



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
SIMILAR A LA INSULINA TIPO I SOBRE
FACTORES ANGIOGÉNICOS EN CÉLULAS
ENDOTELIALES DE LA VENA DEL CORDÓN
UMBILICAL EN LA PREECLAMPSIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

L.N. ANDREA GUADALUPE OLMOS ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALI HALHALI BAGHDAD

COMITÉ TUTOR: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

- Se agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por los apoyos y orientaciones recibidos.
- Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para llevar a cabo mis estudios de maestría (beca con referencia 231018) y por apoyar el financiamiento del proyecto con número de referencia 105151.
- Expreso mis agradecimientos al tutor principal, Dr. Ali Halhali Baghdad, y a los miembros del Comité Tutor, Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval y Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, por su dirección, sus valiosas aportaciones y sus comentarios que me permitieron mejorar mi formación profesional y la calidad del trabajo.
- Se agradece al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y en particular al Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” y al Dr. Fernando Larrea Gallo, jefe de este Departamento, por brindarme todos los apoyos para llevar a cabo la parte experimental de mi tesis en sus instalaciones.
- Se agradece al Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala, Unidad Médica de Alta Especialidad del IMSS, y particularmente al Dr. Benjamín Biruete Correa por aceptar colaborar y apoyar nuestro proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Ali Halhali, mi tutor, ejemplo y amigo. Porque en estos dos años me ha enseñado que la mejora del trabajo diario debe ser un quehacer constante, pero más aún, que la mejora como ser humano es una exigencia indispensable en este recorrido de vida ¡Lo hicimos!

Al comité tutor, la Dra. Norma Bobadilla y el Dr. Armando Tovar, quienes me ayudaron en la mejora de este trabajo y promovieron mi deber de cuestionamiento y de investigación.

Al todo el personal del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, del cual recibí apoyo profesional y mucha amistad. En especial le agradezo sinceramente a Analilia, mi compañera y amiga en el laboratorio, por la ayuda, el cariño y las sonrisas recibidas. ¡Gracias amiga mía! Otro agradecimiento especial es para Lore y para David, investigadores ejemplares, quienes tuvieron confianza en mí y en lo que soy capaz de hacer ¡Prometo no defraudarlos! Gracias hoy y siempre.

A todos los cirujanos, enfermeras, pediatras y anestesiólogos del Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala del IMSS, con quienes me tocó compartir el quirófano y que facilitaron la toma de muestras.

A todas las madres que voluntariamente decidieron participar y donar el cordón umbilical, porque sólo gracias a su apoyo se pudo realizar este proyecto y en un futuro estos hallazgos podrían ayudar a otras mujeres con preeclampsia. A ustedes, madres y dadoras de vida, infinitas gracias.

A mi madre, Esperanza Ortiz Mayagoitia, quien es mi mayor ejemplo a seguir. Por su cariño, por su lucha, por su eterna confianza, por su inmenso amor y paciencia, por todas las palabras de apoyo, por los abrazos de consuelo y de esperanza y sobre todo por su constante aliento a seguir adelante. Te amo mucho mami. Hoy y siempre, gracias.

A mi padre, Miguel Olmos, quien es un ejemplo de disciplina y constancia. Por el recuerdo de los momentos compartidos, de las risas y los reproches, de los abrazos y de la voz alentadora hasta el último momento, hasta el último respiro... Gracias papá, te quiero.

A mi familia: mis tíos Armando y Fausto, mis tías Mirna y Bessie, mi hermana Bessie, mis primas Yanella, Sofía y Tania, mi hermana Gisela y mis sobrinos. Por las vivencias, por las risas, por los momentos que siempre quedarán grabados en la memoria, por los juegos y las películas, por los viajes y las experiencias. Por todo lo que hemos compartido y que me hace sentir orgullosa de pertenecer a esta familia ¡Un abrazo a todos!

A Efrén, quien me ayudó a recuperar mi esencia y a conseguir las metas propuestas. Por todo el consuelo y el innegable apoyo, por la sonrisa y el corazón que siempre estuvieron cuando los necesité, por todo lo que hemos vivido y que engrandece esta relación. Te quiero Efrén y agradezco por haber encontrado a un chico como tú, porque aquello que creía imposible se volvió lo mejor de mi vida...

A mis amigas: las de ayer, las de hoy y las de siempre. Porque sé que la amistad es un tesoro invaluable, porque soy muy dichosa al tener amigas sinceras a quienes recordar. Porque con sólo una foto, con un recuerdo fugaz, soy capaz de revivir nuestras locuras, nuestros amores, las lágrimas en confidencia, las fantasías, los secretos y los sueños por alcanzar. Para mis mejores amigas, las entrañables, ¡las de siempre!: Susy, Diana, Carmen, Rebeca, Arlette, Selenita y Xóchitl. ¡Y arriba la cumpleañera!

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. La preeclampsia	10
1.1.1. <i>Características clínicas de la preeclampsia</i>	10
1.1.2. <i>Etiología de la preeclampsia</i>	10
1.2. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	11
1.2.1. <i>Angiogénesis</i>	11
1.2.2. <i>Isoformas del VEGF</i>	12
1.2.3. <i>Receptores del VEGF</i>	13
1.2.4. <i>VEGF, sFlt-1 y la preeclampsia</i>	14
1.2.5. <i>Regulación de la síntesis del VEGF</i>	15
1.3. El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)	16
1.3.1. <i>Características del IGF-I</i>	16
1.3.2. <i>Regulación de la síntesis del IGF-I</i>	16
1.3.3. <i>Efectos mediados por el receptor del IGF-I (IGF-IR)</i>	17
1.3.4. <i>IGF-I, angiogénesis y preeclampsia</i>	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Reactivos	22
4.2. Muestras biológicas	23
4.2.1. <i>Cultivo de células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC)</i>	24
4.2.2. <i>Suero del cordón umbilical</i>	24
4.3. Determinación de la pureza de las células endoteliales por citometría de flujo mediante la presencia de VE-caderina	24
4.4. Tratamiento de las HUVEC con el IGF-I	25
4.5. Cotiledones placentarios	25
4.6. Estudios de expresión génica	25
4.7. Concentración de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en el suero del cordón umbilical y/o en el medio de cultivo	28
4.8. Cuantificación de proteínas	30
4.9. Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Efecto del IGF-I sobre la expresión génica y la concentración de las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC)	31
5.1.1. <i>Características morfológicas y pureza de las células HUVEC</i> ...	31
5.1.2. <i>Efecto del IGF-I sobre la expresión de VEGF y sFlt-1</i>	32

5.1.3. Efecto del IGF-I sobre la concentración de las proteínas de VEGF y de sFlt-1	34
5.1.4. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en presencia de un inhibidor de la actividad del receptor de IGF-I	36
5.2. Expresión de VEGF y sFlt-1 en homogenados placentarios de los grupos de mujeres normotensas (NT) y preeclámpticas (PE)	37
5.3. Concentración de factores angiogénicos en el suero del cordón umbilical	39
5.3.1. Características clínicas de los grupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos	39
5.3.2. Concentración en el suero del cordón umbilical de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en los grupos de mujeres NT y PE	40
5.3.3. Estudios de asociación entre el peso de los recién nacidos (RN) y factores angiogénicos con la edad gestacional en los grupos de mujeres NT y PE	42
5.3.4. Estudios de asociación del peso de los recién nacidos (RN) con el IGF-I, el VEGF y el sFlt-1 en los grupos de mujeres NT y PE	45
5.3.5. Estudios de asociación entre factores angiogénicos en los grupos de mujeres NT y PE	48
5.3.6. Características clínicas de los subgrupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos pareados por edad gestacional (≥ 36 y ≤ 39 semanas)	50
5.3.7. Concentración en el suero del cordón umbilical de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional (≥ 36 y ≤ 39 semanas)	50
6. DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIONES	58
8. BIBLIOGRAFÍA	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de amplificación de cDNA por qPCR	27
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores y sondas de hidrólisis utilizadas para cada gen	28
Tabla 3. Características clínicas de los grupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos	39
Tabla 4. Correlación de Spearman del peso de los RN y de los factores angiogénicos con la edad gestacional (EG) en los grupos de mujeres NT y PE	42
Tabla 5. Correlación de Spearman entre el peso del RN y factores angiogénicos de los grupos de mujeres NT y PE	45
Tabla 6. Correlación de de Spearman entre factores angiogénicos en los grupos de mujeres NT y PE	48
Tabla 7. Características clínicas de los subgrupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos pareados por edad gestacional (≥ 36 y ≤ 39 semanas)	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases I (preclínica) y II (clínica) del desarrollo de la preeclampsia..	11
Figura 2. Interacción del VEGF con sus receptores	13
Figura 3. Las dos vías de transducción de señales mediadas por el IGF-IR ..	18
Figura 4. Aspecto típico de un cultivo de células HUVEC a las 72 horas de siembra	31
Figura 5. Fluorescencia obtenida por citometría de flujo en células endoteliales incubadas con el anticuerpo para VE-caderina y en células control	32
Figura 6. Efecto del IGF-I sobre la expresión de VEGF en células HUVEC del grupo de mujeres NT	33
Figura 7. Efecto del IGF-I sobre la expresión de sFlt-1 en células HUVEC del grupo de mujeres NT	33
Figura 8. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT	34
Figura 9. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres PE	35
Figura 10. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC de los grupos de mujeres NT y PE	35
Figura 11. Efecto del PPP sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT	36
Figura 12. Expresión de VEGF en homogenados placentarios de los grupos de mujeres NT y PE	37
Figura 13. Expresión de sFlt-1 en homogenados placentarios de los grupos de mujeres NT y PE	38
Figura 14. Concentración de IGF-I en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE	40
Figura 15. Concentración de VEGF en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE	40
Figura 16. Concentración de sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE.....	41

Figura 17. Tasa de concentración de VEGF/sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE	41
Figura 18. Correlación de Spearman del peso de los RN con la edad gestacional en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE	42
Figura 19. Correlación de Spearman del peso de los RN con la edad gestacional en el grupo de mujeres PE	43
Figura 20. Correlación de Spearman del IGF-I con la edad gestacional en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE	43
Figura 21. Correlación de Spearman del IGF-I con la edad gestacional en el grupo de mujeres PE	44
Figura 22. Correlación de Spearman del sFlt-1 con la edad gestacional en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE	45
Figura 23. Correlación de Spearman del peso de los RN con el IGF-I en el grupo de mujeres NT	46
Figura 24. Correlación de Spearman del peso de los RN con el IGF-I en el grupo de mujeres PE	46
Figura 25. Correlación de Spearman del peso de los RN con el IGF-I en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE	47
Figura 26. Correlación de Spearman del peso de los RN con el sFlt-1 en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE	47
Figura 27. Correlación de Spearman del sFlt-1 con el IGF-I en el grupo de mujeres NT	48
Figura 28. Correlación de Spearman del sFlt-1 con el VEGF en el grupo de mujeres PE	49
Figura 29. Concentración de IGF-I en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional	51
Figura 30. Concentración de VEGF en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional	51
Figura 31. Concentración de sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional	51
Figura 32. Tasa de concentración de VEGF/sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional	52

RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una de las enfermedades hipertensivas inducida por el embarazo y se diagnostica por la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria después de la semana 20 de gestación. Una de las alteraciones que se asocia con este padecimiento es un deficiente proceso de angiogénesis. Debido a que en nuestro y en otros laboratorios se demostró que la concentración del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) está baja en la PE y que su participación en procesos angiogénicos no ha sido valorada en este padecimiento, el objetivo principal del presente estudio fue: evaluar los efectos reguladores del IGF-I sobre la expresión de los RNAm y las proteínas del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de la forma soluble de su receptor tipo 1 (sFlt-1) en células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC) y valorar la asociación de la concentración de IGF-I con la del VEGF en el suero del cordón umbilical en la preeclampsia. Además del grupo de mujeres preeclámplicas (PE), se contó con un grupo testigo conformado por cordones umbilicales obtenidos de mujeres embarazadas normotensas (grupo NT). El efecto del IGF-I sobre la expresión de los RNAm y de las proteínas de VEGF y sFlt-1 se realizó en cultivos primarios de células HUVEC. En el estudio de expresión génica, se encontró que la expresión de VEGF fue significativamente mayor en presencia de 12.5, 25 y 100 ng/mL de IGF-I y la expresión de sFlt-1 fue significativamente mayor en presencia de 6.25, 12.5, 25 y 100 ng/mL de IGF-I. En cuanto a la concentración de VEGF en el medio de cultivo de las células endoteliales, su presencia no fue detectada en ninguno de los grupos por los estuches de marca R & D Systems utilizados. En el grupo de mujeres NT, la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo fue significativamente mayor en presencia de 12.5 y 25 ng/mL de IGF-I. A pesar de que no se observó el efecto estimulador de IGF-I en el grupo de mujeres PE, la concentración basal de sFlt-1 fue significativamente mayor que en el grupo NT. En el grupo de mujeres NT, el efecto estimulador de 12.5 ng/mL de IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 fue significativamente abolido en presencia de PPP, inhibidor de la actividad del receptor de IGF-I. Al utilizar homogenados de placentas, la expresión del mensajero del VEGF fue significativamente más baja en el grupo de mujeres PE que en el grupo de mujeres NT. En cambio, la expresión del mensajero del sFlt-1 fue significativamente mayor en los homogenados placentarios del grupo de mujeres PE que en los del grupo de mujeres NT. En el estudio donde se evaluó la concentración de factores angiogénicos en el suero del cordón umbilical, se incluyeron 27 muestras obtenidas de mujeres NT y 14 muestras de mujeres PE. El peso de los recién nacidos y la edad gestacional del grupo de mujeres PE fueron significativamente menores que los del grupo de mujeres NT. La concentración de IGF-I fue significativamente menor en el grupo de mujeres PE que en el grupo de mujeres NT. Además, la concentración de VEGF fue significativamente más baja con respecto a la del grupo de mujeres NT. En cambio, la concentración de sFlt-1 fue significativamente mayor en el grupo de pacientes PE al compararla con la del grupo de mujeres NT. En cuestión de las asociaciones del IGF-I con la edad gestacional,

se observó una asociación significativa en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE y en el grupo de mujeres PE. Además, el IGF-I se asoció de manera positiva y significativa con el peso de los recién nacidos en los grupos NT, PE y en el conjunto de los dos grupos. Por lo que toca a factores angiogénicos, el IGF-I no se asoció significativamente con el VEGF en ninguno de los grupos. Sin embargo, el IGF-I se asoció significativamente con el sFlt-1 solamente en el grupo de mujeres NT y la asociación entre VEGF y sFlt-1 logró significancia únicamente en el grupo PE. Con el fin de descartar a la edad gestacional como responsable de las diferencias observadas entre ambos grupos, se utilizaron dos subgrupos de mujeres NT y PE con un promedio similar de edad gestacional. De igual manera que con el peso al nacer, las concentraciones de IGF-I, VEGF y sFlt-1 fueron significativamente diferentes entre ambos subgrupos. La concentración de IGF-I y de VEGF fue significativamente más baja en el subgrupo de mujeres PE que el subgrupo de mujeres NT. En cambio, la concentración de sFlt-1 fue significativamente mayor en el subgrupo de mujeres PE que en el subgrupo de mujeres NT. En conclusión: 1) Se demostró que el IGF-I es un factor estimulador de la expresión del RNAm no sólo del VEGF sino también del sFlt-1 en células HUVEC; 2) La presencia de IGF-I resultó en mayor concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT; 3) La concentración basal de sFlt-1 en los medios de cultivo fue significativamente mayor en la preeclampsia; 4) La preeclampsia se asoció con menor expresión de VEGF y mayor expresión de sFlt-1 en homogenados de placenta; 5) La PE se caracterizó por presentar baja concentración de IGF-I y de VEGF y alta concentración de sFlt-1 en el suero del cordón umbilical y estas diferencias fueron independientes de la edad gestacional y; 6) El IGF-I no se asoció significativamente con el VEGF en ninguno de los grupos, lo que sugiere que la baja concentración de VEGF no es atribuible a la disminución de la concentración del IGF-I en el suero del cordón umbilical.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is one of the pregnancy-induced hypertension diseases which is characterized by the simultaneous presence of hypertension and proteinuria after the 20th week of gestation. Deficit of the angiogenesis process is associated with PE. Since data from our and other laboratories have shown low circulating levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) in PE and its participation in angiogenesis process has not been established in this disease, the aim of the present work was: to study the regulatory effects of IGF-I upon mRNAs expression and proteins of VEGF and sFlt-1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and to determine the association between IGF-I and VEGF in umbilical cord serum in PE. In addition to the PE group, this work included normotensive pregnant women (NT group) as a control group. IGF-I effects upon mRNAs expression and proteins of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble form of its receptor 1 (sFlt-1) were done in primary HUVEC cell cultures. Regarding gene expression, VEGF and sFlt-1 expressions were significantly higher in presence of IGF-I as compared with vehicle. VEGF concentration in media culture was not detectable with the kit used in the presence or absence of IGF-I. In the NT group, sFlt-1 concentration was significantly higher when cells were incubated with IGF-I as compared with vehicle. The stimulatory effect of IGF-I upon sFlt-1 concentration was not observed in cells obtained from the PE group. The absence of this effect may be due to high synthesis of sFlt-1 in preeclampsia since basal concentration of this anti-angiogenic factor was significantly higher in the PE group than in the NT group. In the NT group, the stimulatory effect of IGF-I upon sFlt-1 concentration was significantly lower in the presence of PPP, an inhibitor of IGF-I receptor activity. Using placenta homogenates, VEGF mRNA expression was significantly lower in the PE group than in the NT group. In contrast, sFlt-1 mRNA expression was significantly higher in the PE group than in the NT. For the serum concentration study, umbilical cord sera were obtained from 27 NT and 14 PE women. Newborn birth weight and gestational age of the PE group were significantly decreased as compared with the NT group. IGF-I concentration was significantly lower in the PE group than in the NT group. Furthermore, VEGF concentration was significantly decreased in the PE group as compared with the NT group. In contrast, sFlt-1 concentration was significantly higher in the PE group than in the NT group. Study association showed that IGF-I correlated significantly with gestational age when PE and NT groups were analyzed together and in the PE group. In addition, IGF-I was significantly associated with newborn birth weight in the NT, PE and in the NT plus PE groups. Regarding angiogenic factors, IGF-I was not associated with VEGF in any group. However, IGF-I was significantly associated with sFlt-1 only in the NT group and associations between VEGF and sFlt-1 were observed only in the PE group. In order to discard gestational age as determinant factor responsible of the differences observed between the NT and PE groups, subgroups of similar gestational age were conformed and analyzed. As observed with newborn birth weight, serum concentrations of IGF-I, VEGF and sFlt-1 were significantly different between the NT and PE subgroups. IGF-I and

VEGF concentrations were significantly lower in the PE subgroup than in the NT subgroup. In contrast, sFlt-1 concentration was significantly higher in the PE subgroup as compared with the NT subgroup. In conclusion: 1) IGF-I is a stimulatory factor of VEGF and sFlt-1 expressions in HUVEC; 2) The presence of IGF-I in HUVEC resulted in higher sFlt-1 concentration; 3) Basal concentrations of sFlt-1 in HUVEC media culture were significantly higher in preeclampsia; 4) Preeclampsia was associated with low VEGF mRNA and high sFlt-1 mRNA expressions in placenta homogenates; 5) Preeclampsia was associated with low levels of IGF-I and VEGF and high concentration of sFlt-1 in serum umbilical cord, and these differences were independent of gestational age, and; 6) Circulating IGF-I was not associated with VEGF in any group, which suggest that low VEGF concentration did not result from decreased IGF-I concentration in serum umbilical cord.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La preeclampsia

1.1.1. Características clínicas de la preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una de las enfermedades hipertensivas inducidas por el embarazo y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y fetal en México y en el mundo^{1,2}. La PE se diagnostica por la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria después de la semana 20 de gestación^{3,4}. Las complicaciones derivadas de la PE son la eclampsia, forma convulsiva de esta enfermedad, y el síndrome de HELLP que se caracteriza por hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas alanina transaminasa y aspartato transaminasa y disminución en la cuenta plaquetaria.

1.1.2. Etiología de la preeclampsia

La etiología de la preeclampsia es desconocida pero se conoce la existencia de factores que favorecen su desarrollo. Entre los factores conocidos se encuentran: 1) factores genéticos como polimorfismos en el gen de VEGF y en los de las sintasas de óxido nítrico; 2) factores ambientales como el ejercicio excesivo y el bajo consumo de calcio y antioxidantes en la dieta y; 3) factores inmunológicos como el incremento en las citocinas pro-inflamatorias⁵.

El desarrollo de la PE ocurre en dos grandes fases: la primera es la fase preclínica o asintomática y la segunda es la fase clínica (figura 1). Se ha sugerido que la fase preclínica ocurre entre las 8 y las 20 semanas de gestación debido a un pobre desarrollo de la placenta, originado por fallas en el proceso de placentación, lo que origina el reducido flujo útero-placentario, el estado de hipoxia placentaria, aumento del estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria materna⁶. Después de la semana 20, en la fase clínica se manifiestan los estados de hipertensión y proteinuria y posiblemente algunos síntomas como edema, cefalea o visión borrosa; estos hallazgos indican el cuadro diagnóstico de la preeclampsia y este padecimiento puede evolucionar hacia dos complicaciones, la eclampsia o un síndrome con hemólisis, elevada concentración de enzimas hepáticas y plaquetopenia (síndrome de HELLP, del inglés *haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets*). Además, la PE se asocia con el bajo peso al nacer de los recién nacidos debido al reducido flujo útero-placentario.

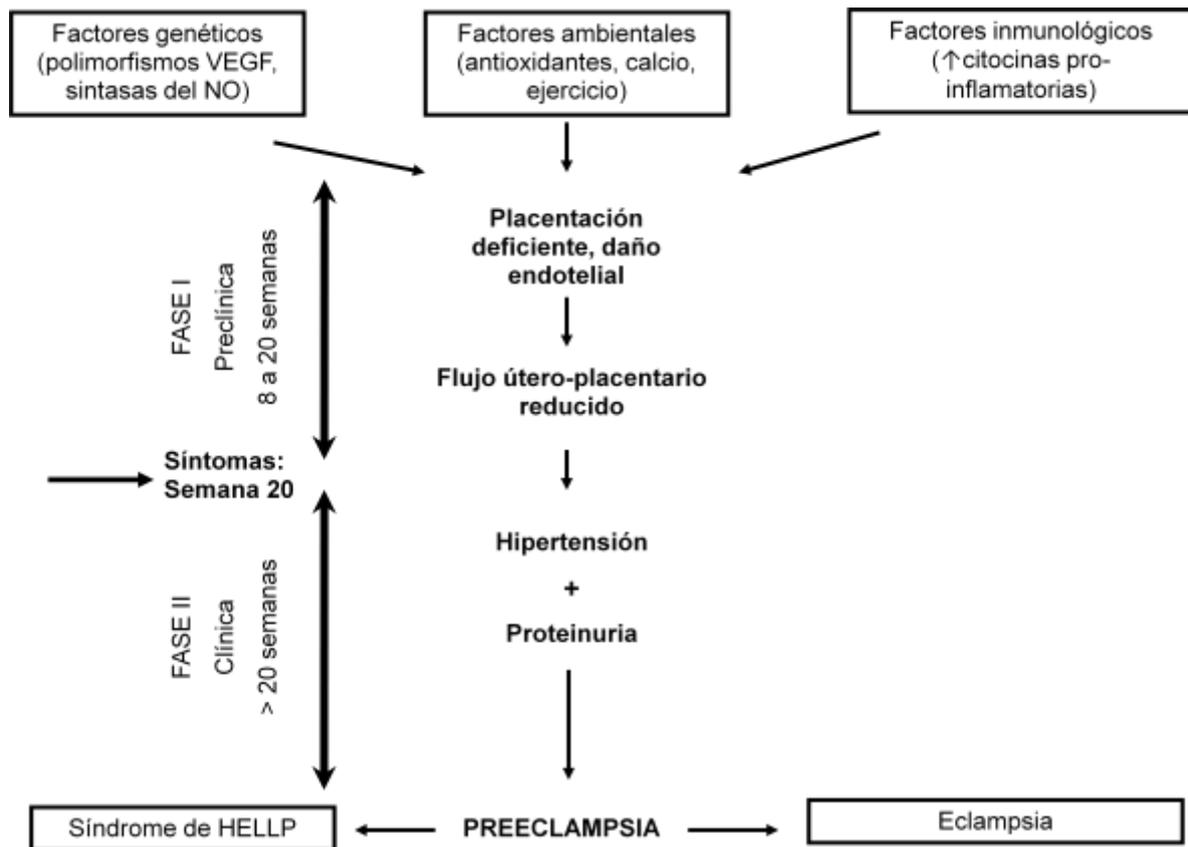


Figura 1. Fases I (preclínica) y II (clínica) del desarrollo de la preeclampsia. Esquema modificado de Serrano y colaboradores, 2006.⁵

Otra de las alteraciones que se observa durante el desarrollo de la PE es el deficiente proceso angiogénico, el cual puede presentarse desde la primera fase de esta enfermedad. En este proceso participan principalmente el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores, por lo que a continuación se aportará mayor información tanto básica como relacionada con la preeclampsia acerca de estos factores angiogénicos.

1.2. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

1.2.1. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se realiza el crecimiento y el remodelamiento del árbol vascular como resultado de la proliferación y migración de las células endoteliales a partir de los vasos sanguíneos preexistentes. Este proceso es esencial para la organogénesis y el satisfactorio desarrollo embrionario y fetal. Además, en el adulto la angiogénesis regula la función del ovario y el endometrio durante el ciclo menstrual, el crecimiento y la reparación de tejidos durante la

sanación de heridas y el desarrollo de la placenta y de la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia⁷. La regulación de este proceso es sumamente compleja e involucra interrelaciones entre distintos tipos celulares y la matriz extracelular, señalizaciones inducidas por hormonas y citocinas y el balance entre factores pro- y anti- angiogénicos^{7,8}. Entre estos factores, se conoce que el VEGF es el principal inductor de la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*⁹.

1.2.2. Isoformas del VEGF

El gen que codifica para el VEGF pertenece a la súper familia de genes del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF/VEGF) y tiene 7 integrantes: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y el factor de crecimiento placentario (PLGF). Todos cuentan con un dominio conservado de 8 residuos de cisteína que es el dominio de unión con sus receptores.

De ellos, el VEGF-A (o VEGF como se le denominará de aquí en adelante), es el principal inductor del proceso angiogénico. Este factor es una glicoproteína mitogénica específica para las células endoteliales de las micro- y macro-vasculaturas, e induce en éstas su proliferación, migración y supervivencia.

El gen del VEGF humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y se organiza en 8 exones y 7 intrones que abarcan 14 pares de kilobases aproximadamente. Por empalme alternativo de los exones 6 y 7 se pueden generar 6 isoformas diferentes, todas con actividad pro-angiogénica: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. Entre ellas, la isoforma con 165 aminoácidos, el VEGF₁₆₅, es el subtipo dominante en términos de su concentración, distribución y actividad biológica. Es el principal mitógeno e inductor de la migración de las células endoteliales y el estimulador más potente de la angiogénesis ($ED_{50} = 2$ a 10 pM). Esta isoforma se sintetiza como monómero y posteriormente se secreta hacia el espacio intersticial en donde forma un homodímero de 46 KDa unido de forma covalente por dos puentes disulfuro⁹.

1.2.3. Receptores del VEGF

El efecto angiogénico del VEGF es mediado por la unión de este ligando con sus 2 receptores tipo tirosina cinasa, el VEGF-R1 y el VEGF-R2 (figura 2). Ambos receptores tienen 7 regiones similares a inmunoglobulina en su dominio extracelular, una única región trans-membranal y una secuencia consenso intracelular con actividad tirosina cinasa. El dominio de unión con VEGF se localiza entre la segunda y tercera región similar a inmunoglobulina, y la cuarta región es esencial para la dimerización de los receptores⁹.

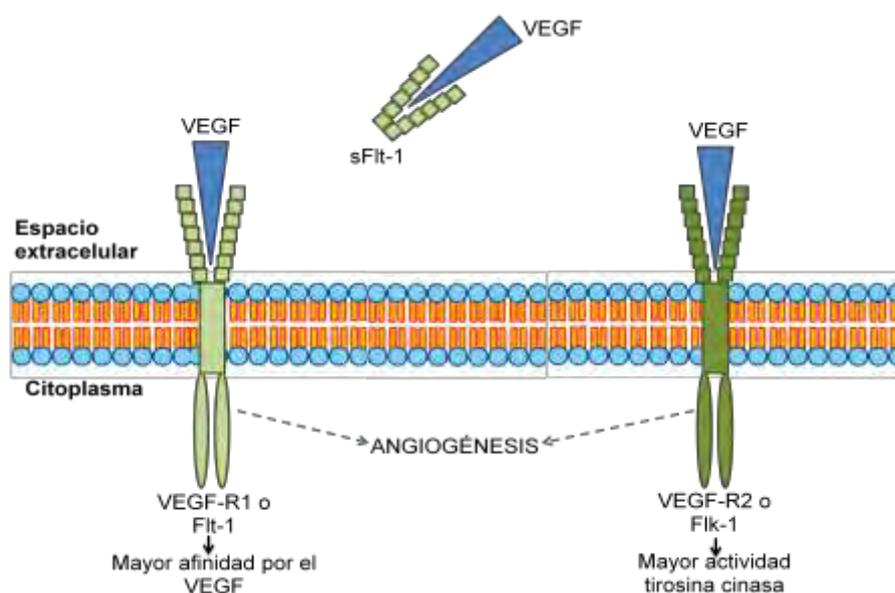


Figura 2. Interacción del VEGF con sus receptores. Figura modificada de Ferrara, 2004.⁹

El VEGF-R1 o Flt-1 por sus siglas en inglés, *fms-like tyrosine kinase-1*, posee gran afinidad por el VEGF ($K_d = 2$ a 10 pM). Sin embargo su actividad tirosina cinasa es débil, cerca de diez veces menor que la del VEGF-R2, por lo que este receptor participa en menor medida en el estímulo de la proliferación endotelial¹⁰. Mediante proceso de empalme alternativo se produce la forma soluble del VEGF-R1, conocida como sFlt-1, la cual tiene 690 aminoácidos y carece de la séptima región similar a inmunoglobulina, de la secuencia trans-membranal y del dominio intracelular.

Como se mencionó anteriormente, el VEGF-R2 es el principal mediador de la respuesta angiogénica. EL VEGF-R2 es conocido como Flk-1 por sus siglas en inglés, *fetal liver kinase-1*. No obstante la menor afinidad del VEGF-R2, su potente actividad tirosina cinasa hace de este receptor el mayor mediador del proceso angiogénico del VEGF¹⁰.

1.2.4. VEGF, sFlt-1 y la preeclampsia

La concentración de VEGF está disminuida en la mayoría de los sueros de mujeres con PE¹¹⁻¹⁵, lo cual coincide con la disfunción endotelial y el deficiente proceso angiogénico que se ha observado en esta enfermedad^{11,16}. En efecto, Ahmad y Ahmed demostraron que la placenta de mujeres con PE produce algún factor que lesiona y disminuye la función del endotelio materno. Esto se demostró con el cultivo de explantes de vellosidades placentarias obtenidas de mujeres con PE y la posterior incubación de células endoteliales con el medio de cultivo de los explantes. Como resultado, se disminuyó de forma significativa la migración endotelial y la longitud de los túbulos formados por estas células, lo que sugiere la presencia de por lo menos una sustancia responsable de la disfunción endotelial en este padecimiento¹⁶.

Una de estas sustancias involucradas en el desarrollo de la disfunción endotelial es la forma soluble del receptor tipo 1 del VEGF (sFlt-1)^{11,16}. El sFlt-1 se secreta de manera fisiológica durante la gestación por los sincitiotrofoblastos hacia la circulación materna¹⁷. El sFlt-1 disminuye la biodisponibilidad de VEGF ya que se une a este factor de crecimiento e impide su interacción con los receptores VEGF-R1 y VEGF-R2, particularmente con el VEGF-R2, a través del cual el VEGF ejerce su mayor efecto angiogénico¹⁰.

Aunque en la práctica clínica no es usual la medición de la concentración de sFlt-1 en el suero materno, se conoce que su concentración permanece relativamente baja durante los primeros dos trimestres del embarazo y se incrementa hacia finales del tercer trimestre¹². Esto puede ser un reflejo del cambio en el medio ambiente placentario hacia el final del embarazo, en que se ha completado el proceso angiogénico placentario y fetal. Sin embargo, en la preeclampsia existe una exacerbada expresión placentaria de sFlt-1 desde etapas tempranas del embarazo, lo que se asocia con un marcado incremento de su concentración en la circulación materna^{11-13,18-27}. Cinco semanas antes de la aparición de los signos clínicos de la enfermedad se observa un incremento en la concentración de sFlt-1¹². Además, el incremento en su concentración se correlaciona con la severidad de la PE²⁸. Pocos días después del término del embarazo se normalizan las concentraciones de sFlt-1, lo cual coincide con la

expulsión de la placenta y con la disminución en las cifras de presión arterial y de proteinuria.

En modelos animales de PE en ratas y primates, con base en la reducción de la perfusión sanguínea uterina, se observó el incremento de la concentración sanguínea y placentaria de sFlt-1 y el desarrollo de hipertensión y proteinuria^{29,30}. Interesantemente, la sobreexpresión del gen de sFlt-1 en ratas gestantes resultó no solamente en mayor concentración circulante de sFlt-1 sino también en la aparición de un síndrome parecido a la PE, con los signos de hipertensión, proteinuria, endoteliosis glomerular y restricción del crecimiento fetal^{11,31}.

Otra evidencia experimental que relaciona la baja biodisponibilidad de VEGF con disfunción endotelial deriva del desarrollo de hipertensión, proteinuria y pérdida de las fenestraciones endoteliales del glomérulo renal en pacientes con cáncer que han sido tratados con anticuerpos contra VEGF como medida anti-angiogénica^{32,33}.

En conjunto, estas evidencias sugieren que la deficiencia de VEGF, inducida por el exceso de sFlt-1 en el caso de la preeclampsia, es uno de los factores que están implicados en la disfunción endotelial y el desarrollo de la hipertensión y la proteinuria que caracterizan a esta enfermedad.

1.2.5. Regulación de la síntesis del VEGF

En condiciones fisiológicas, el estímulo de la síntesis del VEGF, y por tanto de la angiogénesis, se induce por hipoxia, citocinas y factores de crecimiento que incluyen al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y al factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)³⁴. A continuación se aporta información acerca del IGF-I antes de abordar su relación con factores angiogénicos y con la preeclampsia.

1.3. El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)

1.3.1. Características del IGF-I

El IGF-I es una hormona de naturaleza proteica que estimula la progresión del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación celular e inhibe la apoptosis. También estimula los procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y de los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico (DNA y RNA) e inhibe la proteólisis³⁵. El IGF-I presenta efectos biológicos similares en los de la insulina. Se trata de un polipéptido de una sola cadena, con 70 aminoácidos, entrecruzado por tres puentes disulfuro y con un peso de 7649 Da; y guarda una homología del 48% con la proinsulina humana³⁶.

El gen del IGF-I humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q23.2) y está constituido por 6 exones y 5 intrones. Del empalme alternativo de este gen se puede obtener 4 transcritos diferentes debido a la existencia de dos sitios de inicio de la transcripción, ubicados en los exones 1 y 2, y de dos dominios carboxilo terminal (variantes Ea y Eb).

1.3.2. Regulación de la síntesis del IGF-I

Las acciones derivadas del IGF-I son controladas por factores que regulan su síntesis y por la interacción de este ligando con sus proteínas de transporte (IGFBPs) y con su receptor (IGF-IR). La síntesis de IGF-I se rige bajo el control de la hormona de crecimiento (GH) y de factores nutricios como las proteínas y el zinc³⁷. La GH estimula la síntesis hepática y muscular del IGF-I, aunque prácticamente todos los órganos son capaces de sintetizarlo. Sin embargo, durante el embarazo la síntesis de IGF-I no es regulada por la GH sintetizada en la hipófisis, sino por una variante de la GH que se sintetiza en la placenta³⁸, principal hormona que se asocia con el incremento en la concentración de IGF-I en el embarazo.

1.3.3. Efectos mediados por el receptor del IGF-I (IGF-IR)

El IGF-I es el principal estimulador de la ganancia de peso y talla durante la vida intrauterina. Las evidencias experimentales de esta afirmación se centran en modelos *knock out* IGF-I^(-/-) o IGF-IR^(-/-) de ratón, los cuales mueren durante la vida embrionaria y aquellos que logran sobrevivir son infértiles y muestran una baja tasa de crecimiento ponderal (sólo adquieren el 30% del peso de un ratón sano)³⁹. Además, los fetos con mutaciones que inactivan al IGF-I, un síndrome recesivo de baja frecuencia, se caracterizan por un marcado déficit del crecimiento intrauterino y por un retraso en el crecimiento post- natal⁴⁰. Igualmente, los polimorfismos en el gen del IGF-I humano que originan baja concentración de IGF-I en el suero, se asocian con bajo peso, talla y perímetro cefálico al nacer además de persistente baja estatura y perímetro cefálico durante la vida postnatal⁴¹.

Los efectos anabólicos inducidos por el IGF-I son mediados por su unión con su receptor, el IGF-IR, que muestra 60% de homología en la secuencia de aminoácidos con el receptor de insulina. El IGF-IR es un tetrámero integrado por dos subunidades α y dos subunidades β con varios puentes α - α y α - β . Las subunidades α se localizan completamente en el dominio extracelular y contienen el sitio de unión al IGF-I, mientras que las subunidades β cruzan la membrana y su dominio intracelular posee actividad tirosina cinasa³⁵.

La unión del IGF-I con el IGF-IR induce la autofosforilación cruzada de los residuos de tirosina, lo que puede desencadenar por lo menos dos tipos de señales intracelulares (figura 3). La unión de las tirosinas fosforiladas con los sustratos del receptor de insulina (IRS-1, -2, -3 ó -4) permiten activar la vía del fosfatidil inositol trifosfato y de la cinasa Akt. Mediante esta vía se llevan a cabo procesos principalmente metabólicos, como el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno y de proteínas. Por otra parte, los residuos de tirosinas fosforiladas también son capaces de unirse a proteínas con dominio SH2 (de homología 2 con Src) para desencadenar la cascada de las MAP cinasas, responsable de llevar a cabo procesos mitogénicos ligados al incremento en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular y a la inhibición de la apoptosis.

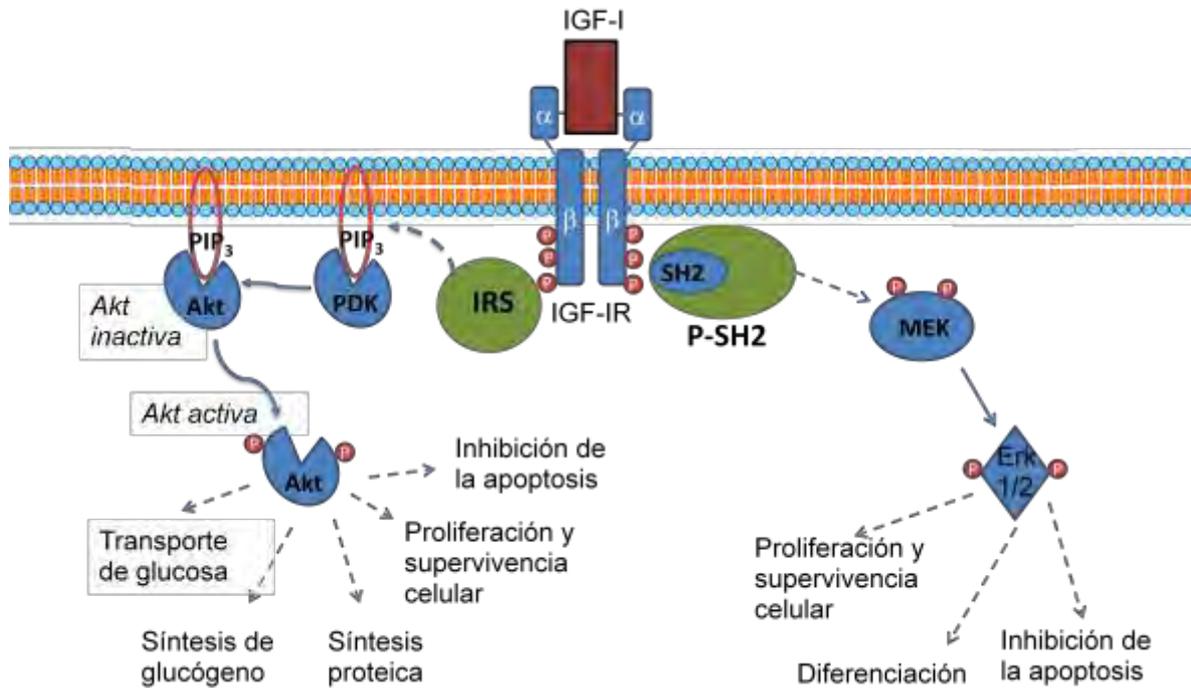


Figura 3. Las dos vías de transducción de señales mediadas por el IGF-IR. Figura modificada de Dupont y colaboradores, 2003.⁴² Akt = Proteína serina/treonina cinasa; Erk = Cinasa regulada por señales extracelulares; MEK = MAP cinasa/Erk cinasa; PDK = Proteína cinasa; PIP₃ = Fosfatidil inositol trifosfato; P-SH2 = Proteína con dominio SH2; SH2 = Dominio de homología 2 con Src.

1.3.4. IGF-I, angiogénesis y preeclampsia

El IGF-I estimula la expresión y secreción de VEGF en cultivos primarios de células mesangiales de la corteza renal, de células endometriales porcinas, de células derivadas del amnios y de células endoteliales de la vena umbilical humana⁴³⁻⁴⁶ y en líneas celulares tumorales de cáncer de colon, de mama y en células de adenocarcinoma endometrial y prostático⁴⁷⁻⁵⁰. En un modelo de lesión de la piel de la rata, la inyección semanal subcutánea de liposomas que contenían el cDNA de IGF-I resultó en el aumento del número de vasos y en el estímulo de la expresión de VEGF en el sitio de la herida⁵¹.

La participación del IGF-I en la regulación a la alta del VEGF se demostró con el uso de picropodofilina (PPP), potente inhibidor del IGF-I que impide la fosforilación de su receptor IGF-IR. Las células del epitelio pigmentado de la retina cultivadas con IGF-I y el PPP tuvieron una concentración en el medio de cultivo de VEGF cercana a la de las células control, con lo que se demostró que el IGF-IR participa en el estímulo de la secreción de VEGF por IGF-I⁵².

En nuestro y en otros laboratorios, se ha observado que la PE se asocia con restricción del crecimiento intrauterino⁵³⁻⁵⁵, y esta restricción se ha asociado con una baja concentración de IGF-I en el suero materno y del cordón umbilical de mujeres con PE⁵⁴⁻⁶⁰. Interesantemente, la concentración de IGF-I no fue solamente baja en las mujeres con PE que tuvieron hijos con un peso bajo para la edad gestacional, sino también en aquellas mujeres con hijos de adecuado peso para la edad gestacional. Esto sugiere que el IGF-I podría tener alguna participación en el proceso de la enfermedad, además de la regulación del peso de los infantes.

La falta de información acerca de los efectos reguladores del IGF-I sobre la expresión de los RNA mensajeros (RNAm) y de las proteínas de VEGF y sFlt-1 en la preeclampsia y de estudios de asociación entre el IGF-I con el VEGF en el suero del cordón umbilical justificó la realización del presente trabajo que plantea la siguiente hipótesis.

2. HIPÓTESIS

El IGF-I presenta efectos reguladores sobre la expresión de los RNAm y de las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células HUVEC y se asocia con la concentración de VEGF en el suero del cordón umbilical en la preeclampsia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar los efectos reguladores del IGF-I sobre la expresión de los RNAm y las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células HUVEC y valorar la asociación entre las concentraciones de IGF-I con las de VEGF en el suero del cordón umbilical en la preeclampsia.

3.2. Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto del IGF-I sobre la expresión de los RNAm y las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células HUVEC.
2. Valorar la expresión génica de VEGF y de sFlt-1 en homogenados de placentas de mujeres embarazadas normotensas (NT) y preeclámpicas (PE).
3. Valorar la concentración de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de mujeres embarazadas NT y PE.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Para la realización de este estudio se utilizaron los siguientes estuches y reactivos:

- De BioRad (Hércules, CA, USA): Tween-20 (#170-6531) y Reactivo de Bradford, Bio-Rad protein assay (#500-0006).
- De Calbiochem (San Diego, CA, USA): Picropodofilina (#407247).
- De Farmacéutica mexicana Pisa (MEX): Heparina comercial Inhepar® (Solución inyectable con 5000 UI/ml).
- De Gibco/Invitrogen (San Diego, CA, USA): TrypLE Express (#12604-054), Suero fetal bovino (#16000-044), colagenasa tipo II (#17101-015), medio de cultivo M-199 (#31100-035), Fungizona® (#15290-018), Penicilina y Estreptomicina (#15140-148) y Trizol® (#15596026).
- De R&D Systems (Minneapolis, MN, USA): *Substrate Reagent Pack* (#DY199), *DuoSet ELISA Development System* para detección de VEGF humano (#DY293B) y de VEGF-R1 humano (#DY321).
- De Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA): sondas del estuche *Universal Probe Library set, human* (#04 683 633 001), estuche para transcripción reversa *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (#04 897 030 001), estuche para amplificación de cDNA *Light Cycler Taqman Master* (#04 735 536 001) y capilares de vidrio de 20 μ L (#04 929 292 001).
- De Siemens (Los Angeles, CA, USA): Immulite 1000® IGF-I (#LKGF1).
- De Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA): Factor de crecimiento de células endoteliales 100x (#E9640-5ML), IGF-I humano recombinante expresado en *E. coli* (#I3769-50UG), albúmina bovina fracción V (#A-4503) y L-Glutamina (#G-3126).

4.2. Muestras biológicas

Para la realización de este estudio se utilizaron cordones umbilicales humanos, suero obtenido de la sangre del cordón umbilical y cotiledones placentarios. Las muestras se obtuvieron de embarazadas normotensas (grupo NT) y de mujeres con diagnóstico de preeclampsia (grupo PE), previa obtención de la carta firmada de consentimiento de las pacientes. Antes de la toma de muestras, se contó con la aprobación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS (No. Registro: 2009-785-116) y del Comité Institucional de Investigación Biomédica en humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (No. Referencia: 111 del año 2010). La recolección de las muestras se llevó a cabo en el Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala, Unidad Médica de Alta Especialidad del IMSS.

Se incluyeron a mujeres embarazadas clínicamente sanas, excepto el grupo PE, con edad biológica entre 18 y 35 años y que dieron a luz por cesárea a un solo recién nacido con una valoración de Apgar superior a 7. En el grupo NT se incluyeron mujeres con edad gestacional de 36 a 40 semanas. El grupo PE se conformó por mujeres con edad gestacional de 28 a 39 semanas. La inclusión de mujeres PE con edad gestacional temprana se debió a la interrupción temprana en caso de presentarse complicaciones que podían comprometer la salud de la madre o del bebé. De cada grupo se registraron las características clínicas de las madres y de sus recién nacidos.

El diagnóstico de PE fue establecido por la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria según los criterios establecidos:^{3,4}.

- Grupo experimental PE: Mujeres embarazadas con hipertensión (presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg y/o presión arterial diastólica ≥ 90 mm Hg en por lo menos dos ocasiones, con un mínimo de 10 minutos de reposo entre mediciones) y proteinuria (≥ 300 mg/24hr) después de las 20 semanas de gestación.
- Grupo testigo NT: Mujeres normotensas, con ausencia o trazas de proteína en orina.

4.2.1. Cultivo de células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC)

El cultivo de células HUVEC se realizó conforme a la técnica descrita por Gutiérrez y colaboradores⁶¹. El procedimiento se describe a continuación: Después del parto por cesárea, se tomó el cordón umbilical desde el punto de corte hacia la placenta (15 a 20 cm de longitud) y se trajo al laboratorio en solución salina fría (cloruro de sodio al 0.9%). Los cordones se limpiaron con gasas estériles y alcohol y se canuló la vena umbilical con la finalidad de lavar con solución HEPES hasta no presenciar residuos sanguíneos en los lavados. Posteriormente, se sujetaron con cinturones plásticos estériles el extremo libre de cánula y el extremo en el cual está insertada la cánula. A través de este extremo se agregan 10 mL de la solución de digestión enzimática conteniendo colagenasa II al 0.02% mediante una jeringa que se enrosca a la cánula. El conjunto, cordón-cánula-heringia, se coloca en baño maría a 37 °C durante 20 min. Al final de la incubación, se secciona el extremo no canulado para recuperar en un tubo de Falcon de 50 mL la solución de digestión que contiene las células endoteliales disgregadas. Con la ayuda de la jeringa se procedió a lavar dos veces el cordón con solución HEPES y los lavados se sumaron al volumen recuperado en el tubo Falcon de 50 mL, el cual se sometió a centrifugación a 1200 rpm durante 6 min. El botón celular resultante se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo M-199 suplementado con L-Glutamina (2mM), heparina (5 UI/mL), fungizona (0.5 µg/mL), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL), 10% de suero fetal bovino (inactivado previamente a 56 °C durante 1 hora) y el factor de crecimiento de células endoteliales (5 µg/mL). Se procedió al conteo de las células en una cámara de Neubauer con la finalidad de lograr la siembra de un promedio de 1.5×10^6 células suspendidas en 2 mL de medio por pozo en cajas de 6 pozos, previamente cubiertas con gelatina al 0.2%. Las HUVEC se incubaron en atmósfera húmeda con aire (95%) y CO₂ (5%) a 37 °C. A las 24 horas de siembra, se cambia el medio previo lavado con solución HEPES y las células se mantienen en estas condiciones hasta el tercer día (72 horas de cultivo), día en el cual se llevan a cabo los experimentos. En este día, se cambia el medio de cultivo con la composición arriba mencionada con otro igual pero libre de suero fetal bovino y del factor de crecimiento endotelial.

4.2.2. Suero del cordón umbilical

En el quirófano, inmediatamente después de la expulsión de la placenta, se tomó una muestra de 5 mL de sangre por punción de la vena umbilical. La sangre se recolectó en un tubo estéril sin anticoagulante y se transportó hacia el laboratorio, donde se sometió a centrifugación de 1200 rpm durante 5 minutos. El suero obtenido se conservó en alícuotas de 500 μ L a -20 °C hasta su utilización.

4.3. Determinación de la pureza de las células endoteliales por citometría de flujo mediante la presencia de VE-caderina

A las 72 horas de cultivo, la pureza del cultivo se evaluó por citometría de flujo mediante la valoración del porcentaje de células positivas a VE-caderina, marcador de células endoteliales. A continuación se describe la técnica. A las células HUVEC cultivadas en una caja de 25 cm² se les retiró el medio de cultivo y se les cubrió con el reactivo TrypLE Express durante 3 minutos a 37 °C para despegarlas. Posteriormente, las cajas de cultivo se agitaron y su contenido se recuperó con la ayuda de una pipeta en un tubo plástico, el cual se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 mL de PBS y se centrifugó nuevamente a 1200 rpm durante 3 minutos. Después de retirar el sobrenadante, el botón se resuspendió en 40 μ L de PBS y se dividió en dos tubos plásticos, cada uno con 20 μ L. Uno de los tubos fue el control y el otro fue el de marcaje. Al tubo de marcaje se le añadió 1 μ L del anticuerpo contra VE-caderina (dilución 1:20) que está acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, evitando la exposición a la luz. A cada tubo se le agregó 1 mL de PBS y se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos. Cada botón celular se resuspendió en 400 μ L de PBS y las muestras se analizaron en el citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). El porcentaje de células positivas se evaluó por medio del programa Cell Quest.

4.4. Tratamiento de las HUVEC con el IGF-I

A las 72 horas de siembra se realizaron los tratamientos con IGF-I por un tiempo de 24 horas. Se cambió el medio de cultivo por M-199 suplementado, pero sin suero fetal bovino ni factor de crecimiento de células endoteliales. Esto con la finalidad de impedir la presencia del IGF-I que se encuentra en el suero fetal bovino. Para los ensayos de inhibición de los posibles efectos del IGF-I se agregó 1 μ M de picropodofilina (PPP), inhibidor de la fosforilación del IGF-IR, 1 hora antes de añadir el IGF-I.

4.5. Cotiledones placentarios

De cada placenta se obtuvieron tres cotiledones descartando las membranas corioamnióticas y el tejido decidual. Los cotiledones se mantuvieron en solución fría de dietilpirocarbonato (DEPC) hasta su traslado al laboratorio. Con la ayuda de material de cirugía se aisló una muestra de 60 mg de cada cotiledón que se guardó a -70 °C en un tubo estéril de vidrio con fondo plano conteniendo 1 mL de Trizol®. Para facilitar la extracción del RNA total, se procedió a la homogeneización del tejido placentario con un Polytron® PT1200C (Kinematica AG, Suiza) para el estudio de la expresión génica.

4.6. Estudios de expresión génica

Se eligió estudiar la expresión del mensajero de VEGF₁₆₅ por ser la isoforma que ejerce el mayor estímulo de la angiogénesis. El sFlt-1 se evaluó por ser el receptor que está asociado con el balance negativo de la angiogénesis y que está involucrado en el desarrollo de la preeclampsia. De esta forma, se intentó visualizar parte del equilibrio angiogénico reflejado en la síntesis de factores pro- y anti-angiogénicos. Además, se amplificó el gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para la normalización de los resultados.

1) Extracción del RNA total

El RNA total se extrajo mediante la técnica de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, con el reactivo comercial de Trizol®, con algunas modificaciones a la recomendación del fabricante. A continuación se describe el procedimiento. A las 24 horas de tratamiento de las células HUVEC, se agregaron 600 μ L de Trizol® en cada

uno de los pozos. Las células se rasparon y se recolectaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Además, se obtuvo el RNA de los homogenados de cotiledones placentarios. Durante este procedimiento todas las etapas se desarrollaron a 4 °C. A cada tubo se le agregó 250 μ L de cloroformo frío, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Al término de la centrifugación se formó una fase acuosa y una fase orgánica. La fase acuosa que contenía el RNA se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le agregaron 500 μ L de isopropanol para precipitar el RNA. Se incubó durante 1 hora a 4 °C. Cada tubo se agitó con vortex y se sometió a centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se desechó y al precipitado que contenía el RNA se le añadió 1 mL de etanol al 75% con solución DEPC. Los tubos se agitaron con vortex y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos. Nuevamente se decantó el sobrenadante y se invirtieron los tubos para evaporar el etanol residual. Finalmente, el RNA se disolvió en 15 μ L (para el cultivo celular) y en 50 μ L (para los homogenados placentarios) de solución DEPC. La concentración del RNA se evaluó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), para lo cual se colocaron 2 μ L de muestra en el disco de medición. Este equipo reporta de forma automática la concentración del RNA en μ g/ μ L y la tasa de absorbancia a 260 y 280 nm. El valor de esta relación se utiliza como indicador de pureza del RNA y se utilizaron para fines de este estudio únicamente muestras con una tasa superior a 1.7.

2) *Transcripción reversa*

Para la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se ocupó el estuche comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En un tubo eppendorf estéril de 200 μ L se mezclaron 1 μ g del RNA total, 1 μ L de oligonucleótidos de desoxi-timinas (Oligo-dT, 50 μ M) y agua grado PCR para un volumen final de 15 μ L. Las muestras se colocaron en el termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600 (Norwalk, CT, USA) y se mantuvieron a 65 °C durante 10 minutos para favorecer la unión de las timinas del Oligo-dT a sus bases complementarias de adenina contenidas en las colas poli A de los RNA mensajeros. Posteriormente las muestras se colocaron en hielo durante 1 minuto y se agregaron 7 μ L de una mezcla que contenía 4 μ L del amortiguador 5x, 0.5 μ L del inhibidor de RNAasa (40 U/ μ L), 2 μ L de la mezcla de los

4 desoxirribonucleótidos (dNTPs, 10mM) y 0.5 μ L de la enzima transcriptasa reversa (20 U/ μ L). La reacción de síntesis del cDNA se llevó a cabo a 55 °C durante 30 min y por último, la inactivación de la enzima se logró al aumentar la temperatura a 85 °C durante 5 minutos. El cDNA se mantuvo a -20 °C hasta su utilización para la amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

3) *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)*

La qPCR es una técnica que permite la amplificación y la cuantificación simultáneas de los genes de interés. La reacción se realizó en el termociclador LightCycler® 2.0 (Indianapolis, IN, USA) con el estuche *LightCycler Taqman Master* y con el programa operativo *Light Cycler Software 4.05*. El cDNA se amplificó en una mezcla que contenía 5.7 μ L de agua grado PCR, 0.1 μ L del iniciador sentido (20 μ M), 0.1 μ L del iniciador antisentido (20 μ M), 0.1 μ L de la sonda de hidrólisis, 2 μ L de la DNA polimerasa TaqMan® (Master mix, 5x) y 2 μ L del cDNA de interés. Cada reacción tenía, por tanto, 10 μ L de volumen final. La mezcla se colocó en capilares de vidrio, los cuales se centrifugaron a 1500 rpm durante 1 minuto y se colocaron en el termociclador LightCycler® 2.0 (Indianapolis, IN, USA), previamente programado para realizar la qPCR según las características que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Suceso	Segundos
1	95	Activación de la TaqMan® y desnaturalización inicial del cDNA	600
45	95	Desnaturalización del cDNA	10
	60	Alineamiento	30
	72	Alargamiento	1
1	40	Enfriamiento	10

4) *Secuencia de los iniciadores utilizados para el qPCR*

La tabla 2 muestra la secuencia de los iniciadores y el número de las sondas que se utilizaron. Lo anterior se determinó mediante el uso del programa *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (<http://qpcr.probefinder.com/roche3.html>).

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores y sondas de hidrólisis utilizadas para cada gen

PRODUCTO	SECUENCIA		# de Sonda
GAPDH	Sentido	AGCCACATCGCTGAGACAC	#60
	Antisentido	GCCCAATACGACCAAATCC	
VEGF ₁₆₅	Sentido	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	#12
	Antisentido	GGTCCCGAAACCCTGAG	
sFlt-1	Sentido	CCACTCCCTTGAACACGAG	#85
	Antisentido	CGCCTTACGGAAGCTCTCT	

4.7. Concentración de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en el suero del cordón umbilical y/o en el medio de cultivo

La concentración de IGF-I en el suero se cuantificó por un método enzimático inmunométrico quimioluminiscente, mediante el uso del estuche comercial IMMULITE 1000® IGF-I de marca Siemens. La sensibilidad del ensayo fue de 20 ng/mL y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron de 4.3% y 10%, respectivamente. El procedimiento se describe a continuación. Previo al ensayo, el equipo automático IMMULITE 1000® se calibró mediante la cuantificación en cuatruplicado de dos concentraciones conocidas, una baja de 85 ng/mL y una alta de 253 ng/mL. Estas muestras de concentración conocida se colocaron en cubetas reactivas conteniendo una esfera recubierta con anticuerpo monoclonal anti-IGF-I de ratón. El equipo se acepta como calibrado cuando el coeficiente de correlación entre las concentraciones conocidas y calculadas se encuentra entre 0.7 y 1.3 y el equipo tomará en cuenta el valor estimado como factor de corrección para la determinación de las concentraciones de IGF-I en las muestras. Se tomaron 25 µL de suero de cada una de las muestras y se prepararon en una dilución 1:10 con solución de pre-tratamiento (volumen final 250 µL). Cada muestra diluida se colocó en una cubeta reactiva. Posteriormente, las cubetas se colocaron en serie en el equipo IMMULITE 1000® para su corrida y cuantificación automática de la concentración de IGF-I.

Por lo que toca a las concentraciones de VEGF y sFlt-1 en el suero del cordón umbilical y en el medio de cultivo, se utilizaron estuches comerciales de ELISA de marca R&D Systems. La sensibilidad del estuche para la detección de VEGF fue de 9 pg/mL y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron menores al 10%. La sensibilidad para la detección de sFlt-1 fue de 3.5 pg/mL y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron menores al 10%. Cabe mencionar que todos los ensayos de ELISA se llevaron a cabo a temperatura ambiente y que las incubaciones de las placas se llevaron a cabo en cajas para evitar su exposición a la luz. Cada pozo de una placa de 96 pozos se cubrió con 100 μ L de una solución preparada a razón de 4 μ g/mL del primer anticuerpo de la proteína de interés. Las placas se mantuvieron en incubación toda la noche. Al día siguiente se decantó la solución y las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado (PBS conteniendo 0.05% de Tween® 20). Posteriormente, se agregaron a cada pozo 300 μ L de una solución de PBS conteniendo 1% de albúmina y se dejó incubar durante 1 hora con la finalidad de impedir reacciones no específicas con otras proteínas que no sean las de interés. Se decantó la solución y las placas se lavaron 3 veces. A cada pozo se le agregaron 100 μ L de cada concentración del estándar o de cada muestra y las placas se incubaron por 2 horas. En seguida, el contenido se decantó y las placas se lavaron 3 veces. Se añadieron 100 μ L por pozo del anticuerpo de detección o segundo anticuerpo a razón de 400 ng/mL y las placas se incubaron durante 2 horas. Se decantó la solución y las placas se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 μ L por pozo de estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano (dilución 1:200) y las placas se incubaron por 20 minutos. Se decantó la solución y las placas se lavaron 3 veces. Se añadieron 100 μ L por pozo de solución sustrato (Mezcla 1:1 de H₂O₂ y tetrametilbenzidina) y las placas se incubaron durante 20 minutos. Finalmente, la reacción colorimétrica se detuvo con solución de ácido sulfúrico 2N. La placa se coloca en un espectrofotómetro (Labsystem Multiscan 352, USA) y la densidad óptica de cada pozo se registró a 450 nm de longitud de onda. La concentración de la proteína de interés se normalizó por mg de proteína.

4.8. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método establecido por Bradford⁶². A continuación se describe el procedimiento. De cada pozo se retiró el medio de cultivo y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en forma de alícuotas para la determinación de la concentración de los factores de interés. Para la recuperación de las células de cada pozo se añadieron $500\text{ }\mu\text{L}$ de solución de lisis (0.1% SDS y 1% Nonident en PBS) y con ayuda de un raspador se desprendieron los restos celulares que fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

En una placa de 96 pozos se colocaron la curva estándar con concentraciones de BSA de 0 a $2.5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $5\text{ }\mu\text{L}$ de cada muestra diluida dos veces. A cada pozo se le agregaron $200\text{ }\mu\text{L}$ del reactivo de Bradford (dilución 1:5). El principio del método se basa en que el reactivo de Bradford de coloración café produce diferentes tonalidades de color azul cuando reacciona con las proteínas de las muestras, y la intensidad en la coloración es directamente proporcional a la concentración de las proteínas presentes. La lectura de la absorbancia se determinó con la longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Labsystem Multiscan 352, USA).

4.9. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como promedio \pm error estándar. El análisis estadístico de los datos se hizo con el programa SigmaStat 3.5. Para el estudio de los efectos del IGF-I se utilizó el análisis de varianza de una vía y las comparaciones múltiples por par se llevaron a cabo mediante el uso del método de Tukey. Para comparar los resultados entre los dos grupos NT y PE se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, la de "t" de Student y la de Fisher. Los estudios de asociación se realizaron por el método de correlación de Spearman. Las diferencias significativas se fijaron a un valor de $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del IGF-I sobre la expresión génica y la concentración de las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC)

A continuación se presentan las características morfológicas (figura 4) y la pureza (figura 5) de las células HUVEC en pasaje cero, de uno de los cultivos típicos realizados.

5.1.1. Características morfológicas y pureza de las células HUVEC

La figura 4 muestra el aspecto celular de las células HUVEC a las 72 horas de su cultivo. Tal como se observa, las células HUVEC poseen una estructura fusiforme, es decir guardan una forma alargada que se estrecha hacia los extremos. Tienen a colocarse de forma adyacente entre sí y formar agrupaciones como estrella, concentradas al centro y dispersas en su periferia.



Figura 4. Aspecto típico de un cultivo de células HUVEC a las 72 horas de siembra. Aumento x 20.

El estudio de la pureza de las células endoteliales se realizó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico contra la proteína de adhesión VE-caderina. La figura 5 muestra sobre su eje Y el número de células y sobre su eje X la intensidad de la fluorescencia emitida por las mismas en unidades arbitrarias. Las células control incubadas en ausencia del anticuerpo (parte izquierda de la figura y en línea continua) emitieron poca intensidad de fluorescencia, mientras que las células incubadas con el anticuerpo (parte derecha de la figura y en línea discontinua) emitieron significativamente más fluorescencia. Los resultados obtenidos demostraron que el cultivo celular estaba conformado por un 98.2% de células endoteliales.

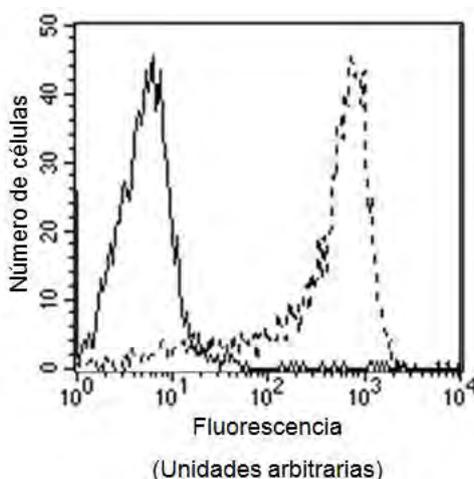


Figura 5. Fluorescencia obtenida por citometría de flujo en células endoteliales incubadas con el anticuerpo para VE-caderina (línea discontinua, a la derecha) y en células control (línea continua, a la izquierda).

5.1.2. Efecto del IGF-I sobre la expresión de VEGF y sFlt-1

El efecto del IGF-I sobre la expresión de VEGF y de sFlt-1 en células HUVEC, se realizó con estudios de dosis respuesta utilizando las siguientes concentraciones: 0.00 (vehículo), 3.12, 6.25, 12.50, 25.00 y 100.00 ng/mL. La duración de los tratamientos fue de 24 horas. Los datos presentados corresponden a los de 7 cultivos HUVEC obtenidos de mujeres del grupo NT.

El IGF-I estimuló la expresión génica del VEGF y del sFlt-1 (figuras 6 y 7). Con respecto al vehículo, la expresión de VEGF en las HUVEC del grupo de mujeres NT fue significativamente mayor en presencia de 12.50, 25 y 100 ng/mL de IGF-I (1.95, 1.78 y 1.82 vs 0.97, respectivamente, $P < 0.05$). La expresión de sFlt-1 en las células HUVEC mantuvo un patrón muy semejante a las expresiones observadas de VEGF.

Las células HUVEC expresaron al sFlt-1 de forma significativamente mayor en presencia de 6.25, 12.50, 25 y 100 ng/mL de IGF-I en comparación con su vehículo (1.58, 1.94, 1.58 y 1.81 vs 0.97, respectivamente, $P < 0.05$).

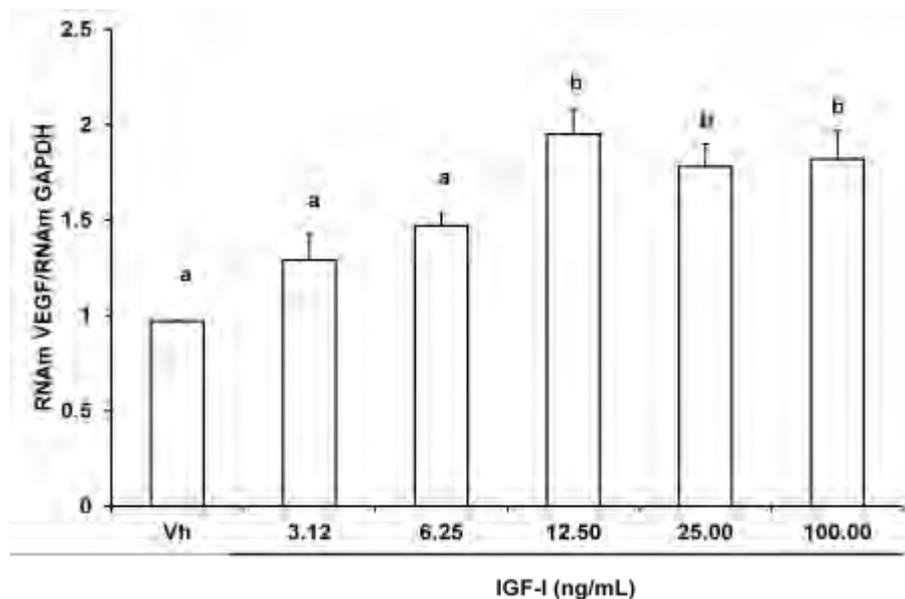


Figura 6. Efecto del IGF-I sobre la expresión de VEGF en células HUVEC del grupo de mujeres NT. La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples se evaluaron con el test de Tukey. b, $P < 0.05$ vs vh. (n = 7).

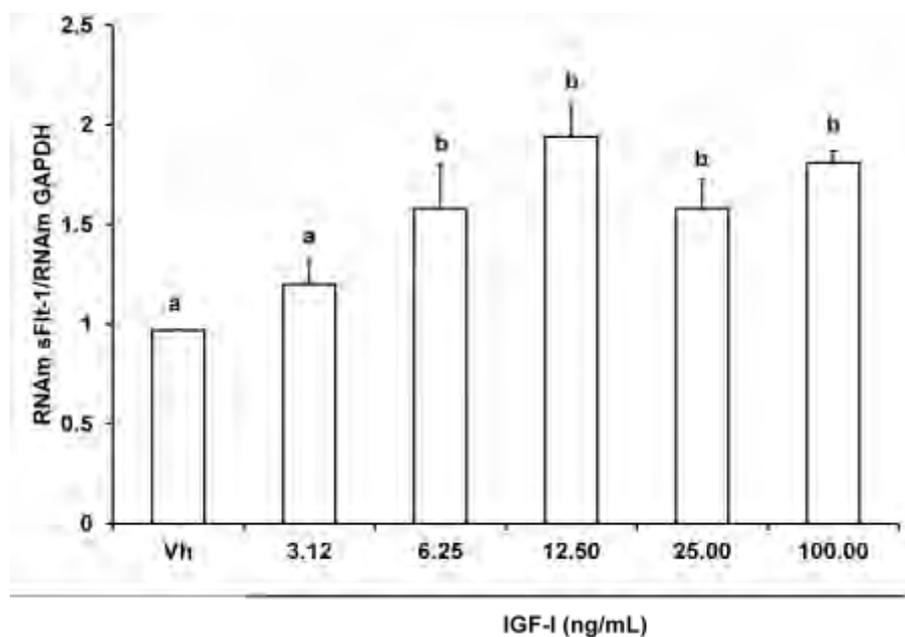


Figura 7. Efecto del IGF-I sobre la expresión de sFlt-1 en células HUVEC del grupo de mujeres NT. La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples se evaluaron con el test de Tukey. b, $P < 0.05$ vs vh. (n = 7).

5.1.3. Efecto del IGF-I sobre la concentración de las proteínas de VEGF y de sFlt-1

El efecto del IGF-I sobre la concentración de las proteínas de VEGF y sFlt-1 en el medio de cultivo de las HUVEC, se realizó con estudios de dosis respuesta utilizando las siguientes concentraciones: 0.00 (vehículo), 3.12, 6.25, 12.50, 25.00 y 100.00 ng/mL. La duración de los tratamientos fue de 24 horas.

Se utilizaron 3 cultivos de células HUVEC del grupo de mujeres NT y 3 cultivos del grupo de mujeres PE. No se encontraron diferencias significativas en la edad gestacional de los grupos ($P = 0.700$).

No fue posible detectar la presencia de VEGF en los medios de cultivo de las células HUVEC.

Con respecto al vehículo, la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT fue significativamente mayor en presencia de 12.50 y 25 ng/mL de IGF-I (1814 ± 86 y 1797 ± 110 vs 1182 ± 67 pg/mL, $P = 0.003$) (figura 8).

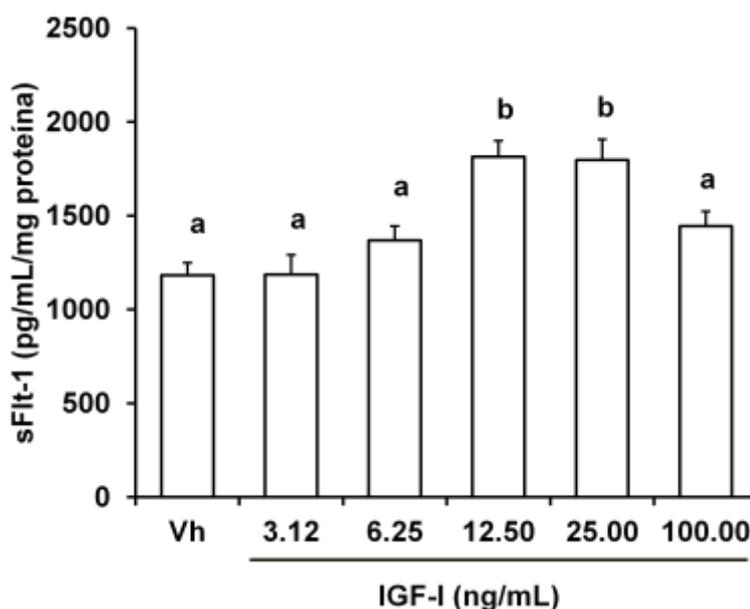


Figura 8. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT. La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples se evaluaron con el test de Tukey. b, $P < 0.005$ vs vh. (n = 3).

No se observaron cambios en la concentración de sFlt-1, inducidos por el IGF-I, en el medio de cultivo de células HUVEC obtenidas del grupo de pacientes PE (figura 9).

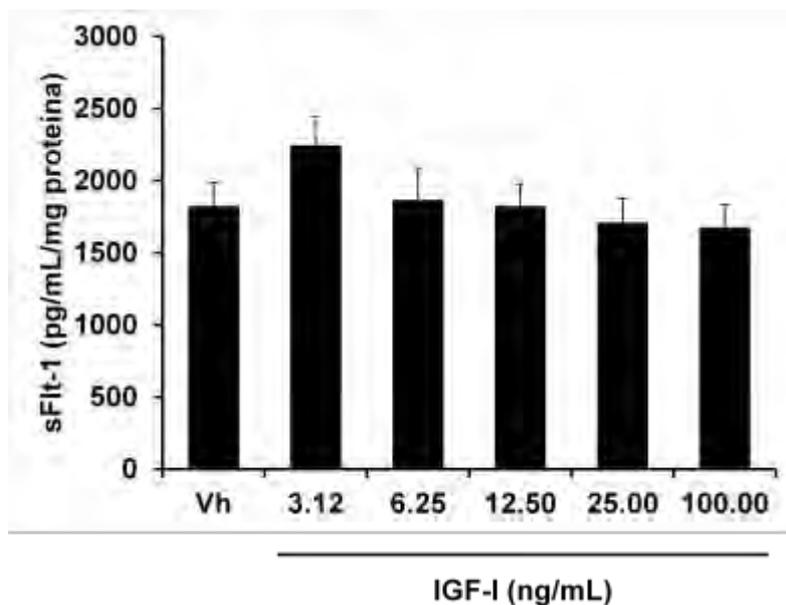


Figura 9. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres PE. La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples se evaluaron con el test de Tukey. $P = 0.305$. ($n = 3$).

Sin embargo, la concentración de sFlt-1 fue significativamente mayor en los medios de las células HUVEC obtenidas del grupo de mujeres PE que en los obtenidos del grupo de mujeres NT, tanto de forma basal (1825 ± 162 vs 1182 ± 67 pg/mL, $P = 0.022$), como en presencia de 3.12 ng/mL de IGF-I (2245 ± 196 vs 1186 ± 105 , $P = 0.009$), figura 10.

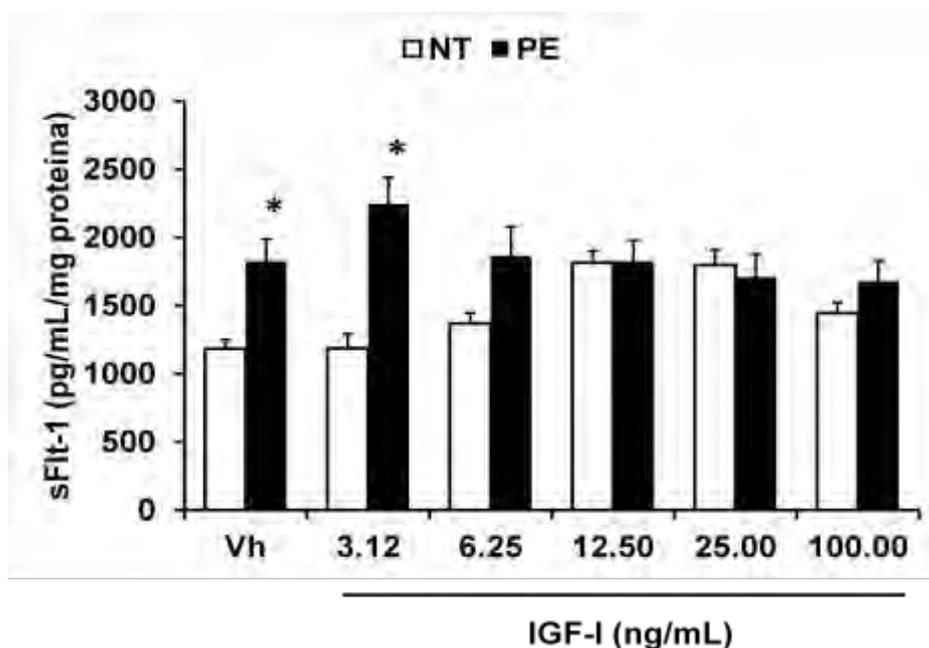


Figura 10. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de "t" de Student. *, $P < 0.05$ vs NT. ($n = 3$).

5.1.4. Efecto del IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 en presencia de un inhibidor de la actividad del receptor de IGF-I

En el cultivo de las células HUVEC obtenidas del grupo de mujeres NT, el efecto estimulador de 12.50 ng/mL de IGF-I sobre la concentración de sFlt-1 fue significativamente abolido con la presencia de PPP (1803 \pm 67 vs 1306 \pm 46 pg/mL, $P < 0.001$), figura 11.

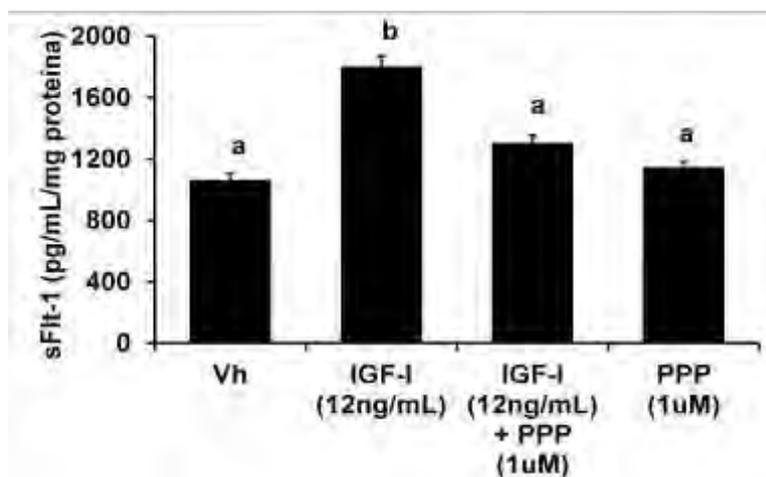


Figura 11. Efecto del PPP sobre la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT. La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples se evaluaron con el test de Tukey. b, $P < 0.001$. (n = 3).

Debido a que no se lograron cultivos exitosos de células obtenidas del grupo PE, para fines comparativos de expresión génica se optó por utilizar homogenados de explantes de placentas obtenidas de mujeres normotensas y preeclámpticas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

5.2. Expresión de VEGF y sFlt-1 en homogenados placentarios de los grupos de mujeres normotensas (NT) y preeclámpticas (PE)

Tal como se observa en las figuras 12 y 13, en el grupo de placentas provenientes de pacientes PE se observó una expresión significativamente menor de VEGF ($P = 0.002$) y significativamente mayor de sFlt-1 ($P = 0.008$). Además, se observó que la tasa de concentración detectada de sFlt-1 en los explantes placentarios del grupo de mujeres NT fue aproximadamente 100 veces superior que la tasa de concentración detectada en el cultivo de células HUVEC, mientras que en los explantes placentarios obtenidos del grupo de pacientes PE fue cerca de 1000 veces mayor a la detectada en el cultivo de células HUVEC.

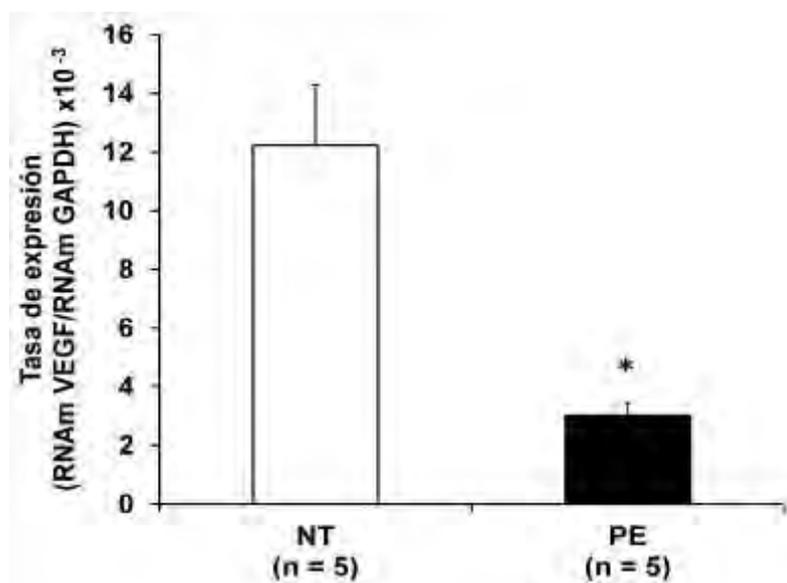


Figura 12. Expresión de VEGF en homogenados placentarios de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de "t" de Student, $P < 0.01$. NT = Homogenados placentarios obtenidos del grupo de mujeres embarazadas normotensas; PE = Homogenados placentarios obtenidos del grupo de mujeres preeclámpticas.

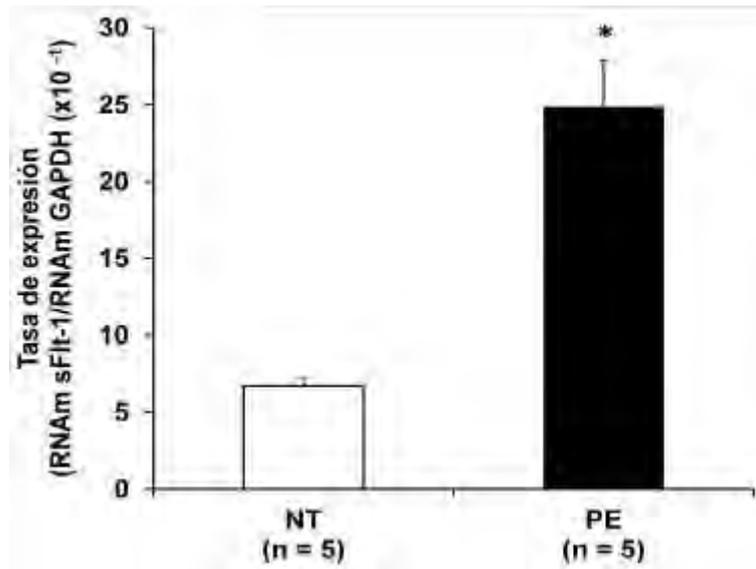


Figura 13. Expresión de sFlt-1 en homogenados placentarios de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney, $P < 0.01$. NT = Homogenados placentarios obtenidos del grupo de mujeres embarazadas normotensas; PE = Homogenados placentarios obtenidos del grupo de mujeres preeclámpticas.

5.3. Concentración de factores angiogénicos en el suero del cordón umbilical

5.3.1. Características clínicas de los grupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos

Tal como se observa en la tabla 3, en el estudio de concentración de factores angiogénicos en el suero del cordón umbilical se incluyeron 27 muestras obtenidas de mujeres NT y 14 muestras de mujeres PE.

Tabla 3. Características clínicas de los grupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos.

Características clínicas	Grupo NT (n = 27)	Grupo PE (n = 14)	P
Edad biológica (años)	30.2 ± 1.1	31.3 ± 1.5	0.570 ^a
Edad gestacional (semanas)	38.7 ± 0.2	34.4 ± 0.9	< 0.001 ^b
Gestas	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.3	0.512 ^b
PAS (mm Hg)	110 ± 1	148 ± 3	< 0.001 ^b
PAD (mm Hg)	71 ± 1	94 ± 1	< 0.001 ^b
Proteinuria (mg/dL)	Negativo o trazas	≥ 100	----
Peso del recién nacido (g)	3070 ± 75	2002 ± 214	< 0.001 ^b
Bajo peso al nacer (< percentil 10)	2/27	7/14	0.003 ^c
Talla del recién nacido (cm)	49.2 ± 0.2	44.9 ± 1.8	0.094 ^b

PAS = Presión arterial sistólica; PAD = Presión arterial diastólica. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron la de "t" de Student (a), la de U de Mann-Whitney (b) y la de Fisher (c).

No se observaron diferencias significativas en la edad biológica de las madres, en el número de gestas, ni en la talla de los recién nacidos de los grupos de mujeres NT y PE. Como era de esperarse, el grupo de mujeres PE se caracterizó por presentar cifras de presión arterial sistólica y diastólica estadísticamente superiores que las del grupo NT ($P < 0.001$) y proteinuria, criterios diagnósticos de la preeclampsia. El peso al nacer de los recién nacidos del grupo de mujeres PE fue significativamente más bajo que el del grupo de mujeres NT ($P < 0.01$). Además, el 50% de los recién nacidos de este grupo presentaron bajo peso para su edad gestacional en comparación con los recién nacidos del grupo de mujeres NT, en los cuales la restricción del crecimiento intrauterino se presentó únicamente en el 7.4%; estos porcentajes fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$). Además, el grupo

de pacientes PE presentó en promedio una edad gestacional significativamente menor comparada con la del grupo NT ($P < 0.001$).

5.3.2. Concentración en el suero del cordón umbilical de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en los grupos de mujeres NT y PE

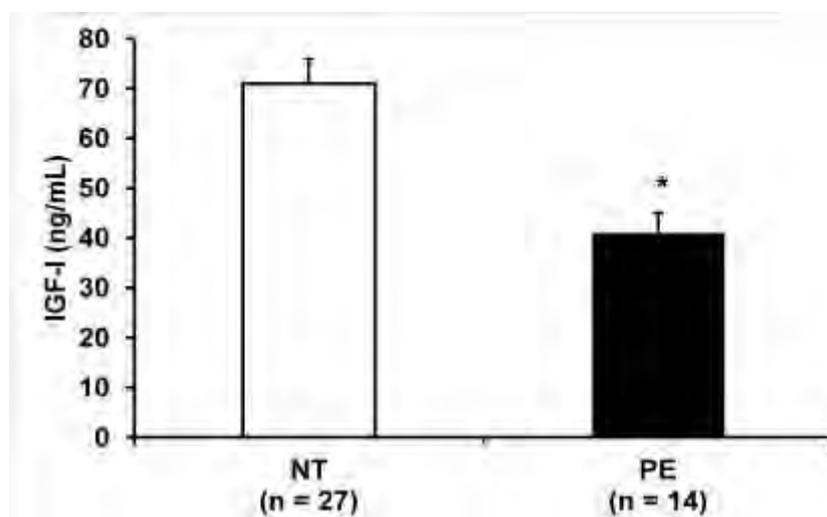


Figura 14. Concentración de IGF-I en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney. *, $P < 0.001$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

En el grupo de mujeres PE se observó una concentración significativamente menor del IGF-I en comparación a la del grupo de mujeres NT (41 ± 4 vs 71 ± 5 ng/mL, $P < 0.0001$, figura 14). De manera similar, la concentración de VEGF fue significativamente más baja con respecto a la del grupo de mujeres NT (109 ± 23 vs 231 ± 41 pg/mL, $P = 0.023$, figura 15).

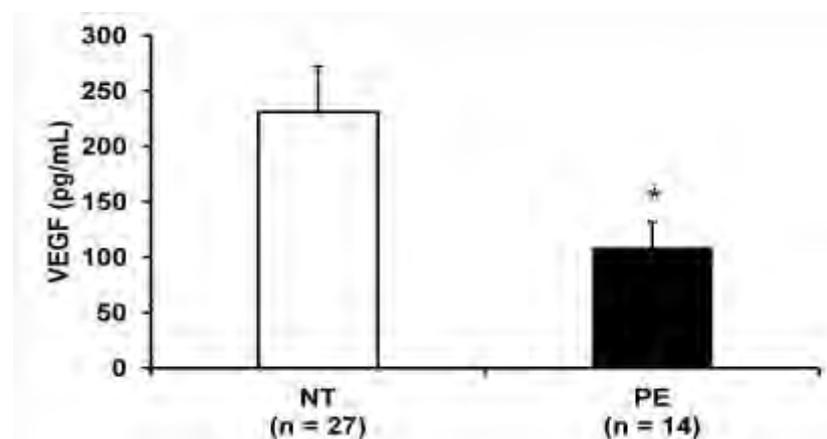


Figura 15. Concentración de VEGF en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney. *, $P < 0.05$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

En cambio, la concentración del sFlt-1 fue significativamente más alta en el grupo de mujeres PE al compararlas con la concentración del grupo de mujeres NT (2794 ± 561 vs 558 ± 57 pg/mL, $P = 0.003$, figura 16).

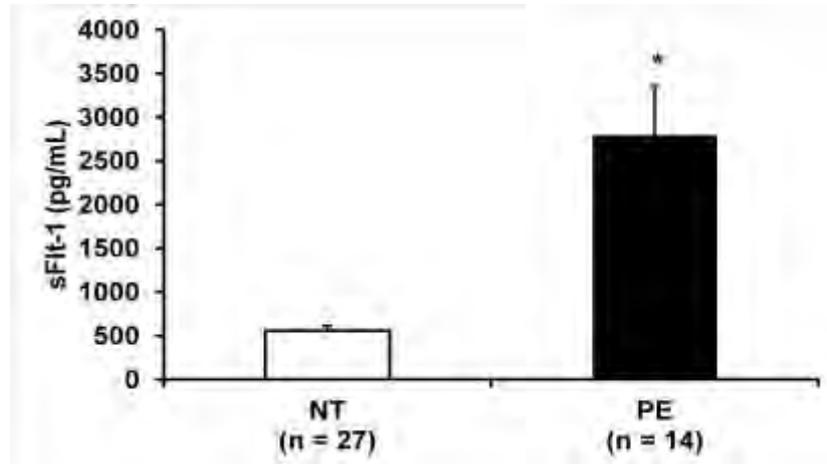


Figura 16. Concentración de sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney. *, $P < 0.01$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

La tasa de concentración de VEGF/sFlt-1 fue significativamente menor en el grupo de pacientes PE que en el grupo de mujeres NT (11.6 ± 5.7 vs 49.6 ± 8.2 , $P < 0.001$, figura 17).

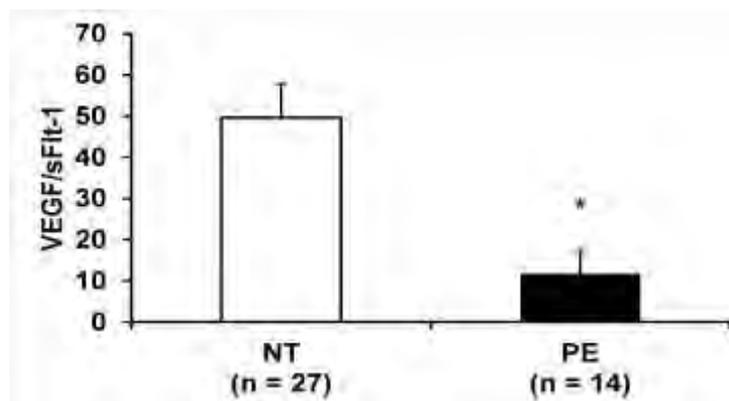


Figura 17. Tasa de concentración de VEGF/sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los grupos de mujeres NT y PE. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney. *, $P < 0.001$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

5.3.3. Estudios de asociación entre el peso de los recién nacidos (RN) y factores angiogénicos con la edad gestacional en los grupos de mujeres NT y PE

Tabla 4. Correlación de Spearman del peso de los RN y de los factores angiogénicos con la edad gestacional (EG) en los grupos de mujeres NT y PE.

	NT + PE (n = 41)		NT (n = 27)		PE (n = 14)	
	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>
Peso RN vs EG	0.702	< 0.0001	0.208	0.296	0.916	< 0.0001
IGF-I vs EG	0.433	0.005	- 0.211	0.287	0.685	0.006
VEGF vs EG	0.256	0.106	0.201	0.313	- 0.355	0.206
sFlt-1 vs EG	- 0.425	0.006	< 0.001	0.996	- 0.236	0.407

Como se observa en la tabla 4 y la figura 18, el peso de los recién nacidos de los grupos de mujeres NT y PE se asoció significativamente con la edad gestacional ($Rho = 0.702$, $P < 0.0001$). Al analizar los dos grupos por separado, la asociación de estas dos variables se incrementó en el grupo de mujeres PE ($Rho = 0.916$, $P < 0.0001$), tabla 4 y figura 9. Esta asociación se perdió en el grupo de mujeres NT (tabla 4) debido a que el rango de la edad gestacional fue reducido.

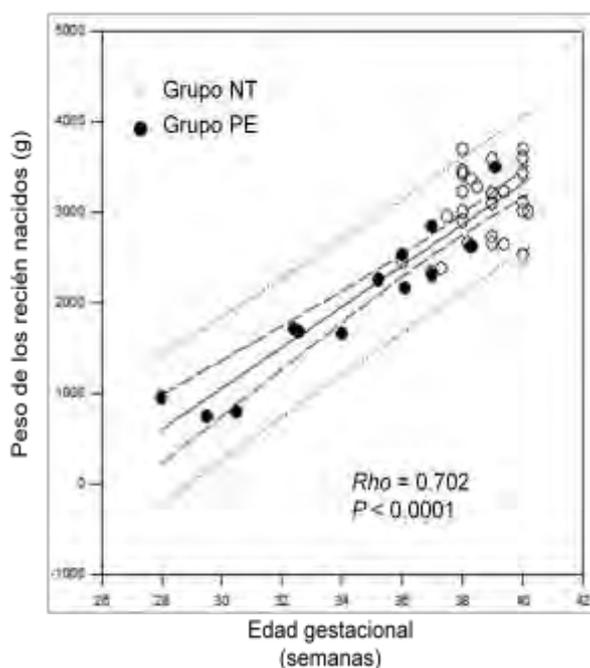


Figura 18. Correlación de Spearman del peso de los RN con la edad gestacional en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE. (n = 41).

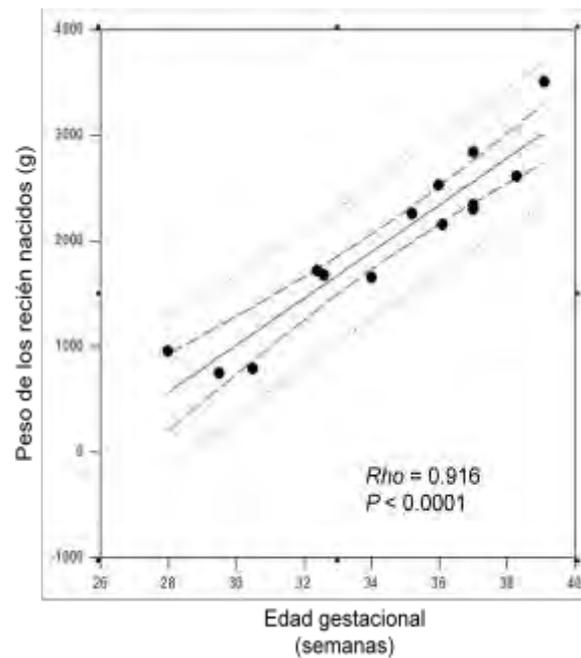


Figura 19. Correlación de Spearman del peso de los RN con la edad gestacional en el grupo de mujeres PE. (n = 14).

La concentración del IGF-I aumentó con la edad gestacional y se observó una asociación significativa entre estas dos variables en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE ($Rho = 0.433$, $P < 0.01$), tabla 4 y figura 20.

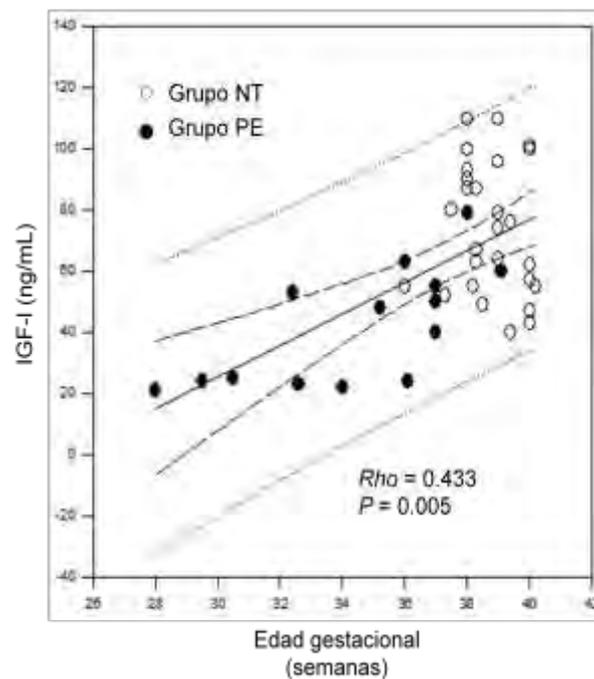


Figura 20. Correlación de Spearman del IGF-I con la edad gestacional en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE. (n = 41).

De igual manera que en el caso del peso al nacer, la asociación entre el IGF-I y la edad gestacional se incrementó en el grupo de mujeres PE al analizarlo por separado ($Rho = 0.685$, $P < 0.01$), tabla 4 y figura 21. La asociación entre estas dos variables no fue significativa en el grupo de mujeres NT (tabla 4).

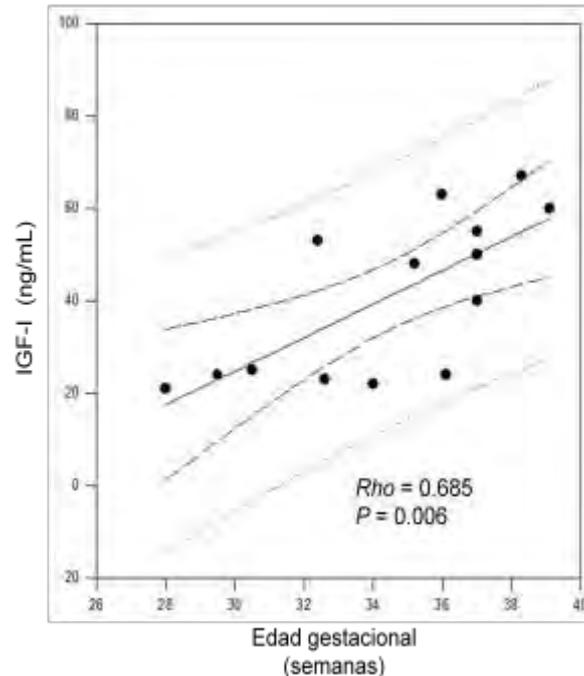


Figura 21. Correlación de Spearman del IGF-I con la edad gestacional en el grupo de mujeres PE. (n = 14).

Como se observa en la tabla 4, la asociación de la concentración del VEGF con la edad gestacional no fue significativa en ambos grupos analizados por separado y de forma conjunta. Sin embargo, la concentración del sFlt-1 presentó una correlación negativa y significativa con la edad gestacional al analizar los dos grupos de mujeres NT y PE en conjunto ($Rho = - 0.425$, $P < 0.01$), tabla 4 y figura 22. Esta asociación se perdió al analizar los grupos de mujeres NT y PE por separado (tabla 4).

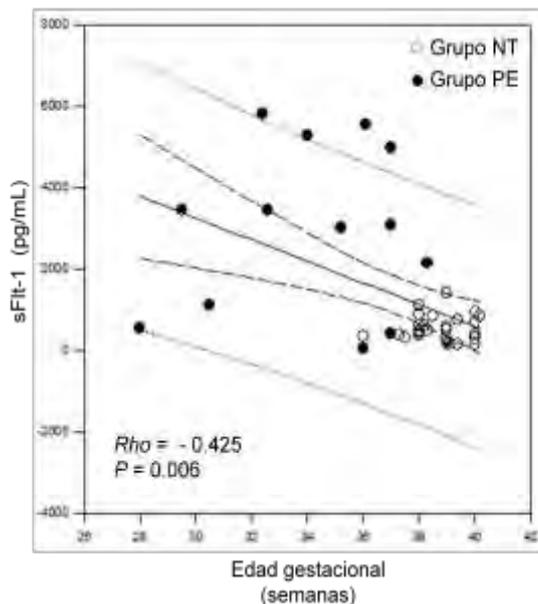


Figura 22. Correlación de Spearman del sFlt-1 con la edad gestacional en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE. (n = 41).

5.3.4. Estudios de asociación del peso de los recién nacidos (RN) con el IGF-I, el VEGF y el sFlt-1 en los grupos de mujeres NT y PE

El peso al nacer se asoció de manera positiva y significativa con la concentración del IGF-I en los grupos de mujeres NT ($Rho = 0.503$, $P < 0.01$), PE ($Rho = 0.772$, $P < 0.0001$) y en el conjunto de los dos grupos ($Rho = 0.711$, $P < 0.0001$), tabla 5 y figuras 23, 24 y 25.

Tabla 5. Correlación de Spearman entre el peso del RN y factores angiogénicos de los grupos de mujeres NT y PE.

	NT + PE (n = 41)		NT (n = 27)		PE (n = 14)	
	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>
Peso RN vs IGF-I	0.711	< 0.0001	0.503	0.008	0.772	< 0.0001
Peso RN vs VEGF	0.138	0.389	0.027	0.890	- 0.490	0.072
Peso RN vs sFlt-1	- 0.424	0.006	0.260	0.188	- 0.451	0.101

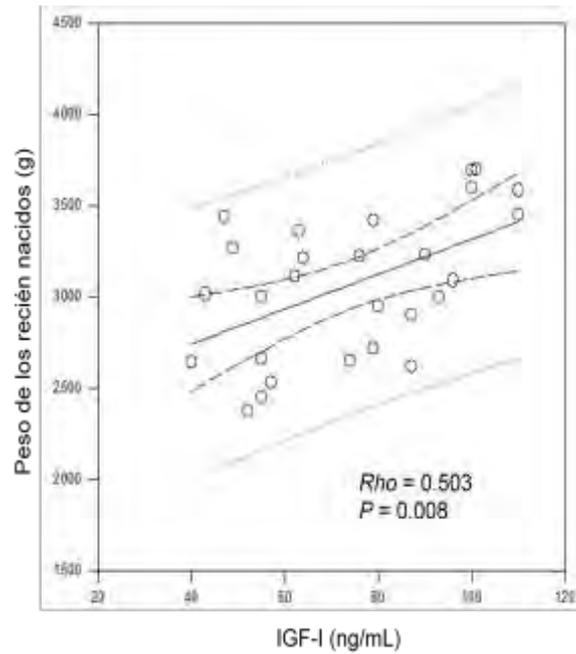


Figura 23. Correlación de Spearman del peso de los RN con el IGF-I en el grupo de mujeres NT. (n = 27).

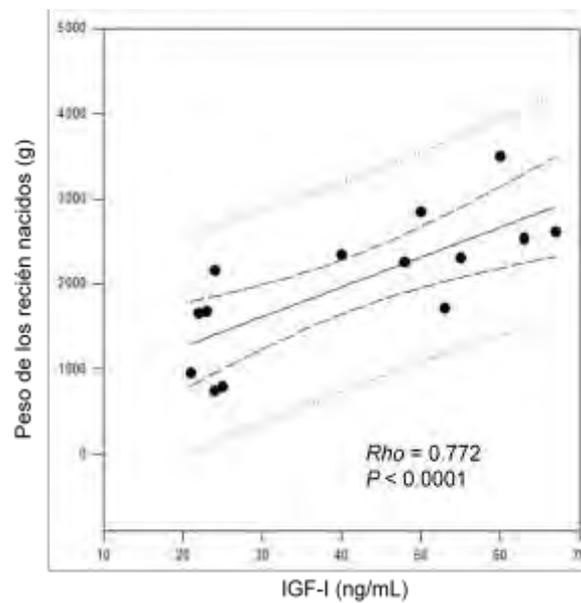


Figura 24. Correlación de Spearman del peso de los RN con el IGF-I en el grupo de mujeres PE. (n = 14).

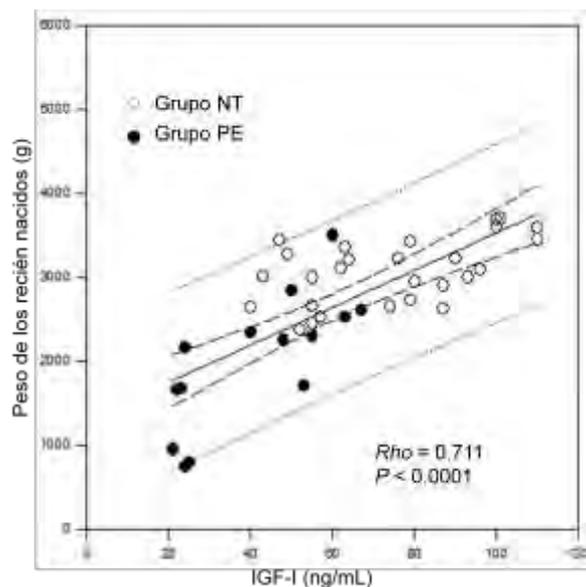


Figura 25. Correlación de Spearman del peso de los RN con el IGF-I en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE. (n = 41).

Como se observa en la tabla 5, la asociación del peso al nacer con la concentración del VEGF no fue significativa en ambos grupos analizados por separado y de forma conjunta. Sin embargo, el peso al nacer presentó una asociación negativa y significativa con la concentración del sFlt-1 al analizar los grupos de mujeres NT y PE en conjunto ($Rho = -0.424$, $P < 0.01$), tabla 5 y figura 26. Al analizar los grupos por separado, la asociación entre estas variables perdió significancia estadística (tabla 5).

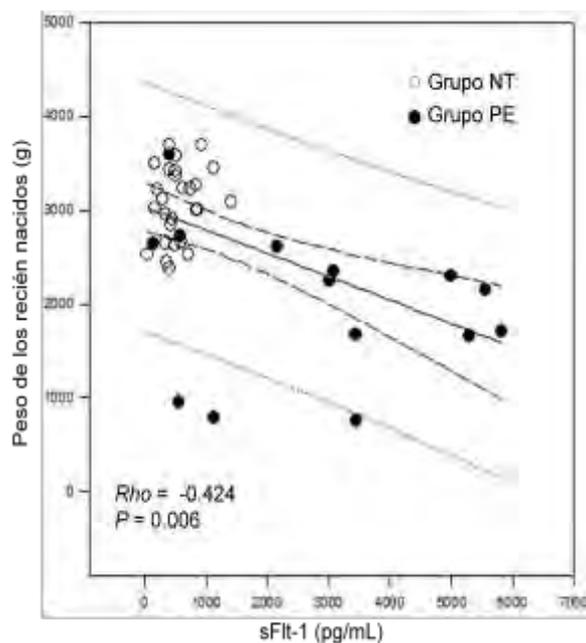


Figura 26. Correlación de Spearman del peso de los RN con el sFlt-1 en el conjunto de los grupos de mujeres NT y PE. (n = 41).

5.3.5. Estudios de asociación entre factores angiogénicos en los grupos de mujeres NT y PE

En la tabla 6 se pueden observar los resultados de los análisis de correlación entre las concentraciones de IGF-I, VEGF y sFlt-1. Como se observa en esta tabla y en las figuras 27 y 28, se logró significancia únicamente entre las concentraciones de IGF-I y de sFlt-1 en el grupo de mujeres NT ($Rho = 0.428$, $P < 0.05$) y entre las de VEGF y sFlt-1 en el grupo de mujeres PE ($Rho = 0.741$, $P < 0.01$). Por lo que toca a las concentraciones de IGF-I y VEGF, no se observaron asociaciones significativas en los grupos de mujeres NT y PE analizados por separado o en conjunto (tabla 6).

Tabla 6. Correlación de Spearman entre factores angiogénicos en los grupos de mujeres NT y PE.

	NT + PE (n = 41)		NT (n = 27)		PE (n = 14)	
	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>
VEGF vs IGF-I	0.072	0.655	- 0.136	0.497	- 0.427	0.121
sFlt-1 vs IGF-I	- 0.228	0.151	0.428	0.026	- 0.343	0.219
sFlt-1 vs VEGF	0.046	0.773	0.029	0.883	0.741	0.002

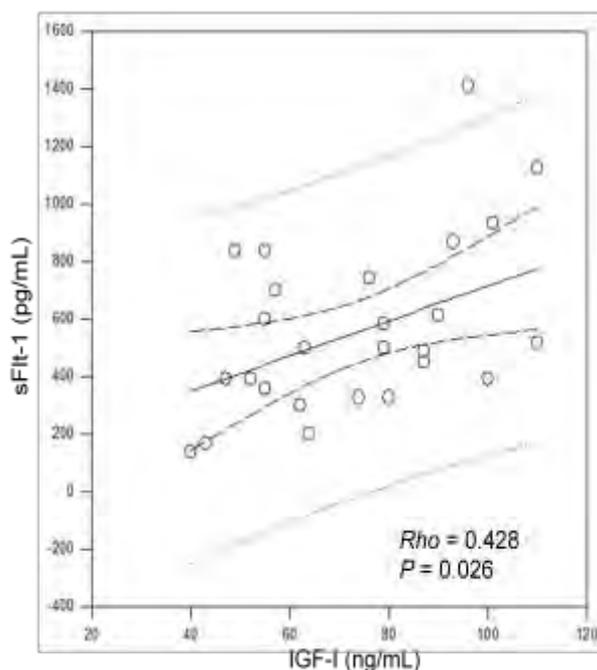


Figura 27. Correlación de Spearman del sFlt-1 con el IGF-I en el grupo de mujeres NT. (n = 27).

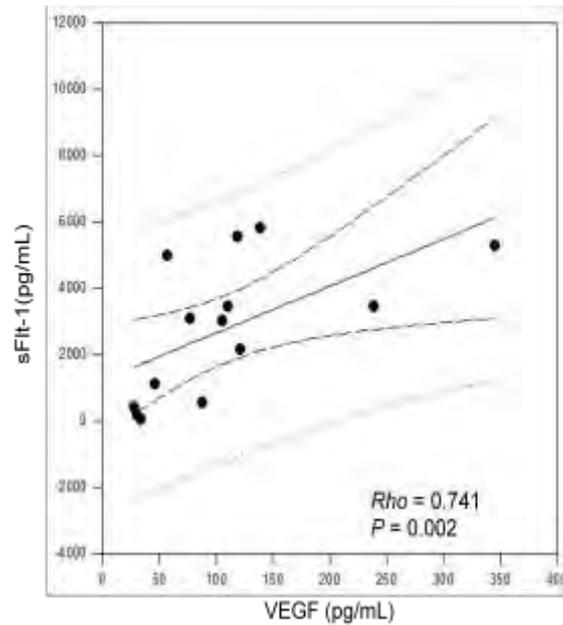


Figura 28. Correlación de Spearman del sFlt-1 con el VEGF en el grupo de mujeres PE. (n = 14).

Como se observó anteriormente, el peso al nacer así como las concentraciones de IGF-I y de sFlt-1 se asociaron significativamente con la edad gestacional, variable que fue significativamente menor en el grupo de pacientes PE. Con la finalidad de confirmar o descartar a esta variable como responsable de las diferencias observadas entre ambos grupos, se procedió en analizar dos subgrupos de mujeres NT y PE con un promedio de edad gestacional similar. A continuación se describen los resultados obtenidos en estas dos submuestras.

5.3.6. Características clínicas de los subgrupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos pareados por edad gestacional (≥ 36 y ≤ 39 semanas)

En la tabla 7 se observan las características clínicas de los dos subgrupos de mujeres NT y PE conformados por 18 y 7 pacientes, respectivamente. Como se observa en esta tabla, el peso al nacer fue significativamente más bajo en el subgrupo de mujeres PE que en el subgrupo de mujeres NT ($P < 0.05$), a pesar de que la edad gestacional no fue significativamente diferente entre ambos subgrupos.

Tabla 7. Características clínicas de los subgrupos de mujeres NT y PE y de sus recién nacidos pareados por edad gestacional (≥ 36 y ≤ 39 semanas).

Características clínicas	Subgrupo NT (n = 18)	Subgrupo PE (n = 7)	P
Edad biológica (años)	30.5 \pm 1.4	30.4 \pm 2.8	0.965 ^a
Edad gestacional (semanas)	38.1 \pm 0.1	37.2 \pm 0.4	0.080 ^b
Gestas	2.6 \pm 0.2	1.8 \pm 0.5	0.090 ^b
PAS (mm Hg)	108 \pm 1	140 \pm 2	< 0.001 ^b
PAD (mm Hg)	69 \pm 1	92 \pm 1	< 0.001 ^b
Proteinuria (mg/dL)	Negativo o trazas	≥ 100	----
Peso del recién nacido (g)	3035 \pm 93	2610 \pm 170	0.029 ^a
Bajo peso al nacer (< percentil 10)	1/18	3/7	0.053 ^c
Talla del recién nacido (cm)	49.2 \pm 0.4	49.0 \pm 0.7	0.951 ^a

PAS = Presión arterial sistólica; PAD = Presión arterial diastólica. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron la de "t" de Student (a), la de U de Mann-Whitney (b) y la de Fisher (c).

5.3.7. Concentración en el suero del cordón umbilical de IGF-I, VEGF y sFlt-1 en los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional (≥ 36 y ≤ 39 semanas)

De igual manera que con el peso al nacer, las diferencias observadas entre ambos subgrupos en cuestión de concentraciones de IGF-I, VEGF y sFlt-1 mantuvieron su significancia estadística. En efecto, el subgrupo de mujeres PE presentó concentraciones significativamente menores que en el subgrupo de mujeres NT de IGF-I (51 \pm 6 vs 79 \pm 5 ng/mL, $P = 0.003$) y de VEGF (67 \pm 15 vs 192 \pm 32 pg/mL, $P = 0.009$), figuras 29 y 30. En cambio, la concentración de sFlt-1 fue significativamente mayor en el subgrupo de mujeres PE que en el subgrupo de mujeres NT (2347 \pm 869 vs 582 \pm 72 pg/mL, $P = 0.003$), figura 31.

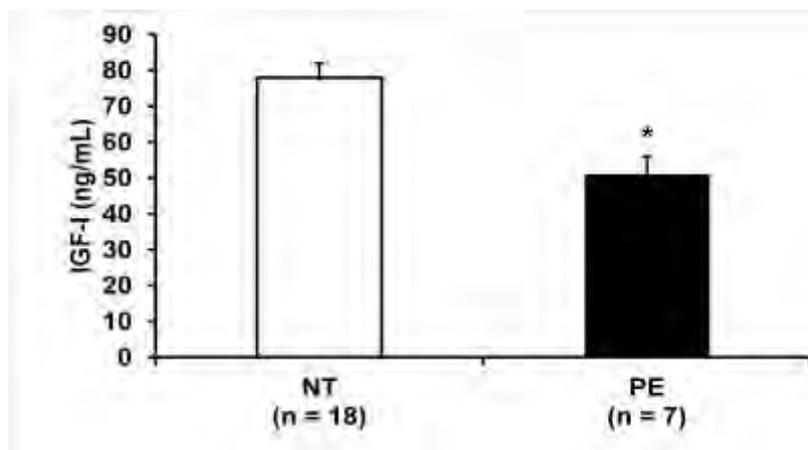


Figura 29. Concentración de IGF-I en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional. La prueba estadística utilizada fue la de “t” de Student. *, $P < 0.01$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

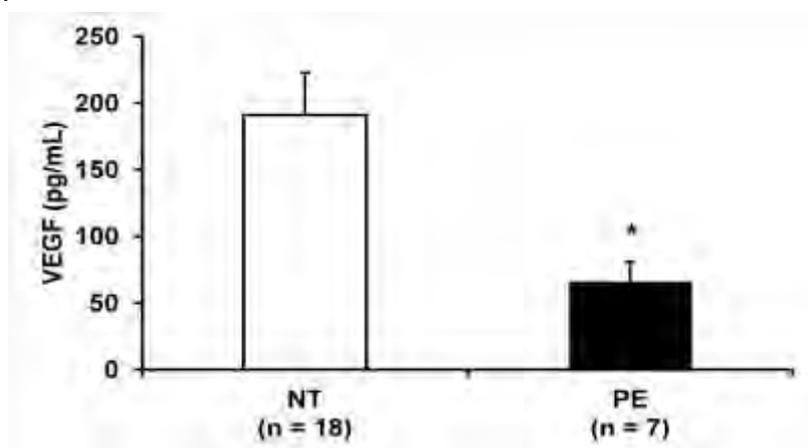


Figura 30. Concentración de VEGF en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney. *, $P < 0.01$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

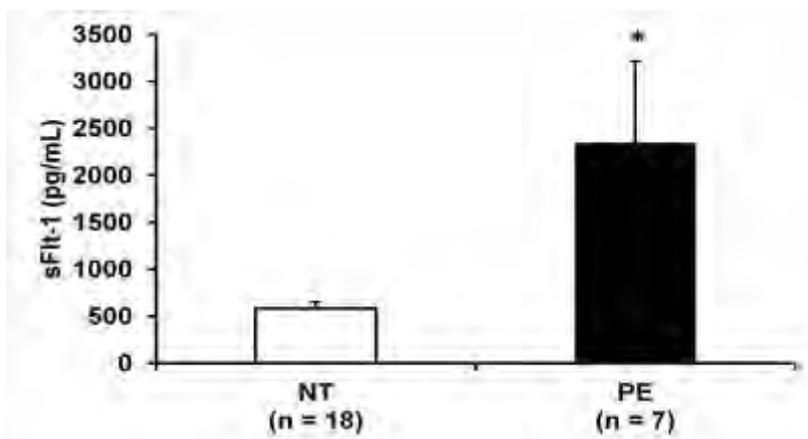


Figura 31. Concentración de sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional. La prueba estadística utilizada fue la de “t” de Student. *, $P < 0.01$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

La tasa de concentración de VEGF/sFlt-1 se siguió manteniendo más baja en el subgrupo de mujeres PE en comparación con la del subgrupo de mujeres NT (17.2 ± 11.4 vs 44.1 ± 10.5 , $P = 0.017$, figura 32).

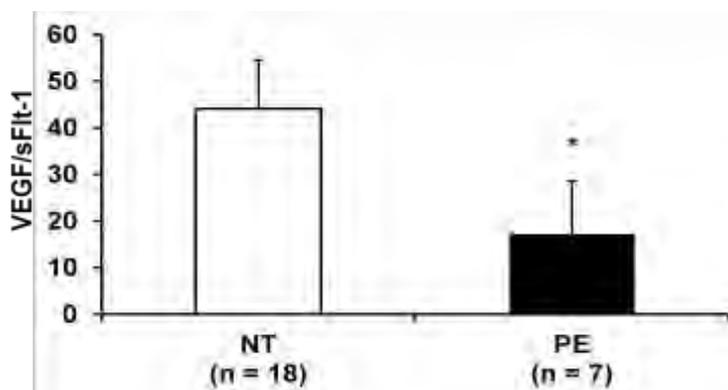


Figura 32. Tasa de concentración de VEGF/sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de los subgrupos de mujeres NT y PE pareados por edad gestacional. La prueba estadística utilizada fue la de U de Mann-Whitney. *, $P < 0.05$. NT = mujeres embarazadas normotensas; PE = mujeres preeclámpticas.

6. DISCUSIÓN

El balance entre factores pro- y anti-angiogénicos durante el embarazo determina la adecuada tasa de formación y el mantenimiento de los vasos sanguíneos de la unidad fetoplacentaria.

Durante la preeclampsia (PE), enfermedad que se caracteriza por hipertensión y proteinuria, se informa de disfunción endotelial y deficiente proceso angiogénico^{11,16}. En este sentido, las concentraciones del sFlt-1, forma soluble del receptor tipo 1 del VEGF y factor anti-angiogénico, están incrementadas en la circulación materna, en el suero del cordón umbilical y en la placenta de mujeres con PE^{11-13,18-27}. Por otra parte, las concentraciones del VEGF, principal factor angiogénico, se encuentran bajas en la mayoría de los sueros de mujeres preeclámpicas¹¹⁻¹⁵. Las concentraciones del IGF-I, uno de los factores estimuladores de la síntesis de VEGF⁴³⁻⁵⁰, están bajas en el suero materno y del cordón umbilical en la PE⁵⁴⁻⁶⁰. La falta de información acerca del efecto del IGF-I sobre la expresión de los RNA mensajeros (RNAm) y de las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células HUVEC y de estudios de asociaciones del IGF-I con el VEGF y el sFlt-1 en el suero el cordón umbilical en la preeclampsia justificó la realización del presente trabajo cuyo objetivo general fue evaluar los efectos reguladores del IGF-I sobre la expresión de los RNAm y las proteínas de VEGF y sFlt-1 en células HUVEC y valorar la asociación del IGF-I con el VEGF en el suero del cordón umbilical en la preeclampsia.

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo en células HUVEC de mujeres NT, mientras que para los correspondientes a las proteínas se contó con cultivos de células obtenidas de los dos grupos de mujeres, NT y PE.

Los resultados de expresión obtenidos en el presente trabajo permitieron observar que la presencia de IGF-I estimula el RNAm de VEGF de manera dependiente de la dosis, alcanzando un máximo a las dosis de 12.5 y de 25.0 ng/mL de IGF-I. Esta observación es congruente con lo observado en estudios previos llevados a cabo en cultivos primarios de células mesangiales de la corteza renal y de células estromales del endometrio porcino^{44,45}. El estímulo observado puede deberse al aumento de la expresión del HIF-1, factor inducible por la hipoxia que estimula la síntesis de VEGF⁶³. Esta sugerencia es factible ya que el IGF-I es considerado como factor estimulador de la síntesis de HIF-1 en células de cáncer de colon, de neuroblastoma y del epitelio pigmentario de la retina⁶⁴⁻⁶⁶. Por lo que toca al

sFlt-1, el tratamiento de las células HUVEC con el IGF-I resultó en el aumento significativo de la expresión de su RNAm. Los datos obtenidos en el presente estudio son los primeros que describen la regulación del sFlt-1 mediada por el IGF-I, el cual puede ejercer su efecto estimulador a través del HIF-1. Esta hipótesis se apoya en resultados previos que demostraron efectos estimuladores de la hipoxia y por *ende* del HIF-1 sobre la síntesis del sFlt-1 en explantes de vellosidades placentarias de rata⁶⁷.

Los resultados de los efectos del IGF-I sobre la concentración de VEGF y sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC obtenidas de los grupos NT y PE son relativos únicamente a la proteína de sFlt-1 ya que el VEGF no fue detectable con el uso de los estuches utilizados. En el grupo NT, el IGF-I estimuló la síntesis de sFlt-1 de forma dependiente de la dosis, con un patrón semejante al observado en el estudio de expresión génica de este receptor soluble, observación que se describe por vez primera en esta tesis. El paralelismo entre expresión del RNAm y proteína, sugiere que el aumento de la concentración de sFlt-1 es el resultado de la mayor traducción de su RNAm. Tal como se sugirió anteriormente, el efecto estimulador del IGF-I puede implicar al HIF-1 como mediador del incremento en este receptor. Interesantemente, en el grupo PE no se observaron cambios significativos en las concentraciones de sFlt-1 en presencia o en ausencia de IGF-I. Cabe mencionar que las concentraciones basales de sFlt-1 fueron significativamente mayores en los medios de cultivo de células obtenidas del grupo PE al compararlas con las del grupo NT. La falta de estímulo del IGF-I en el grupo PE puede deberse a que la síntesis de sFlt-1 estaba en su máximo, lo que explicaría la ausencia de respuesta al IGF-I. Esta hipótesis es probable ya que el aumento de las concentraciones de sFlt-1 en respuesta al IGF-I en el grupo NT nunca fueron mayores a las observadas en el grupo PE.

Con el fin de comprobar si el efecto estimulador del IGF-I sobre la síntesis de sFlt-1 está mediado por el receptor IGF-IR, se realizó un estudio con células NT que fueron tratadas con el PPP (picropodofilina), inhibidor de la fosforilación del IGF-IR y por *ende* de su activación. Los resultados obtenidos mostraron que el PPP, solo o incubado con IGF-I, inhibió significativamente el estímulo inducido por IGF-I. Lo anterior confirma la participación del IGF-IR en la regulación de la síntesis de sFlt-1.

Debido a que durante la recolección de las muestras de cordón umbilical también se podía disponer de las placentas de estas mujeres y que no se pudo

superar la falla experimental para los estudios de expresión génica de células HUVEC de mujeres PE, se decidió como alternativa llevar a cabo el estudio comparativo entre estos dos grupos utilizando homogenados de trofoblasto. En este trabajo se observó que en las placentas PE se presenta una expresión significativamente mayor de sFlt-1, lo que concuerda con lo observado en este estudio acerca de la concentración de sFlt-1 tanto en el suero como en el medio de las células del cordón umbilical de este grupo. En cambio, la expresión del VEGF en los homogenados PE fue significativamente menor, observación similar a la observada con el estudio de la concentración de este factor en el suero del cordón umbilical de mujeres PE. Los resultados obtenidos concuerdan con los informados en estudios previos⁶⁸.

Además del estudio comparativo de expresión de sFlt-1 y VEGF entre los grupos NT y PE, los homogenados permitieron conocer las posibles diferencias de expresión de estos dos factores entre la placenta y células HUVEC. Para este fin se tomó en consideración la tasa relativa de concentración entre el gen de interés y el GAPDH, gen constitutivo. Los resultados obtenidos mostraron que los homogenados del grupo NT expresan 100 veces más sFlt-1 que los cultivos de HUVEC de este mismo grupo. Al analizar la expresión de este gen en el grupo PE se observó que la expresión de sFlt-1 es aún mayor en la placenta, 1000 veces más que en el endotelio. De forma paralela, los homogenados del grupo NT expresaron entre 12 y 15 veces más VEGF que las células HUVEC de este grupo, mientras que aquellos del grupo PE expresan sólo 3 veces más VEGF que el endotelio. En ambos casos, se observa que la placenta es el principal sitio de síntesis de sFlt-1, particularmente en la preeclampsia. Asimismo, este tejido representa la mayor fuente de VEGF, esta vez en embarazos normotensos más que en los preeclámpticos.

Otro de los objetivos fue valorar la concentración del IGF-I, VEGF y sFlt-1 en el suero del cordón umbilical de mujeres NT y PE. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que las concentraciones de IGF-I y de VEGF en el suero del cordón umbilical de mujeres PE están significativamente más bajas con respecto a las del grupo NT, lo que concuerda con los hallazgos obtenidos por otros autores^{27,54,55}. En cambio, las concentraciones de sFlt-1 fueron significativamente mayores en el grupo PE, observación similar a lo encontrado en el cordón umbilical de otros estudios^{20,27}. La baja concentración de VEGF puede representar una de las causas involucradas en el deficiente proceso angiogénico que se observa en la PE,

y la disminución en la concentración de IGF-I puede conllevar a la menor concentración de este potente factor angiogénico que se observó en el presente estudio. El aumento en la concentración del sFlt-1 es otra causa agravante del proceso angiogénico en la PE ya que su interacción con el VEGF impide a este ligando unirse a sus receptores, particularmente al receptor tipo 2 a través del cual el VEGF ejerce su mayor efecto angiogénico¹⁰. Si se considera a la tasa de concentración VEGF/sFlt-1 como factor de biodisponibilidad de VEGF, los resultados del presente trabajo confirman una disminución significativa de la interacción de este factor angiogénico con sus receptores.

En la práctica clínica se opta por la interrupción temprana de la gestación en caso de PE. En cambio, el término de la gestación es más tardío cuando el embarazo cursa con normalidad. Lo anterior limitó en primera instancia parear por edad gestacional los grupos NT y PE, lo que explica que el grupo que cursó con preeclampsia en el presente como en otros estudios tuviera una edad gestacional significativamente menor. Esta variable puede explicar no solamente las diferencias en el peso al nacer sino también en las concentraciones de IGF-I, VEGF y sFlt-1. La baja concentración de IGF-I y el menor peso de los recién nacidos del grupo PE puede explicarse, por lo menos en parte, por la edad gestacional ya que estas dos variables se asociaron significativamente con la edad gestacional. Sin embargo, el peso al nacer del grupo PE no puede explicarse solamente por la edad gestacional ya que la proporción de los recién nacidos con peso por debajo del percentil 10 fue significativamente mayor, 50% en el grupo PE *versus* 7.4% en el grupo NT. Debido a sus efectos mitogénicos, varios estudios indican que el IGF-I es uno de los determinantes del crecimiento fetal³⁹⁻⁴¹, lo que apoya la asociación positiva, observada en el presente y otros trabajos^{53,69,70}, entre las concentraciones de IGF-I en suero del cordón umbilical y el peso de los recién nacidos de ambos grupos estudiados, NT y PE. La síntesis de IGF-I está regulada a la alta por factores nutricios y hormonales^{37,38}. Con respecto a los factores hormonales, las concentraciones del lactógeno placentario no son diferentes y las de la hormona de crecimiento placentaria presentan controversias en la PE, lo que no puede explicar la baja concentración de IGF-I⁷¹⁻⁷⁴. Sin embargo, el reducido flujo uteroplacentario que se observa en este padecimiento y que conlleva al menor suministro de nutrimentos hacia el feto representa uno de los factores responsables de la baja concentración de IGF-I. Como hipótesis del presente trabajo se postuló al IGF-I

como uno de los factores determinantes de la concentración de VEGF. Lo anterior surgió debido a que el IGF-I estimula la síntesis de este factor angiogénico en varios tipos celulares incluyendo a las relacionadas con la gestación, como células epiteliales amnióticas de la placenta, células estromales del endometrio y células endoteliales del cordón umbilical^{43,45,46}. A pesar de que la concentración de ambos factores está baja en el grupo PE, los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron asociaciones significativas entre el IGF-I y el VEGF, lo que no apoya la hipótesis planteada en el presente trabajo y sugiere la participación de otros factores.

En el presente estudio se logró contar con dos subgrupos conformados por 18 mujeres del grupo NT y por 7 mujeres del grupo PE, con edad gestacional similar, lo anterior con el fin de descartar a esta variable como factor influyente sobre los cambios observados entre los embarazos normales y preeclámpticos. Aún con edad gestacional similar, las concentraciones de IGF-I y de VEGF en suero del cordón umbilical del grupo PE fueron significativamente más bajas. Además, las correspondientes al sFlt-1 se mantuvieron significativamente mayores en este grupo. Los recién nacidos del grupo PE presentaron de nuevo bajo peso al nacer. En conjunto, estos hallazgos sugieren alteraciones en las concentraciones de IGF-I, VEGF y sFlt-1 que resultan de la propia enfermedad y no a consecuencia de la edad gestacional. La falta del aumento fisiológico en la concentración de IGF-I ha sido demostrada en mujeres normotensas que posteriormente desarrollaron preeclampsia⁷¹, lo cual sugiere a este factor de crecimiento como indicador temprano del desarrollo de este padecimiento. Por otra parte, el aumento de sFlt-1 fue también considerado como indicador temprano del desarrollo de la PE, ya que su concentración fue significativamente mayor tempranamente, cinco semanas antes de observar los signos clínicos de la enfermedad¹². Esta observación apoya la importancia del sFlt-1 como factor de riesgo del desarrollo de la PE ya que la sobreexpresión de su gen en ratas gestantes resultó en cuadros clínicos semejantes a la preeclampsia tales como hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular¹¹. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que los promedios de las tasas de concentración de VEGF/sFlt-1 entre los grupos, completo y subgrupo, de mujeres PE no fueron significativamente diferentes: 11.7% y 17.3%, respectivamente, lo que sugiere que la biodisponibilidad de VEGF no cambia con la edad gestacional e indica que esta alteración es propia de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

- a) Se demostró que el IGF-I es un factor estimulador de la expresión del RNAm no sólo del VEGF sino también del sFlt-1 en células HUVEC.
- b) El IGF-I estimuló el incremento en la concentración de sFlt-1 en el medio de cultivo de células HUVEC del grupo de mujeres NT.
- c) La concentración basal de sFlt-1 en los medios de cultivo fue significativamente mayor en la preeclampsia.
- d) La preeclampsia se asoció con menor expresión de VEGF y mayor expresión de sFlt-1 en homogenados de placenta.
- e) La PE se caracterizó por presentar baja concentración de IGF-I y de VEGF y alta concentración de sFlt-1 en el suero del cordón umbilical y estas diferencias fueron independientes de la edad gestacional.
- f) El IGF-I no se asoció significativamente con el VEGF en ninguno de los grupos, lo que sugiere que la baja concentración de VEGF no es atribuible a la disminución de la concentración del IGF-I en el suero del cordón umbilical.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cárdenas MT, Nuñez RM. Boletín de práctica médica efectiva: Preeclampsia/Eclampsia. In: Salud INdSPylSd, editor; Julio, 2006.
2. The world health report: 2005: Make every mother and child count. Genova, Suecia: Organización Mundial de la Salud; 2005.
3. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;77(1):67-75.
4. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(1):S1-S22.
5. Serrano NC. Immunology and genetic of preeclampsia. *Clin Dev Immunol* 2006;13(2-4):197-201.
6. Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia--a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol* 2009;82(2):106-111.
7. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 2009;89(4):1177-1215.
8. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007;100(6):782-794.
9. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611.
10. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269(43):26988-26995.
11. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649-658.
12. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350(7):672-683.
13. Yelumalai S, Muniandy S, Zawiah Omar S, Qvist R. Pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: levels of angiogenic factors in malaysian women. *J Clin Biochem Nutr* 2010;47(3):191-197.
14. Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IE, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106(10):1019-1022.
15. Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM. Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(6):1554-1557.
16. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004;95(9):884-891.

17. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998;59(6):1540-1548.
18. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5555-5563.
19. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, Takeda S, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2348-2351.
20. Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Lyberg T, Holthe MR. Circulating concentrations of sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) in fetal and maternal serum during pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;122(1):33-39.
21. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291(4):R1085-1093.
22. Lee ES, Oh MJ, Jung JW, Lim JE, Seol HJ, Lee KJ, Kim HJ. The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2007;22(1):94-98.
23. Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y. Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(7):2672-2679.
24. Khalil A, Muttukrishna S, Harrington K, Jauniaux E. Effect of antihypertensive therapy with alpha methyldopa on levels of angiogenic factors in pregnancies with hypertensive disorders. *PLoS One* 2008;3(7):e2766.
25. Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, Hiramatsu Y. Circulating leptin and angiogenic factors in preeclampsia patients. *Endocr J* 2008;55(3):565-573.
26. Zhou CC, Ahmad S, Mi T, Abbasi S, Xia L, Day MC, Ramin SM, Ahmed A, Kellems RE, Xia Y. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* 2008;51(4):1010-1019.
27. Catarino C, Rebelo I, Belo L, Rocha S, Castro EB, Patricio B, Quintanilha A, Santos-Silva A. Fetal and maternal angiogenic/anti-angiogenic factors in normal and preeclamptic pregnancy. *Growth Factors* 2009;27(6):345-351.
28. Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY, Armstrong DM, Wang W. Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(1):255-259.
29. Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension* 2007;50(6):1142-1147.
30. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, Waugh R, McKenzie P, Kirwan P, Hennessy A. Uteroplacental ischemia results in

- proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int* 2007;71(10):977-984.
31. Lu F, Longo M, Tamayo E, Maner W, Al-Hendy A, Anderson GD, Hankins GD, Saade GR. The effect of over-expression of sFlt-1 on blood pressure and the occurrence of other manifestations of preeclampsia in unrestrained conscious pregnant mice. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(4):396 e391-397; discussion 396 e397.
 32. Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2007;49(2):186-193.
 33. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008;358(11):1129-1136.
 34. Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 2008;15(8):715-738.
 35. Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16(1):3-34.
 36. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978;253(8):2769-2776.
 37. Rotwein P, Bichell DP, Kikuchi K. Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol Reprod Dev* 1993;35(4):358-363; discussion 363-354.
 38. Caufriez A, Frankenne F, Hennen G, Copinschi G. Regulation of maternal insulin-like growth factor I by placental growth hormone in pregnancy. Possible action of maternal IGF-I on fetal growth. *Horm Res* 1994;42(1-2):62-65.
 39. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993;75(1):73-82.
 40. Netchine I, Azzi S, Le Bouc Y, Savage MO. IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(1):181-190.
 41. Arends N, Johnston L, Hokken-Koelega A, van Duijn C, de Ridder M, Savage M, Clark A. Polymorphism in the IGF-I gene: clinical relevance for short children born small for gestational age (SGA). *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2720.
 42. Dupont J, Pierre A, Froment P, Moreau C. The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm Metab Res* 2003;35(11-12):740-750.
 43. Beckert S, Farrahi F, Perveen Ghani Q, Aslam R, Scheuenstuhl H, Coerper S, Konigsrainer A, Hunt TK, Hussain MZ. IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341(1):67-72.
 44. Gruden G, Araf S, Zonca S, Burt D, Thomas S, Gnudi L, Viberti G. IGF-I induces vascular endothelial growth factor in human mesangial cells via a Src-dependent mechanism. *Kidney Int* 2003;63(4):1249-1255.
 45. Kaczmarek MM, Blitek A, Kaminska K, Bodek G, Zygmunt M, Schams D, Ziecik AJ. Assessment of VEGF-receptor system expression in the porcine endometrial stromal cells in response to insulin-like growth factor-I, relaxin, oxytocin and prostaglandin E2. *Mol Cell Endocrinol* 2008;291(1-2):33-41.

46. Kawano Y, Nakamura S, Fukuda J, Miyakawa I. The effect of insulin-like growth factor-I on production of vascular endothelial growth factor by amnion-derived (WISH) cells. *Growth Horm IGF Res* 2004;14(5):376-381.
47. Bermont L, Lamielle F, Fauconnet S, Esumi H, Weisz A, Adessi GL. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;85(1):117-123.
48. Kaneko H, Yu D, Miura M. Overexpression of IGF-I receptor in HeLa cells enhances in vivo radioresponse. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(4):937-941.
49. Powolny AA, Wang S, Carlton PS, Hoot DR, Clinton SK. Interrelationships between dietary restriction, the IGF-I axis, and expression of vascular endothelial growth factor by prostate adenocarcinoma in rats. *Mol Carcinog* 2008;47(6):458-465.
50. Tang X, Zhang Q, Shi S, Yen Y, Li X, Zhang Y, Zhou K, Le AD. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. *Int J Cancer*;126(1):90-103.
51. Jeschke MG, Herndon DN. The combination of IGF-I and KGF cDNA improves dermal and epidermal regeneration by increased VEGF expression and neovascularization. *Gene Ther* 2007;14(16):1235-1242.
52. Economou MA, Wu J, Vasilcanu D, Rosengren L, All-Ericsson C, van der Ploeg I, Menu E, Girnita L, Axelson M, Larsson O, Seregard S, Kvanta A. Inhibition of VEGF secretion and experimental choroidal neovascularization by picropodophyllin (PPP), an inhibitor of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2620-2626.
53. Vatten LJ, Odegard RA, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Relationship of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in umbilical cord plasma to preeclampsia and infant birth weight. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):85-90.
54. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(5):1828-1833.
55. Diaz E, Halhali A, Luna C, Diaz L, Avila E, Larrea F. Newborn birth weight correlates with placental zinc, umbilical insulin-like growth factor I, and leptin levels in preeclampsia. *Arch Med Res* 2002;33(1):40-47.
56. Halhali A, Bourges H, Carrillo A, Garabedian M. Lower circulating insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in preeclampsia. *Rev Invest Clin* 1995;47(4):259-266.
57. Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176(4):751-757; discussion 757-758.
58. Altinkaynak K, Aksoy HH, Bakan E, Kumtepe Y. Serum IGF-I and IGFBP-3 in healthy pregnancies and patients with preeclampsia. *Clin Biochem* 2003;36(3):221-223.

59. Ingec M, Gursoy HG, Yildiz L, Kumtepe Y, Kadanali S. Serum levels of insulin, IGF-1, and IGFBP-1 in pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;84(3):214-219.
60. Kocyigit Y, Bayhan G, Atamer A, Atamer Y. Serum levels of leptin, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in women with pre-eclampsia, and their relationship to insulin resistance. *Gynecol Endocrinol* 2004;18(6):341-348.
61. Gutierrez G, Mendoza C, Zapata E, Montiel A, Reyes E, Montano LF, Lopez-Marure R. Dehydroepiandrosterone inhibits the TNF-alpha-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2007;190(1):90-99.
62. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
63. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 2007;32(8):389-397.
64. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277(41):38205-38211.
65. Beppu K, Nakamura K, Linehan WM, Rapisarda A, Thiele CJ. Topotecan blocks hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression induced by insulin-like growth factor-I in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65(11):4775-4781.
66. Slomiany MG, Rosenzweig SA. Hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent regulation of insulin-like growth factor-1-stimulated vascular endothelial growth factor secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(2):666-675.
67. George EM, Cockrell K, Adair TH, Granger JP. Regulation of sFlt-1 and VEGF secretion by adenosine under hypoxic conditions in rat placental villous explants. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299(6):R1629-1633.
68. Park JS, Baik HW, Lee SK, Na WS, Song YR, Yang YS, Park MH, Hwang IT, Oh KY. Vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) and soluble Flt-1 gene expressions in Korean pre-eclamptic placentas. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36(4):726-732.
69. Zhang P, Liu B, Li G, Wu L, Yu M, Ou Y, Wang L. [A study on the relationship between insulin-like growth factor, insulin-like growth factor-binding protein-3 and fetal growth retardation]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002;37(2):65-68.
70. Karamizadeh Z, Saki S, Kashef S, Saki F. Comparison of umbilical cord and maternal serum levels of IGF-I, leptin and cortisol in appropriate for gestational age and small for gestational age neonates. *Int J Endocrinol Metab* 2008;2:89-94.
71. Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Diaz L, Avila E, Garabedian M, Larrea F. Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90(1-5):553-556.
72. Papadopoulou E, Sifakis S, Giahnakis E, Fragouli Y, Karkavitsas N, Koumantakis E, Kalmanti M. Increased human placental growth hormone at

- midtrimester pregnancies may be an index of intrauterine growth retardation related to preeclampsia. *Growth Horm IGF Res* 2006;16(5-6):290-296.
73. Mittal P, Espinoza J, Hassan S, Kusanovic JP, Edwin SS, Nien JK, Gotsch F, Than NG, Erez O, Mazaki-Tovi S, Romero R. Placental growth hormone is increased in the maternal and fetal serum of patients with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20(9):651-659.
 74. Schiessl B, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Gutt B, Kirk SE, Oberhoffer R, Friese K. Role of placental growth hormone in the alteration of maternal arterial resistance in pregnancy. *J Reprod Med* 2007;52(4):313-316.