), 158–166. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.119176>
- 108.** Sattar N., Greer I.A., Galloway P.J., Packard C.J., Shepherd J., Kelly T., Mathers A. Lipid and lipoprotein concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84:128–130. doi: 10.1210/jc.84.1.128.
- 109.** Watson, A. L., Skepper, J. N., Jauniaux, E., & Burton, G. J. (1998). Susceptibility of Human Placental Syncytiotrophoblastic Mitochondria to Oxygen-Mediated Damage in Relation to Gestational Age¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(5), 1697–1705. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.5.4830>
- 110.** St-Pierre, M. V., Serrano, M. A., Macias, R. I. R., Dubs, U., Hoehli, M., Lauper, U., Meier, P. J., & Marin, J. J. G. (2000). Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(4), R1495–R1503. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.4.r1495>
- 111.** Freeman BA;Crapo JD. (2022). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(21). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7287745/>
- 112.** Moneypenny, C. G., & Gallagher, E. P. (2005). 4-Hydroxynonenal inhibits cell proliferation and alters differentiation pathways in human fetal liver hematopoietic stem cells. *Biochem. Pharmacol.*, 15588719. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15588719>
- 113.** Chen, J. J., Schenker, S., & Henderson, G. I. (1997). 4-hydroxynonenal levels are enhanced in fetal liver mitochondria by in utero ethanol exposure. *Hepatology*, 25(1), 142–147. <https://doi.org/10.1002/hep.510250126>

- 114.** Lin D.S., Pitkin R.M., Connor W.E. Placental transfer of cholesterol into the human fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1977;128:735–739. doi: 10.1016/0002-9378(77)90713-X.
- 115.** Imai. (2022). Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Research*, 65(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15695404/>
- 116.** Zhang, Y., Zhou, G., Wang, H., Zhang, X., Wei, F., Cai, Y., & Yin, D. (2006). Transcriptional Upregulation of Breast Cancer Resistance Protein by 17 β -Estradiol in ER α -Positive MCF-7 Breast Cancer Cells. *Oncology*, 71(5-6), 446–455. <https://doi.org/10.1159/000108594>
- 117.** Wang, H., Zhou, L., Gupta, A., Vethanayagam, R. R., Zhang, Y., Unadkat, J. D., & Mao, Q. (2006). Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17 β -estradiol in human placental BeWo cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(5), E798–E807. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00397.2005>
- 118.** Numazawa, M., Watari, Y., Komatsu, S., Yamashita, K., & Nagaoka, M. (2008). Aromatization of androstenedione and 16 α -hydroxyandrostenedione in human placental microsomes. *Steroids*, 73(12), 1262–1269. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.06.001>
- 119.** Evseenko, D. A., Paxton, J. W., & Keelan, J. A. (2007). Independent Regulation of Apical and Basolateral Drug Transporter Expression and Function in Placental Trophoblasts by Cytokines, Steroids, and Growth Factors. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(4), 595–601. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011478>
- 120.** García, B. M., Toneut, C. M., Balbeito, N. B., Arechavaleta, N. M., Arechavaleta, A. M., & Toneut, R. M. (2017). Trastornos hipertensivos durante el embarazo en gestantes del Policlínico Universitario "Santa Clara" (2015-2016). *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 43(2). Retrieved from <http://www.revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/207/166>
- 121.** Lyall, F., & Belfort, M. (Eds.). (2007). *Pre-eclampsia : Etiology and clinical practice*. Cambridge University Press.

- 122.** Gedeon, C., Behravan, J., Koren, G., & Piquette-Miller, M. (2006). Transport of glyburide by placental ABC transporters: implications in fetal drug exposure. *Placenta*, 16460798. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460798>
- 123.** U. Pecks, R. Caspers, B. Schiessl, D. Bauerschlag, D. Piroth, N. Maass, W. Rath The evaluation of the oxidative state of low-density lipoproteins in intrauterine growth restriction and preeclampsia *Hypertens. Pregnancy*, 31 (2012), pp. 156-165, 10.3109/10641955.2010.544805
- 124.** Pecks U, Brieger M, Schiessl B, Bauerschlag DO, Piroth D, Bruno B, et al. Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction. *J Perinat Med*. 2012;40:287–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22505508.
- 125.** Sattar N, Greer IA, Galloway PJ, Packard CJ, Shepherd J, Kelly T, et al. Lipid and lipoprotein concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:128–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9920072.
- 126.** Wadsack C, Tabano S, Maier A, Hiden U, Alvino G, Cozzi V, et al. Intrauterine growth restriction is associated with alterations in placental lipoprotein receptors and maternal lipoprotein composition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E476–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17003234.
- 127.** Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1199–1207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074>
- 128.** Chigusa, Y., Tatsumi, K., Kondoh, E., Fujita, K., Nishimura, F., Mogami, H., & Konishi, I. (2012). Decreased Lectin-Like Oxidized LDL Receptor 1 (LOX-1) and Low Nrf2 Activation in Placenta Are Involved in Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(10), E1862–E1870. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1268>

129. ZHANG, Z., WANG, Q., MA, J., YI, X., ZHU, Y., XI, X., FENG, Y., & JIN, Z. (2013). Reactive oxygen species regulate FSH-induced expression of vascular endothelial growth factor via Nrf2 and HIF1 α signaling in human epithelial ovarian cancer. *Oncology Reports*, 29(4), 1429–1434. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2278>