



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE
GENES RELACIONADOS CON LA DEFENSA
ANTIOXIDANTE EN UN MODELO DE DISFUNCIÓN
ENDOTELIAL *IN VITRO* RELACIONADO CON
PREECLAMPSIA Y SUPLEMENTADO CON L-
ARGININA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

AARÓN GALINDO VEGA

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. AURORA ESPEJEL NÚÑEZ

ASESOR INTERNO:

M. EN C. RODRIGO A. MATEOS NAVA

Ciudad de México, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

En este pequeño espacio espero poder expresar lo agradecido y afortunado que me siento de contar con todas las personas que forman parte de mi vida, y que cada una ha apoyado con un granito de arena para la culminación de este trabajo.

A mi madre, por siempre ser tan incondicional conmigo, por todos los consejos que siempre me has dado, que aunque no lo creas me han servido de mucho, por ser la única persona que siempre ha creído en mí pese a todas las circunstancias, por siempre inculcarme que debo ser el mejor en lo que sea que haga, siempre alentándome a seguir adelante, por ser siempre un ejemplo de valentía, determinación y coraje a pesar de todo por lo que has pasado, por siempre sacarnos adelante, teniendo que ir a trabajar enferma, cansada, o triste para que nunca nos faltara nada, todo esto no hubiese sido posible de no haberte tenido a mi lado a cada momento, en las buenas en las malas y en las peores, siempre hubo una persona que estuvo ahí, y fuiste tú, gracias por eso y más, pero sobre todo por tu inconmensurable amor hacia mí. Te amo con toda el alma, y siempre te amare. Gracias.

A mi padre, por ser un ejemplo de responsabilidad, por haberme enseñado los valores que debe de representar el ser un hombre, trabajador, honesto, y decente dentro y fuera de casa, por todos esos momentos en familia que siempre vivirán en mi memoria, por eso y más muchas gracias. Te amo papa.

A mi pequeña hermana, la cual a pesar de los corajes que me hiciste pasar, todos quedaban olvidados con los momentos de felicidad que siempre me has dado, creo que hemos aprendido el uno del otro siempre, sé que me apoyas en todo lo que yo decida hacer, y sabes que yo siempre estaré a tu lado, para apoyarte, como tu hermano el hermano mayor que soy, te amo hermana, muchas gracias por ser parte importante de mi vida, espero poder haber sido y seguir siendo un buen ejemplo para ti.

A mis abuelos, con quienes he compartido la mayor parte de mi vida hasta ahora, pero muy especialmente a mi abuela, esa gran mujer que ha sido como una madre más para mí siempre creyendo en mi persona y demostrándome el gran amor que me tiene, demostrándomelo siempre, quien se llena de júbilo con cada uno de mis logros, y siempre gratificándome con una gran sonrisa en su rostro, o con su deliciosos sazón, ha sido uno de los pilares fundamentales de que haya llegado hasta aquí. Y no menos importante mi abuelo, quien desde pequeño sé que se llenó de alegría y orgullo por mi llegada, dejando de lado sus actividades y sin importarle tener que trabajar de madrugada con tal que su nieto conociera todos los parques de los alrededores.

A mi tía Josefina, por no verme sólo como un sobrino más sino tal vez como uno más de sus hijos, siempre preocupándose por mí en todos los aspectos, aconsejándome y regañándome cada vez que me lo merecía, y vaya que me lo merecí en frecuentes ocasiones, has sido todo un ejemplo para mí, siendo una mujer de carácter fuerte, responsable, dedicada, amorosa y siempre con un corazón muy noble, agradezco de que se me haya premiado con familia como la que tengo.

Y en general a todos y cada uno de los miembros de mi familia, quieren de manera directa o indirecta han contribuido en mi formación como persona.

A ti Victoria, porque a pesar de no haber estado en gran parte de esta etapa de mi vida, estuviste ahí conmigo en los momentos más complicados, sombríos y sinuosos, siempre alentándome a continuar, a no darme por vencido, a que no debo pensar en otra cosa que ser el mejor. Espero sigamos compartiendo más vivencias como estas por un largo tiempo. En verdad muchas gracias.

A uno de los mejores amigos que he tenido el gusto de conocer a lo largo de mi vida, Manuel, Manolo o tu tan agraciado apodo, “el frijol” como también se te llevo a conocer, gracias, que a pesar de todas las traiciones a manos tuyas de las que llegue a ser víctima, eres el único con el que estuve desde que dio inicio esta travesía, desde el propedéutico, hasta ahora la maestría que estamos por iniciar.

A mis incomparables amigos, mis compañeros de “reta”, y de la facultad, Manuel, Jesús, Ovando, Aquino, Cesar, Pablo, Gio, Diego, Alaín, y los que me falten, con quienes he compartido muchos inolvidables, he reído hasta llorar y con quienes se que cuando más los necesite, siempre contare con ustedes.

A todos mis compañeros del laboratorio de biomedicina molecular, quiero excluir a nadie, pero si hacer una mención especial para Sandy, Karina, Eduardo, David, Karen, la Sra. Flor y Daniel, gracias por haberme acompañado en la realización de este trabajo, todos han contribuido para bien.

A mi directora de tesis, la M. en C. Aurora Espejel Núñez, gracias infinitas por haberse atrevido a aceptarme como alumno (sin saber lo que le esperaba), por transmitirme de manera muy atinada el gran conocimiento que posee, por no solo preocuparse por mí en el ámbito académico sino de manera personal, de usted no sólo aprendí a trabajar en el laboratorio, sino a ser mejor como persona también, se ha ganado mi respeto y lealtad incondicionales, y mi eterna admiración no sólo como investigadora sino como persona, pero sobre todo me gustaría agradecer la paciencia que ha tenido conmigo, y que espero la pueda seguir teniendo otros dos años más

A mi asesor de tesis, el M. en C. Rodrigo A. Mateos Nava, gracias por sus aportaciones que hicieron aún más nutritivo el trabajo.

De manera muy especial me gustaría agradecerle a alguien que no sólo veo como un compañero de laboratorio, sino como un gran gran amigo, el M. en C. Arturo Flores Pliego, quien sin ser alumno suyo me arropo como si lo fuera, transmitiéndome su sabiduría y sus siempre acertados comentarios, los cuales enriquecieron en gran medida mi trabajo, ha sido alguien quien se ha preocupado por mí siempre, y que me ha enseñado el verdadero significado de la amistad, por eso y más gracias.

De igual manera me gustaría agradecer a la Dra. Guadalupe Estrada Gutiérrez por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y brindarme las facilidades para desempeñarme.

Índice

1. Resúmen	6
2. Introducción.....	7
2.1. Preeclampsia.....	7
2.2. Patogénesis de la preeclampsia	8
2.3. Participación del sistema inmune en el desarrollo de la preeclampsia	10
2.4. Participación de los neutrófilos en la preeclampsia	11
2.5. Función/Disfunción endotelial en preeclampsia.....	12
2.6. Estrés oxidativo	14
2.7. Especies reactivas del oxígeno durante la gestación	15
2.8. Especies reactivas del nitrógeno.....	16
2.9. Las Óxido Nítrico Sintetasas (NOS)	16
3. Antecedentes.....	17
3.1. El estrés oxidativo y preeclampsia.....	17
3.2. Mecanismos de defensa antioxidante.....	17
3.3. L-Arginina.....	19
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. Objetivo General	23
6.2. Objetivos Particulares	23
7. Material y Métodos	24
7.1.1 Criterios de Inclusión.....	24
7.1.2. Cultivo primario de células HUVEC	25
7.1.3. Inmunocitoquímica	25
7.1.4. Citometría de flujo	26
7.1.5. Obtención de neutrófilos a partir de sangre de circulación periférica.....	26
7.1.6. Activación de neutrófilos	27
7.1.7. Modelo de disfunción endotelial <i>in vitro</i>	27
7.1.8. Extracción de RNA total a partir de cultivos primarios de células HUVEC	27
7.1.9. Análisis de la integridad del RNA.....	27

7.2.1. Análisis de la expresión de genes participantes en la respuesta a estrés oxidativo y defensa antioxidante.....	28
7.2.2. Agrupación funcional de los genes	28
7.2.3 Cuantificación de la glutamato cisteín ligasa subunidad catalítica (GCLC) mediante ELISA.....	29
7.2.4 Cuantificación de peroxirredoxina 3 (PRDX 3) mediante ELISA.....	29
8. RESULTADOS.....	30
8.1. Estandarización y caracterización del cultivo de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC).....	30
8.2. Estandarización del Modelo de disfunción endotelial	32
8.2.1. Aislamiento y activación de neutrófilos.....	32
8.3. Análisis de la integridad del RNA	34
8.4. Microarreglos de expresión	36
8.5 Validación de los genes con mayor expresión diferencial.....	39
9. Discusión	43
10. Conclusiones	46
11. Apéndice de técnicas.....	47
11.1. Apéndice 1	47
11.2. Apéndice 2	48
11.3. Apéndice 3	48
11.4. Apéndice 4	49
11.5. Apéndice 5	50
11.6. Apéndice 6	52
11.7. Apéndice 7	53
12. Referencias.....	54

1. Resumen

La preeclampsia es un síndrome específico del embarazo humano y uno de las principales causas de morbi-mortalidad materna y fetal. Sin embargo su etiología no es muy clara y aunque se han propuesto diversas teorías, su origen aún se desconoce, se caracteriza principalmente por el desarrollo de hipertensión sanguínea ($\geq 140/90$ mmHg) y proteinuria en orina (mayor a los 300 mg/día) diagnosticados después de las 20 semanas de gestación. En México se ha reportado una incidencia del 8 al 12%. Las posibles terapias para la prevención de la enfermedad que han sido exploradas muestran resultados controversiales, sin embargo, recientemente, los efectos de la suplementación con L-arginina en la prevención de preeclampsia en mujeres de alto riesgo han dado resultados prometedores. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante en un modelo de disfunción endotelial in vitro relacionado con preeclampsia y suplementado con L-arginina. **Material y Método.** Los cordones umbilicales fueron provenientes de mujeres clínicamente sanas, con resolución de su embarazo en el Instituto Nacional de Perinatología, además de la previa firma de la carta de consentimiento informado. Se realizaron cultivos primarios de células HUVEC, además de la obtención y activación de neutrófilos provenientes de la sangre periférica de una mujer donante no embarazada, sana y sin procesos inflamatorios aparentes. Posterior al estímulo con los neutrófilos activados, se procedió al análisis de las muestras mediante microarreglos de expresión pRT-PCR (RT2 Profiler PCR Array Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense, Sabiosciences QIAGEN, PAHS-065) mismo que analiza la expresión de 84 genes. Las diferencias en expresión fueron calculadas utilizando el software comercial RT2 Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 el cual se basa en el método de $\Delta\Delta C_t$. **Resultados.** Cerca de un 99% de células fueron identificadas como endoteliales en los cultivos, mediante tinción con un anticuerpo Von-Willebrand. De los 84 genes analizados, 15 se vieron significativamente sub-expresados una vez sometidos al estímulo con los neutrófilos activados. Curiosamente, 14 de estos 15 genes se vieron sobre-expresados en los cultivos una vez que fueron suplementados con L-arginina. De estos, los que presentan una expresión diferencial más significativa son GCLC, PRDX3, DHCR24, GSR y TXNDR2. **Conclusiones.** La suplementación con L-arginina en nuestros modelos de disfunción endotelial, promueve la sobre-expresión de importantes genes relacionados con la respuesta antioxidante, brindándonos una idea de los posibles mecanismos o vías de acción de este aminoácido en el tratamiento de esta patología.

2. Introducción

2.1. Preeclampsia

Los trastornos hipertensivos durante la gestación son la primera complicación médica en muchos países del mundo, debido a los efectos adversos de la presión arterial alta que van desde leves a graves, siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad materna, fetal y neonatal. De acuerdo a la severidad con que se presente puede llegar a causar daño a los riñones y otros órganos de la madre, bajo peso al nacer parto prematuro y muerte fetal. En los casos más graves, la madre desarrolla preeclampsia, que pone en peligro la vida de ambos (Wu et al., 2004). En México según el reporte de la Dirección General de Epidemiología de la semana epidemiológica 52 del 2015 el porcentaje de muertes maternas relacionada a problemas hipertensivos, proteinuria y edema en el embarazo, parto y puerperio, asciende al 20.6%. (Boletín 52-2015 subsecretaría de prevención y promoción de la salud Dirección General de Epidemiología).

Dentro de las enfermedades hipertensivas asociadas al embarazo, la más severa es la preeclampsia, síndrome específico del embarazo humano y una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y fetal. Se estima que afecta entre el 2 y el 8% de los embarazos alrededor del mundo (Duley, 2009) principalmente en países en vías de desarrollo. En México se ha reportado que ocurre con una frecuencia del 8 al 12 % (Anttila et al., 1995) y específicamente en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" la incidencia reportada durante los años 2008, 2009 y 2010 fue de 5.8 % (Perinatología, 2008).

Su etiología no es muy clara y aunque se han propuesto diversas teorías (Figura 1), su origen aún se desconoce (Townsend, 2007), se caracteriza principalmente por el desarrollo de hipertensión sanguínea (140/90 mmHg) y proteinuria en orina (mayor a 300 mg/día) diagnosticados después de las 20 semanas de gestación, etapa en la que aparecen los síntomas clínicos de la enfermedad (Brennan et al., 2014).

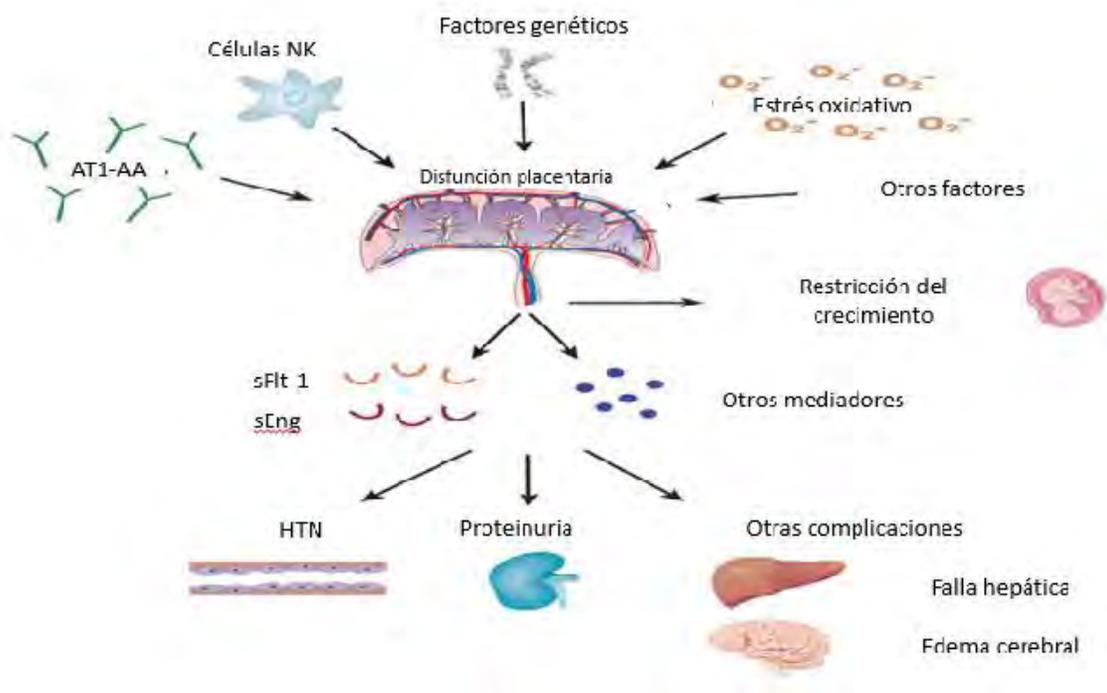


Figura 1. Modelo acerca de las diferentes teorías en cuanto a la etiología de la preeclampsia, además de mostrar los diferentes órganos involucrados en dicha patología. Modificado de (Karumanchi and Epstein, 2007).

2.2. Patogénesis de la preeclampsia

A pesar de los avances y esfuerzos para comprender su etiopatogénesis, la fisiopatología que dispara la enfermedad aún se desconoce. El diagnóstico clínico se basa primordialmente en la detección de inicio de hipertensión con una presión sistólica >140 mmHg o presión diastólica >90 mmHg medido en 2 ocasiones en un período de 4 horas y proteinuria >0.3 g en orina de 24 horas. Sin embargo, en ausencia de proteinuria significativa, la hipertensión en presencia de cualquier síntoma de daño a órganos como falla de la función hepática, trombocitopenia, insuficiencia renal, edema pulmonar o trastornos cerebrales, es suficiente para hacer el diagnóstico de preeclampsia (Sibai, 2003).

Las manifestaciones clínicas pueden aparecer antes o durante el embarazo o incluso posterior al parto. Sin embargo, se sabe que existe un problema vascular específico del embarazo donde los factores anti-angiogénicos, la inflamación sistemática y el estrés oxidante tienen una importante participación sin llegar a ser los principales eventos para su desarrollo.

Diferentes autores han sugerido que la preeclampsia surge en dos etapas distintas (Hayes and Strange, 1995). La primera etapa involucra una deficiente invasión trofoblástica durante la placentación. En circunstancias normales las células del sincitiotrofoblasto invaden el endotelio para remodelar la pared vascular induciendo vasodilatación (Figura 2), de esta manera aseguran del aporte nutricional que la irrigación sanguínea aporta a la placenta por las arterias espirales; sin embargo, en pacientes con preeclampsia, este evento no se presenta de forma adecuada (Hayes and Pulford, 1995), dando como resultado una vasoconstricción que dificulta la capacidad de transportar la sangre hacia la placenta, y generando así un estado de isquemia y con ello el deficiente aporte de nutrientes al feto, necesario para su crecimiento fetal (Griffith, 1999). La segunda etapa inicia a partir de la semana 20 de gestación, etapa en la que se detectan las características clínicas de la preeclampsia, en donde se ha descrito que existe una infiltración de leucocitos al endotelio vascular, provocando el daño endotelial documentado durante esta etapa (Griffith and Mulcahy, 1999).

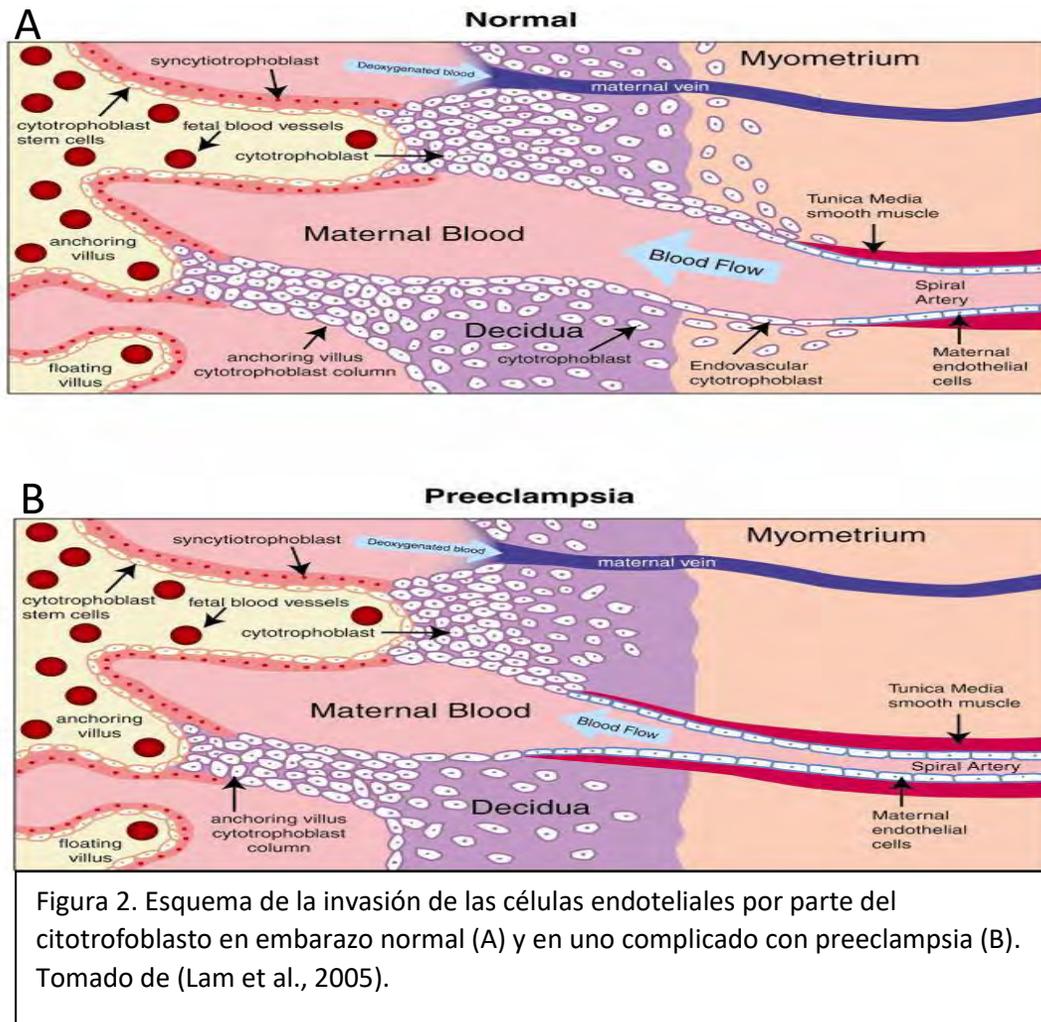


Figura 2. Esquema de la invasión de las células endoteliales por parte del citotrofoblasto en embarazo normal (A) y en uno complicado con preeclampsia (B). Tomado de (Lam et al., 2005).

La disfunción endotelial es caracterizada por una respuesta vasodilatadora anormal a estímulos específicos como la acetilcolina dando como resultado la disminución en los niveles de óxido nítrico, aumento de especies reactivas de oxígeno, peroxidación de lípidos, incremento en citocinas pro-inflamatorias y proteína C reactiva, un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y una baja producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la caderina vascular endotelial (E-Caderina). Dicho fenómeno que se observa en las mujeres con preeclampsia se ha atribuido clásicamente a factores presentes en el plasma (Griffith, 1999, Lu, 2009). Se postula que el daño endotelial, es el responsable de la aparición de los síntomas clínicos como hipertensión, caracterizada por vasoconstricción periférica y disminución de la conformación arterial (Laresgoiti-Servitje et al., 2010) y proteinuria (Redman and Sargent, 2010). Tanto la hipertensión como la proteinuria, involucran al endotelio como el blanco de la enfermedad.

El riesgo mayor de una mujer diagnosticada con preeclampsia es que dicho diagnóstico evolucione a eclampsia y con ello se presenten incidentes cerebrovasculares, así como daño a órganos vitales por mal funcionamiento del hígado y del riñón, fallas en el sistema de coagulación, síndrome de hemólisis, elevación de enzimas de función hepática en periferia y disminución en el número de plaquetas (síndrome de HELLP), síndrome de dificultad respiratoria durante el embarazo, entre otras. Estas manifestaciones están asociadas con el alto índice de mortalidad y morbilidad (Smith et al., 2001, Bellamy et al., 2007, Christopher Cutler and Scott-Dupree, 2014). Después de un embarazo preeclamptico, se estima que alrededor del 20% de esas mujeres desarrollarán alguna enfermedad cardiovascular dentro de los primeros 7 años posteriores al diagnóstico (Nisell et al., 1995).

2.3. Participación del sistema inmune en el desarrollo de la preeclampsia

Se han propuesto diversas hipótesis para tratar de explicar la invasión trofoblástica anormal temprana en el embarazo asociada con dicha patología, la mayoría de ellas sugiere que la falla en la fase de invasión trofoblástica puede estar afectada debido a una respuesta inmune materna alterada o un desarrollo defectuoso de la tolerancia materna al feto semialogénico, ya que en un embarazo fisiológico (el cual se da en condiciones normales) es esencial que el sistema inmune materno tolere el feto y al mismo tiempo, proteja a la madre contra infecciones (Redman and Sargent, 2010).

Este comportamiento aparentemente contradictorio del sistema inmune ha sido estudiado por diversos autores. Se sabe que durante el embarazo fisiológico, el nivel de los biomarcadores de inflamación sistémica se encuentran incrementados en comparación con los de mujeres no embarazadas, por lo que tal incremento es muy evidente en los embarazos complicados con preeclampsia (Calleja-Agius et al., 2012). Existe evidencia

epidemiológica que refuerza la idea del importante papel que juega el sistema inmunológico materno en la patogénesis de la enfermedad (Perez-Sepulveda et al., 2014).

Se ha descrito que durante la preeclampsia existe una activación excesiva de neutrófilos y monocitos en los pacientes que padecen la enfermedad (los de circulación periférica y los que infiltran la decidua) (Laresgoiti-Servitje, 2013), y que estos monocitos activos secretan cantidades elevadas de citocinas pro-inflamatorias tales como Interleucina 1-beta (IL-1b), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-8 (IL-8) (Weiss et al., 2009). Otro grupo de células involucradas son los linfocitos-T CD4⁺ y CD8⁺ que junto con las células “natural killer” (NK) y las células dendríticas (DCs) se ha documentado responden de manera diferente en las mujeres con diagnóstico de esta complicación comparado con las que cursan embarazos fisiológicos, tendiendo una respuesta pro-inflamatoria, (Laresgoiti-Servitje et al., 2010).

2.4. Participación de los neutrófilos en la preeclampsia

Otro tipo de células sanguíneas que recientemente han sido relacionadas con la patogénesis de la preeclampsia y que se les ha puesto poca atención son los neutrófilos. Estas son células polimorfonucleares (PMNs) el tipo de leucocitos celulares más abundante en la circulación periférica. Se caracterizan por presentar una estructura nuclear lobulada única y el citoplasma altamente granulado. Los PMNs tienen una gran importancia para combatir las infecciones ya sea por fagocitosis o por la liberación de gránulos antibacteriales (Nathan, 2006).

En las mujeres que padecen preeclampsia, los neutrófilos han sido asociados con la disfunción vascular debido a la presencia de estas células activadas tanto en sangre de circulación periférica como en la decidua materna (Greer et al., 1989, Greer et al., 1991). La adherencia que generan, así como la liberación de elastasa, postulan a estas células como principales inductores del daño vascular (Butterworth et al., 1991). El incremento en la expresión de Interleucina-8 (IL-8) y de moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) en los vasos sanguíneos de las mujeres preeclámpicas contribuye con la infiltración de los neutrófilos en la vasculatura sistémica materna (Cadden and Walsh, 2008), este aumento puede ser debido a la activación de los neutrófilos como resultado de la exposición a condiciones hipóxicas e inflamatorias (Barden et al., 2001).

Posteriormente, la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales está ligado con la elevación de la expresión de moléculas de diferenciación celular-11b (CD11b), a su vez puede ser originada por la sobreproducción de superóxidos (compuestos binarios que contienen el grupo o anión superóxido) y peróxidos de hidrógeno (Tsukimori et al., 2008). Por otro lado, los oxidantes generados por la NADPH (la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) oxidasa de los neutrófilos activados puede reaccionar con diferentes blancos para formar metabolitos tóxicos que son productos de la peroxidación lipídica, tal como el 4-Hidroxinonal, el cual contribuye a la muerte microbiana y al daño inducido por los neutrófilos (Quinn et al., 1995).

La peroxidación lipídica se eleva antes y después del parto en las mujeres con preeclampsia, sugiriendo que esas pacientes se encuentran bajo estrés oxidante persistente lo que contribuye a la respuesta inflamatoria (Barden et al., 2001). Los neutrófilos también pueden ser acarreadores de estrés oxidante desde la placenta hasta el entorno vascular materno (Leik and Walsh, 2004). Las micropartículas sincitiotrofoblasticas placentarias, tal como las STBMs, pueden actuar como agentes inflamatorios, como en la preeclampsia, la liberación de STBMs puede activar a los neutrófilos y promover la formación de las trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs) (Gupta et al., 2005). Las NETs son estructuras extracelulares compuestas de cromatina y proteínas granulares liberadas durante el proceso de muerte, que se produce tras la estimulación de los neutrófilos. En este proceso, la eucromatina y la heterocromatina se encuentran homogenizadas, las membranas nuclear y granular se desintegran, y todos esos componentes se combinan para crear la NET. La NET es liberada cuando la membrana celular se rompe; esta entonces se une a los microorganismos y los elimina (Fuchs et al., 2007).

Además del estrés oxidativo inducido por la inflamación y disfunción endotelial, las pacientes también presentan aumento en los niveles de la mieloperoxidasa (MPO). Esta enzima es producida por los monocitos y neutrófilos activados y puede contribuir con el daño oxidativo y placentario y la disfunción de las células endoteliales reportada en estas pacientes (Gandley et al., 2008).

2.5. Función/Disfunción endotelial en preeclampsia

El lumen de todos los vasos sanguíneos saludables está delimitado por el endotelio vascular, una monocapa de células que constituyen la interfase entre oxígeno, nutrientes, células circulantes y una variedad de factores llevados dentro del torrente circulatorio y todos los tejidos y órganos del cuerpo. Como tal, el endotelio es el primer órgano que queda expuesto a la afectación por factores exógenos y a la función de las células endoteliales alteradas o activación de las células endoteliales, todo esto es reconocido como el evento inicial de muchas enfermedades cardiovasculares (Forstermann and Munzel, 2006).

El endotelio vascular es una barrera física y metabólica capaz de regular el transporte capilar, controlar el contenido de lípidos del plasma, el tono vascular, la defensa del huésped, la inflamación y participar en procesos de homeostasis (Ha et al., 2016).

Una interacción entre las células endoteliales y las células del músculo liso es fundamental para la regulación del tono vascular (Luscher, 1990).

El endotelio detecta los cambios en la circulación y regula el tono vascular de una manera paracrina. Este tejido libera potentes vasodilatadores tal como el óxido nítrico, prostaciclina, y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Luscher, 1990).

Se conoce que el curso de un embarazo fisiológico incluye variaciones hemodinámicas, tales como la frecuencia y el gasto cardíaco, en el cual la placenta permite el intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el feto (Myatt, 2010). Esta interfase materno-fetal se desarrolla durante el primer trimestre de gestación, a partir de la etapa de invasión trofoblástica hacia la decidua materna. Durante esta fase, las arterias espirales de la decidua sufren un proceso de remodelación en donde estas evolucionan de vasos de baja capacidad y alta resistencia en vasos de alta capacidad y baja resistencia. La remodelación de las arterias espirales es necesaria para el acceso del suplemento de sangre materna (Lyall et al., 2013).

Sin embargo, durante la preeclampsia existen una serie de anormalidades que inician desde el período de invasión del trofoblasto fetal hacia las arterias uterinas, provocando una remodelación reducida de las arterias espirales maternas y con ello la disminución en el flujo sanguíneo de la placenta y un pobre desarrollo placentario causado por la invasión trofoblástica superficial (Verlohren et al., 2010) mismo que se asocia con el establecimiento de la preeclampsia y como consecuencia la presencia de disfunción endotelio-vascular generalizada (Saito and Nakashima, 2014). La perfusión placentaria reducida vista bajo estas circunstancias genera cambios en el ambiente placentario en donde las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de las células endoteliales a través de diferentes mecanismos, resultan también en disfunción endotelial. Así mismo, se genera un flujo sanguíneo intermitente, resultando en periodos de isquemia/reperfusión, creando un ambiente hipóxico lo que favorece el estrés oxidativo con el consecuente daño oxidativo e inflamación (Myatt and Webster, 2009).

La disfunción endotelial se caracteriza por una respuesta vasoconstrictora anormal a estímulos específicos como son a la acetilcolina y la disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO), el aumento de especies reactivas de oxígeno, la peroxidación de lípidos, las citocinas pro-inflamatorias y proteína C reactiva, además de un significativo incremento en la expresión de moléculas de adhesión y decremento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la cadherina vascular endotelial (caderina-VE). Con base en lo anterior se postula que la disfunción endotelial que se observa en las mujeres con preeclampsia es responsabilidad de algunos factores presentes en el plasma (Anderson et al., 2012, Kuc et al., 2011).

Uno de los mecanismos de la disfunción endotelial involucra la liberación del factor soluble de la tirosina cinasa-1, (sFlt-1) una proteína anti-angiogénica y un inhibidor endógeno del VEGF (Figura 3), que trabaja en el mejoramiento de este fenómeno ya establecido debido al estrés oxidante, y al daño por las ERO (Murphy et al., 2013). VEGF es clave en el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y en el mantenimiento y salud de las células endoteliales. Se ha descrito que los niveles de sFlt-1 se encuentran incrementados en la preeclampsia. Los altos niveles del inhibidor de VEGF, ocasiona una disrupción sobre VEGF debido a que se une al receptor Flt-1 de las células endoteliales, el

cual se encuentra sobre las membranas. sFlt-1 es una forma trunca del receptor Flt-1. Cuando se libera sFlt-1 este antagoniza a VEGF y al factor de crecimiento placentario (PIGF), promoviendo así la disfunción endotelial. Hay estudios en los que se ha visto que tanto PIGF como VEGF están suprimidos en la preeclampsia debido a sFlt-1 (Murphy et al., 2013).

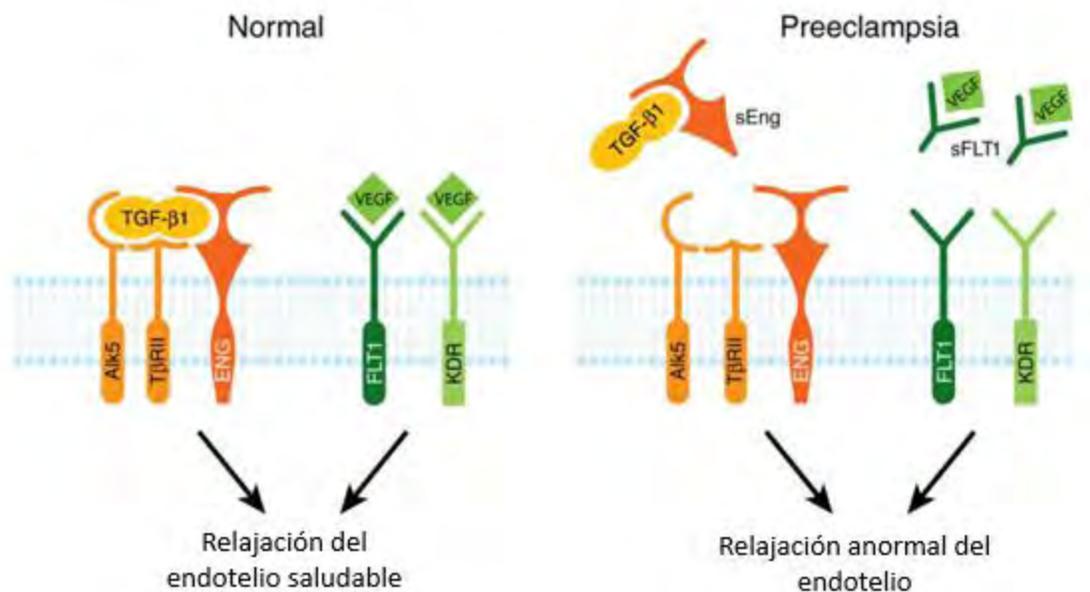


Figura 3. Modelo de inhibición de VEGF por sFlt-1, provocando una disfunción endotelial generalizada, modificada de (Karumanchi and Epstein, 2007)

2.6. Estrés oxidativo

Durante el periodo de gestación se da la producción de estrés oxidante, el cual es necesario para el crecimiento embrionario y fetal (Dennerly, 2010). Sin embargo se le ha implicado también en la fisiopatología de muchas complicaciones reproductivas, incluyendo la infertilidad, aborto involuntario, la preeclampsia, restricción del crecimiento fetal y parto pretérmino (Webster et al., 2008).

El aumento en las concentraciones de en el organismo debidas al desbalance entre la formación de las sustancias oxidativas y los antioxidantes puede llegar a causar daño estructural y funcional al DNA celular, proteínas y membranas celulares (Tjoa et al., 2006, Valko et al., 2007).

En este contexto los antioxidantes protegen a las células de las reacciones de peroxidación, limitando el daño celular y ayudando a mantener la integridad de la

membrana celular. Se han documentado evidencias de que la suplementación con antioxidantes (en su mayoría las vitaminas C y E) proveen protección celular contra el estrés oxidativo o revierten algunos procesos de enfermedad, abriendo así un gran potencial para el uso de terapias antioxidantes que ayuden a mejorar o prevenir enfermedades.

2.7. Especies reactivas del oxígeno durante la gestación

Las ERO son generadas durante los procesos cruciales del consumo de oxígeno (O_2) (Fujii et al., 2005). Estos consisten de intermediarios de radicales libres y no libres, siendo los primeros los más reactivos. Esta reactividad surge debido a que presentan uno o más electrones desapareados en el último nivel electrónico del átomo. Aunado a esto, los procesos biológicos que son dependientes de O_2 y N_2 han ido ganando una mayor importancia, esto debido a que sus productos finales en general son encontrados en estados de alta demanda metabólica, tales como procesos patológicos o interacciones ambientales externas (Burton and Jauniaux, 2011).

Las ERO, como el NO, el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y los peroxinitritos ($ONOO^-$), son moléculas que regulan muchas funciones fisiológicas en los humanos (Kalyanaraman, 2013). La señalización de las ERO está directamente controlada por las defensas antioxidantes del hospedero que inhiben las acciones de dichas especies. Durante el proceso de gestación fisiológica, se sabe que incrementa la generación de ERO, ya que es necesaria para su adecuada fisiología (Yang et al., 2012). Sin embargo una historia completamente diferente ocurre cuando el balance entre nuestras defensas antioxidantes y las especies pro-oxidantes se rompe, tal y como sucede en la preeclampsia.

El proceso en el cual las especies pro-oxidantes como las ERO se encuentran mucho más elevadas que las defensas antioxidantes, es conocido como estrés oxidativo (Kalyanaraman, 2013). Además, el estrés nitrosativo también ha sido documentado en la preeclampsia, éste se debe a la modificación covalente y a la nitrosilación de las proteínas y el DNA por peroxinitritos. Este suceso se da en la placenta preeclamptica por la liberación de ERO, tal como el superóxido, el cual interactúa con el óxido nítrico (NO) para formar peroxinitritos (Myatt, 2010).

El estrés oxidativo se ha propuesto como uno de los factores humorales clave generados por la defectuosa perfusión placentaria (Roberts and Hubel, 1999). Ya que puede inducir la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio así como la liberación de diferentes citocinas y factores anti-angiogénicos. La adhesión de células sanguíneas y endoteliales es crítico en el proceso inflamatorio involucrado en la patogénesis de la preeclampsia. Como consecuencia de la inflamación, una vasoconstricción generalizada y el incremento de la resistencia en la circulación placentaria pueden ser causadas por la reducción del flujo sanguíneo útero-placentario seguido por disfunción placentaria (Harrington et al., 1997).

2.8. Especies reactivas del nitrógeno

Las especies reactivas del nitrógeno (ERN) incluyen al óxido nítrico (NO) y al dióxido nítrico, además de las especies no reactivas tal como los peroxinitritos (ONOO^-), y nitrosaminas (Rosselli et al., 1998). En los mamíferos, las ERN se derivan principalmente del NO, el cual se forma a partir de O_2 y L-arginina y su reacción con el anión superóxido, lo cual forma peroxinitritos (Burton and Jauniaux, 2011). Los peroxinitritos tienen la capacidad de inducir peroxidación lipídica y nitrosilación de abundantes moléculas de tirosina, las cuales, normalmente cumplen la función como mediadores en la función enzimática y la transducción de señales (Rosselli et al., 1998).

El NO, es un radical libre con propiedades vasodilatadoras además de ser una importante molécula de señalización celular involucrada en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos. A pesar de que los efectos vasodilatadores del NO pueden ser terapéuticos, la producción excesiva de ERN podrían afectar la estructura y función de las proteínas, lo cual, podría originar cambios en la actividad de catálisis enzimática, alterar la organización del citoesqueleto, además de comprometer la transducción de señales (Fujii et al., 2005, Chandra et al., 2009). En ausencia de L-arginina (Rosselli et al., 1998) y en un ambiente donde persiste un estado antioxidante deficiente (Visioli and Hagen, 2011), la producción de anión superóxido se ve incrementada. Este aumento en los niveles de anión SO promueve la reacción entre este mismo y el NO para así generar peroxinitritos, mismos que exacerban la citotoxicidad. En la literatura se ha reportado que, la biodisponibilidad comprometida de NO es un factor clave que lleva a la interrupción de la función vascular, lo cual ha sido relacionado con estados infértiles (Visioli and Hagen, 2011). Esto significa que, la supervivencia celular es íntimamente dependiente de los niveles fisiológicos de NO (Agarwal et al., 2005).

Dentro de la célula, las funciones del NO son dependientes de sus niveles, el estado redox de la célula, y la cantidad de metales, proteínas y tioles, entre otros factores. Ya que los efectos del NO son dependientes de su concentración, el Monofosfato de Guanosina cíclico (cGMP) se piensa que media la transducción de señales asociada con el NO como un segundo mensajero a bajas concentraciones de NO ($<1\mu\text{M}$) (Rosselli et al., 1998, Hanafy et al., 2001).

2.9. Las Óxido Nítrico Sintetasas (NOS)

El sistema de enzimas de las óxido nítrico sintetasas (NOS) catalizan la formación de NO a partir de O_2 y L-arginina utilizando NADPH como donador de electrones (Ignarro, 2002) y estas comprenden las siguientes isoformas: óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS o NOS I), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS o NOS II), y la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS o NOS III). Por lo general el NO producido por eNOS y nNOS parece que regula las funciones fisiológicas, mientras que la producción de NO por iNOS es más activa en situaciones fisiopatológicas. La isoforma nNOS funciona como un neurotransmisor e iNOS es expresada principalmente por macrófagos después de ser estimulados por citocinas. La

actividad de eNOS se ve aumentada en respuesta a un incremento de la hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Fujii et al., 2005).

La modulación de la actividad de eNOS por el aumento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), el cual puede aparecer de forma aguda en respuesta a agonistas, incluyendo el estradiol (Goetz et al., 1999) y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) (Papapetropoulos et al., 1997). Sin embargo la continua entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática se traduce en mayores $[Ca^{2+}]_i$, esto se conoce como entrada capacitiva de calcio (ECC), y esta es esencial para mantener la actividad de eNOS (Lin et al., 2000) y regular el tono vascular. En condiciones normales a largo plazo tal como un embarazo saludable, la vasodilatación es particularmente importante en las vasos sanguíneos uterinos (Sladek et al., 1997, Bird et al., 2003).

3. Antecedentes

3.1. El estrés oxidativo y preeclampsia

En la preeclampsia, la evidencia de estrés oxidativo se puede observar tanto en el torrente de circulación materna como en la placenta. Las placentas de mujeres con preeclampsia tienen una capacidad antioxidante reducida en comparación con las de embarazos fisiológicos. Además, las concentraciones de antioxidantes en la sangre de mujeres con preeclampsia se ha demostrado que son reducidos, así como las modificaciones oxidativas de proteínas y lipoproteínas (Hubel, 1999, Rajmakers et al., 2004).

El trofoblasto placentario y las células endoteliales constituyen una barrera placentaria, la cual separa eficazmente la circulación materna y fetal. El estrés oxidante es capaz de actuar en contra de esta barrera dañándola y por consecuencia existe una liberación de factores derivados de la placenta y el feto dentro del torrente circulatorio materno. En la segunda fase de la enfermedad la filtración de residuos placentarios puede ocasionar daño al endotelio materno, estrés oxidante elevado, e inflamación sistémica. Una causa adicional a la inflamación y daño vascular es la liberación de micropartículas de la placenta, inducida por anomalías placentarias e isquemia útero-placentaria. El contenido de esas micropartículas, tal como lo es la hemoglobina libre (Hb) y miRNA pueden además agravar el estrés oxidante sistémico (Tannetta et al., 2013, Cronqvist et al., 2014, Rudov et al., 2014).

3.2. Mecanismos de defensa antioxidante

Los antioxidantes son moléculas que detoxifica los excesos de ERO, lo cual ayuda al mantenimiento del delicado balance del cuerpo entre oxidante/antioxidante. Para esto existen dos tipos: los enzimáticos y no enzimáticos (Agarwal et al., 2012).

Antioxidantes enzimáticos

Estos poseen un centro metálico, que les provee la capacidad de tomar diferentes valencias, ya que estos transfieren electrones para balancear moléculas en los procesos de detoxificación. Estos neutralizan el exceso de ERO y previenen el daño a las estructuras celulares. Las enzimas antioxidantes endógenas incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión oxidasa. La dismutación del anión SO a H_2O_2 por la SOD es fundamental para las reacciones anti-oxidativas. La enzima SOD se le puede encontrar como 3 isoenzimas (Fujii et al., 2005): SOD 1, SOD 2 y SOD 3. SOD 1 contiene Cu y Zinc (Zn) como cofactores metálicos y está localizada en el citoplasma. SOD 2 es una isoforma mitocondrial que contiene manganeso (Mn), y SOD 3 codifica para una forma extracelular. SOD 3 es similar estructuralmente a SOD 1, ya que al igual que esta contiene Cu y Zn como cofactores metálicos (Agarwal et al., 2012).

Dentro de la familia de enzimas glutatión (GSH) se encuentran GST y GSH reductasa. GPx utiliza la forma reducida de GSH como un donador de H^+ para degradar peróxidos. La disminución de GSH se ve traducido en daño a DNA y en el incremento de las concentraciones de H_2O_2 ; es por esto que, GSH resulta ser un antioxidante esencial. Durante la reducción de H_2O_2 a H_2O y O_2 , GSH es oxidado a GSSG por la GPx (Perkins, 2006).

Existen cinco isoformas de GPx en el organismo: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 (Fujii et al., 2005) y GPx5 (Perkins, 2006). GPx1 es una isoforma citoplasmática que se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos, mientras que GPx2 es una forma gastrointestinal sin funciones específicas; GPx 3 está presente en el plasma. GPx4 detoxifica específicamente hidroperóxidos de fosfolípidos dentro de las membranas biológicas. GPx5 se le encuentra en el epidídimo (Perkins, 2006). El glutatión es el principal buffer tiol en las células, y es formado en el citoplasma a partir de cisteína, glutamato y glicina. Sus niveles son regulados mediante su formación *de novo*, misma que es catalizada por las enzimas γ -glutamylcisteína sintetasa y glutatión sintetasa (Ruder et al., 2009). En las células, GSH tiene múltiples funciones, desde el mantenimiento de la célula en un estado reducido hasta la formación de conjugados con algunos compuestos endógenos y xenobióticos (Agarwal et al., 2012).

Antioxidantes no enzimáticos

Estos consisten de suplementos dietéticos y sintéticos tales como la vitamina C, GSH, taurina, hipotaurina, vitamina E, Zn, selenio (Se), beta-carotenos, y carotenos.

La vitamina C (ácido ascórbico) es un conocido catalizador redox el cual reduce y neutraliza las ERO. Su forma reducida es mantenida mediante reacciones con el GSH y puede ser catalizada por proteínas disulfuro isomerasas y glutarredoxinas. El glutatión es un péptido encontrado en la mayoría de las formas de vida aeróbica ya que se sintetiza en el citosol a partir de cisteína, glutamato y glicina; por otro lado es el mayormente

encontrado en ovocitos y embriones. Sus propiedades antioxidantes provienen del grupo tiol en su componente de cisteína, el cual es un agente reductor que le permite ser oxidado reversiblemente y reducido nuevamente a su forma estable (Behrman et al., 2001).

Las concentraciones de muchos aminoácidos incluyendo la taurina, fluctúan considerablemente durante la foliculogénesis. Taurina e hipotaurina son moléculas que ayudan al mantenimiento de la homeostasis redox en los gametos. Ambas neutralizan los productos de la lipoperoxidación lipídica, la hipotaurina además neutraliza los radicales hidroxilo (Orsi et al., 2005).

De manera similar al GSH, el sistema de Thiorredoxinas (Trx) regula las funciones génicas y coordina diversas actividades enzimáticas. Este detoxifica H_2O_2 y lo convierte a su estado reducido mediante la Trx reductasa (Borchert et al., 2003).

La vitamina E (α -tocoferol) es una vitamina soluble en lípidos con propiedades antioxidantes. Está compuesta de ocho tocoferoles y tocotrienoles. Aunado a esto, es de suma importancia en las actividades antioxidantes debido a que reacciona con los radicales lipídicos producidos durante la peroxidación lipídica (Behrman et al., 2001). Esta reacción

Más recientemente, un interés creciente se ha ido enfocando en los compuestos antioxidantes naturales presentes en las plantas, animales, e incluso en los microorganismos (Chen et al., 2012, Yu et al., 2016). Como un aminoácido semi-esencial, la L-arginina se encuentra fácilmente disponible en una variedad de alimentos y tiene diferentes funciones en los organismos vivos así como en diversas enfermedades (Chaturvedi et al., 2012, Popolo et al., 2014). Puesto que la L-arginina es utilizada como un precursor biosintético de óxido nítrico (NO) en los mamíferos, este ha sido extensivamente estudiado y usado para desarrollar una variedad de compuestos bioactivos. Aunque la suplementación crónica de L-arginina exógena se piensa puede afectar la producción de NO, esto es conocido como “la paradoja de la arginina”, la suplementación aguda de L-arginina mejora la producción de NO y es recomendada bajo circunstancias especiales (Dioguardi, 2011).

3.3. L-Arginina

La L-arginina es un aminoácido semi-esencial precursor del NO por medio de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (Neems and Christopher, 2016). Algunos autores han propuesto que en el embarazo existe una deficiencia relativa de L-arginina debido al aumento de la síntesis de NO (Xu et al., 2015). En pacientes que presentan patologías como preeclampsia, hipertensión gestacional y restricción del crecimiento intrauterino, se sabe que presentan niveles disminuidos de L-arginina y NO, se cree que este déficit de L-

arginina y/o NO juegan un papel importante en la fisiopatología de estas enfermedades (Alvin et al., 2015).

Es debido a esto que se han realizado estudios utilizando a este aminoácido, resultados obtenidos con el uso del aminoácido L-Arginina muestran que en la clínica disminuye la presión sanguínea ya sea por una secreción endotelial y/o biodisponibilidad de NO, por lo que se ha utilizado como una terapia antioxidante efectiva para mejorar la función del endotelio. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de estudios clínicos en mujeres con preeclampsia no son del todo contundentes.

4. JUSTIFICACIÓN

En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, la preeclampsia representa hasta un 34% del total de las muertes maternas, debidas a los efectos adversos de la patología, es una de las principales causas de parto prematuro, y si no se trata, puede dar lugar a complicaciones fatales tanto para la madre como para el feto, generando así un alto costo del servicio médico enfocado a este tipo de pacientes. A pesar de conocer algunos elementos claves de la fisiopatología, la falla en la invasión citotrofoblástica endovascular de las arterias espirales y la disfunción endotelial, se desconoce lo que da lugar a estos eventos.

Se han explorado posibles terapias para la prevención de la enfermedad pero que aún muestran resultados controversiales, sin embargo, queda claro que existe la necesidad fundamental de desarrollar e implementar acciones con el propósito de disminuir la incidencia y los resultados adversos que conlleva esta patología. Recientemente, la suplementación oral con L-arginina en la prevención de preeclampsia en mujeres de alto riesgo han dado resultados prometedores, sin embargo es necesaria mayor aporte científico que soporte dicho uso en la clínica. Es debido a esto que se planteó realizar este estudio, para así esclarecer las vías y los posibles mecanismos que conllevan la utilización de dicha molécula.

5. HIPÓTESIS

Se han documentado resultados prometedores respecto a la suplementación con L-Arginina en mujeres embarazadas que presentan la patología. Por lo que este aminoácido protegerá a las células endoteliales contra el daño oxidativo inducido por la presencia de neutrófilos activos en el modelo *in vitro* de disfunción endotelial y podrá ser documentado por niveles de expresión en genes relacionados con la defensa antioxidante humana.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

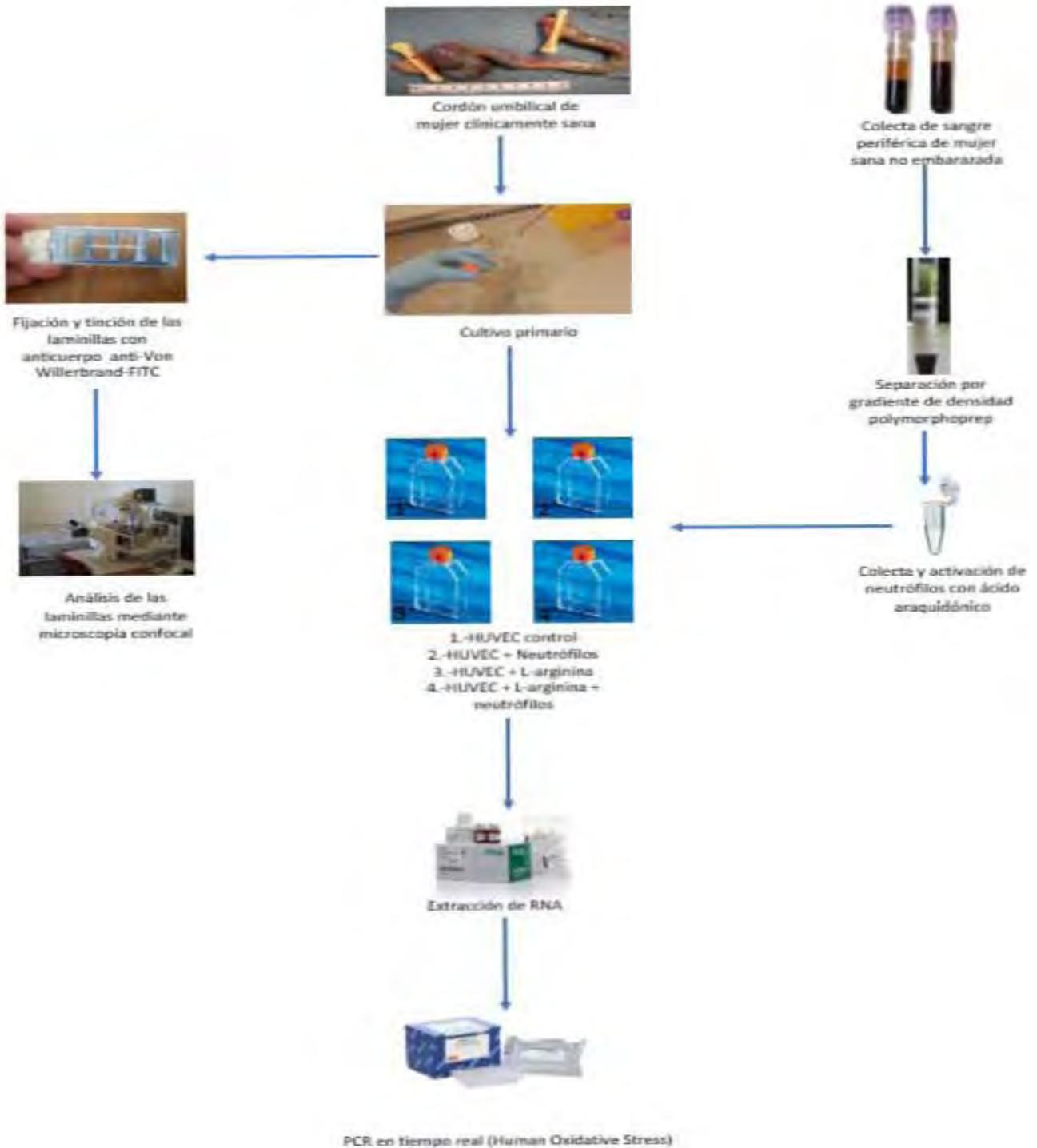
Determinar el perfil de expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante en un modelo de disfunción endotelial *in vitro* relacionado con preeclampsia y suplementado con L-Arginina

6.2. Objetivos Particulares

- Estandarización y caracterización del cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)
- Generar el modelo de disfunción endotelial *in vitro* similar a lo sucedido durante la preeclampsia mediante la exposición a neutrófilos activos.
- Analizar los niveles de expresión de genes relacionados con defensa antioxidante en el modelo de disfunción endotelial
- Comparar los niveles de expresión de genes antioxidantes en el modelo de disfunción endotelial suplementado con L-Arginina.
- Validar los genes con mayor expresión diferencial mediante la determinación de las proteínas traducidas por el gen.

7. Material y Métodos

Representación gráfica de la metodología general seguida en este trabajo para cumplir con los objetivos planteados.



7.1.1 Criterios de Inclusión

Cordones umbilicales (n=5): provenientes de partos clínicamente sanos, sin infecciones o procesos inflamatorios aparentes, obesidad, diabetes, hipertensión arterial o alguna otra enfermedad que involucre la función endotelial. Con resolución del embarazo en el Instituto Nacional de Perinatología y previa firma de la carta de consentimiento informado para que sus muestras sean incluidas en el proyecto.

Neutrófilos: Mujer donante no embarazada, sana, sin infecciones o procesos inflamatorios aparentes, sin obesidad, diabetes o hipertensión arterial.

7.1.2. Cultivo primario de células HUVEC

Una vez resuelto el embarazo, se obtuvo un fragmento de cordón umbilical de aproximadamente 15 cm de largo transportándose inmediatamente al laboratorio bajo condiciones de esterilidad, para realizar el cultivo primario de células HUVEC.

Se cuantifico el porcentaje de viabilidad del paquete celular, mediante el conteo con azul tripano de las células vivas y muertas.

Se eliminó el exceso de sangre del cordón umbilical y se realizó la digestión enzimática del endotelio venoso con tripsina-EDTA 1X durante 30 minutos a 37°C. El paquete celular primario obtenido se resuspendió en medio de cultivo EndoGRO-LS (Millipore), el cual es un medio selectivo para células endoteliales. Las condiciones de cultivo fueron: botellas de cultivo T25 en 5% de CO₂ a 37°C con 95% de humedad, hasta alcanzar el 95-98% de confluencia, y con cambio de medio cada 48 hrs.

Una vez confluyente, se expandió el cultivo y se realizó la caracterización del cultivo mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo a través de la detección del factor VIII anti-Von Willebrand, el cual es un marcador expresado por estas células.

En este primer pase, el cultivo se dividió en dos grupos:

- 1) Cultivo control: células HUVEC sin suplemento de L-Arginina
- 2) Cultivo suplementado: células HUVEC con medio de cultivo suplementado con 200 µM/L de L-Arginina. Esta concentración fue elegida porque aunque la concentración plasmática de este aminoácido en humanos es de 60-70 µM/L, se ha reportado que la actividad máxima de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se presenta cuando los niveles de L-Arginina alcanzan el rango de 200 µM/L.

7.1.3. Inmunocitoquímica

Se realizó la caracterización del cultivo primario mediante la detección inmunocitoquímica del Factor VIII de la coagulación (Von Willerbrand), y fueron analizadas por microscopía confocal (Apéndice 1).

7.1.4. Citometría de flujo

Un total de 1×10^6 células por mL, se fijaron y se procesaron para su detección por citometría de flujo (BeckmanCoulter), utilizando un Anti-Factor VIII. Se analizaron un total de 10, 000 eventos (Apéndice 2).

7.1.5. Obtención de neutrófilos a partir de sangre de circulación periférica

Se tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA e inmediatamente se separaron los neutrófilos, utilizando el gradiente de densidad osmótica comercial Polymorphoprep (Axis-Shield), el cual se basa en una barrera osmótica con densidad de 1.077 g / mL (Figura 5), que contiene metrizoato y un polisacárido permitiendo la separación al mismo tiempo de células mononucleares, polimorfonucleares (PMNs) y eritrocitos.

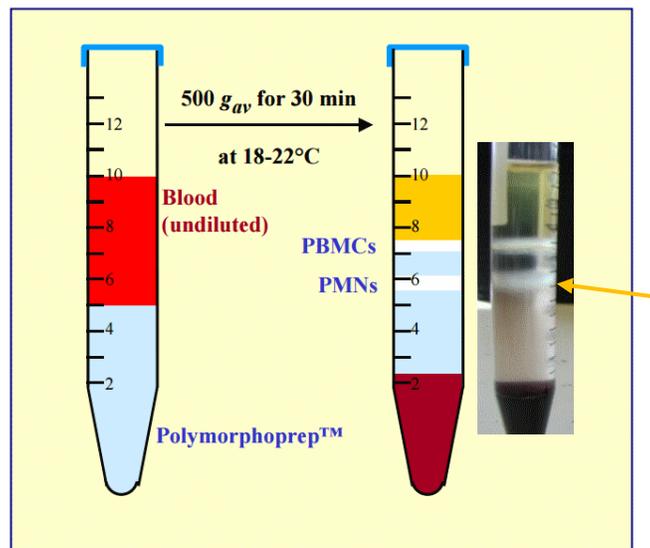


Figura 4. Representación gráfica del proceso de aislamiento de neutrófilos (flecha amarilla), por gradiente de densidad osmótica (Polymorphoprep); en el cual podemos observar que se forman dos bandas de células, en la más próxima a la superficie encontramos a los linfocitos, en la segunda a los leucocitos polimorfonucleares (flecha amarilla), esta misma banda es la que se toma para extraer los neutrófilos.

7.1.6. Activación de neutrófilos

1,000 neutrófilos por cm^2 (25,000 células para la superficie de cultivo T-25), se activaron por la adición de ácido araquidónico 50 μM (Sigma Aldrich, cat. A3925), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los neutrófilos fueron lavados con PBS para eliminar el ácido araquidónico y se emplearon en el modelo de estrés oxidativo *in vitro*.

7.1.7. Modelo de disfunción endotelial *in vitro*

A los cultivos con un 95% de confluencia se les incubó durante 24 horas en presencia de los neutrófilos activados, en una proporción 1:16 neutrófilos/célula.

Al final del período de incubación, se aspiró el medio de cultivo, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar los neutrófilos y restos celulares. Los sobrenadantes fueron preservados a -70°C hasta su posterior procesamiento.

7.1.8. Extracción de RNA total a partir de cultivos primarios de células HUVEC

Una vez que se removió todo el medio de cultivo, las células HUVEC adheridas fueron lavadas con PBS 1X para eliminar restos de medio de cultivo, suero fetal y neutrófilos. Se purificó el RNA total a partir de estas células con el kit RiboPure de Ambion. Esta metodología está diseñada para la purificación de RNA de alta calidad en el menor tiempo puesto que combina el paso de lisis y desnaturalización en el reactivo TRI (Ambion) y el método de purificación por columna.

Se basa en la homogenización de las células o tejido en el reactivo TRI, el cual es una solución monofásica que contiene fenol y tiocianato de guanidina, para lisar las células y al mismo tiempo inactivar a las nucleasas. La adición de bromocloropropano (BCP) produce la separación del homogenado en fase acuosa y orgánica. El RNA permanece en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas se encuentran en la interfase y en la fase orgánica (Apéndice 4).

7.1.9. Análisis de la integridad del RNA

Se analizó la concentración del RNA obtenido mediante la lectura espectrofotométrica a 260 nm en el Nanodrop (Thermo Scientific) y se analizó la integridad del mismo con el microchip de Bioanalyzer (Agilent Technologies). Ambos pasos son indispensables para asegurar el resultado de los microarreglos, ya que un índice de integridad mayor a 7 es indicador de que el RNA es adecuado para someterse a este tipo de ensayos (Apéndice 5)

7.2.1. Análisis de la expresión de genes participantes en la respuesta a estrés oxidativo y defensa antioxidante.

Se utilizó un arreglo comercial de qRT-PCR (RT2 Profiler PCR Array Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense, Sabiosciences QIAGEN, PAHS-065Z) el cual analiza la expresión de 84 genes relacionados con la defensa antioxidante. En este se incluyen genes codificantes para peroxidases como son las glutatión peroxidases (GPx), peroxirredoxinas (TPx). También incluye genes involucrados en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno (ERO), genes de respuesta a estrés oxidativo e involucrados en el metabolismo del superóxido como son las súper óxido dismutasas (SOD).

7.2.2. Agrupación funcional de los genes

Antioxidantes:

Glutatión peroxidases (GPx): *GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7, GSTP1, GSTZ1.*

Peroxirredoxinas (TPx): *PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6.*

Otras peroxidases: *CAT, CYBB, CYGB, DUOX1, DUOX2, EPX, LPO, MGST3, MPO, PTGS1 (COX2), PXDN, TPO, TTN.*

Otros antioxidantes: *ALB, APOE, GSR, MT3, SELS, SOD1, SOD3, SRXN1, TXNRD1, TXNDR2.*

Genes involucrados en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno (ERO):

Superóxido dismutasas (SOD): *SOD1, SOD2, SOD3.*

Otros genes involucrados en el metabolismo superóxido: *ALOX12, CCS, DUOX1, DUOX2, GTF2I, MT3, NCF1, NCF2, NOS2 (iNOS), NOX4, NOX5, PREX1, UPC2.*

Otros genes involucrados en el metabolismo de las ERO: *AOX1, BNIP3, EPHX2, MPV17, SFTPD.*

Genes de respuesta a estrés oxidativo: *APOE, ATOX1, CAT, CCL5 (RANTES), CYGB, DHXR24, DUOX1, DUOX2, DUSP1 (PTPN16), EPX, FOXM1, FTH1, GCLC, GCLM, GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSR, GSS, HMOX1, HSPA1A, KRT1, LPO, MLB2, MPO, MSRA, NQO1, NUDT1, OXSR1, PDLIM1, PNKP, PRDX2, PRDX5, PRDX6 (AOP2), PRNP, RNF7, SCARA3, SELS, SEPP1, SIRT2, SOD1, SOD2, SQSTM1, SRXN1, STK25, TPO, TTN, TXN, TXNRD1, TXNDR2.*

Este tipo de microarreglo contiene además cinco genes constitutivos los cuales son indispensables para la normalización de los datos, un control para analizar la contaminación con DNA genómico en la muestra, tres controles positivos de la transcriptasa reversa y tres controles positivos de la PCR.

El análisis de las diferencias en expresión fueron calculadas utilizando el software RT² Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.5 de la plataforma de Qiagen (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) que se basa en el método de $\Delta\Delta C_t$ con una normalización de los datos crudos con los genes constitutivos.

Se generaron listas de valores de Ct para cada grupo, los cuales fueron comparados entre ellos. El resultado muestra los cambios en los perfiles de expresión de los genes entre los diferentes grupos analizados de la siguiente manera.

- 1) Células HUVEC control Vs células HUVEC + Neutrófilos
- 2) Células HUVEC control Vs células HUVEC + L-Arginina
- 3) Células HUVEC + Neutrófilos Vs células HUVEC + Neutrófilos + suplemento de L-Arginina

7.2.3 Cuantificación de la glutamato cisteín ligasa subunidad catalítica (GCLC) mediante ELISA.

Se utilizó un kit comercial de ELISA (Mybiosource) para la detección de GCLC siguiendo las indicaciones del fabricante (Apéndice 6)

7.2.4 Cuantificación de peroxirredoxina 3 (PRDX 3) mediante ELISA.

Se utilizó un kit comercial de ELISA (Mybiosource) para la determinación de PRDX 3 tanto en los medios de cultivo como en los lisados proteicos siguiendo las instrucciones del fabricante (Apéndice 7).

7.2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando GraphPad Prism 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA, www.graphpad.com). Se usó una prueba de ANOVA para realizar la comparación de las medias entre los cuatro diferentes grupos respecto a los niveles de proteínas.

8. RESULTADOS

8.1. Estandarización y caracterización del cultivo de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC).

Se obtuvo una adecuada cantidad y viabilidad de las células a partir de cordón umbilical humano mediante digestión con tripsina-EDTA, con un rendimiento y porcentaje mayor al 90% de células viables. En cuanto al tiempo necesario para la propagación desde la obtención del cultivo primario y el primer pase de propagación fue de 1 semana aproximadamente, dependiendo de la cantidad de células sembradas, a mayor cantidad menor tiempo de cultivo para llegar a confluencia. El tiempo total de cultivo entre los pasos de división para obtener la cantidad de células suficientes para los grupos experimentales fue alrededor de 3 semanas.

Como primer paso para la identificación y caracterización del cultivo se realizó la tinción con hematoxilina-eosina (Figura 6), en donde se observa a las células con las características de la línea celular: morfología cobblestone y núcleos multilobulados.

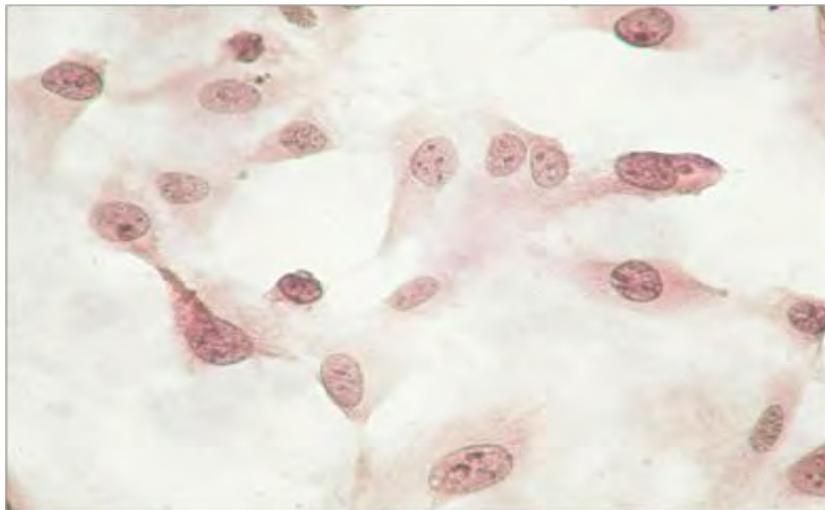


Figura 5. Tinción hematoxilina-eosina, muestra las características morfológicas típicas de las células HUVEC.

Posterior a esto se realizó la caracterización de las células utilizando el anticuerpo anti-Factor VIII Von Willerbrand marcado con FITC, el análisis por microscopía confocal (Carl Zeiss) mostró que más del 99% de las células en el cultivo primario expresan este Factor VIII, marcador específico de células endoteliales (Figura 7).

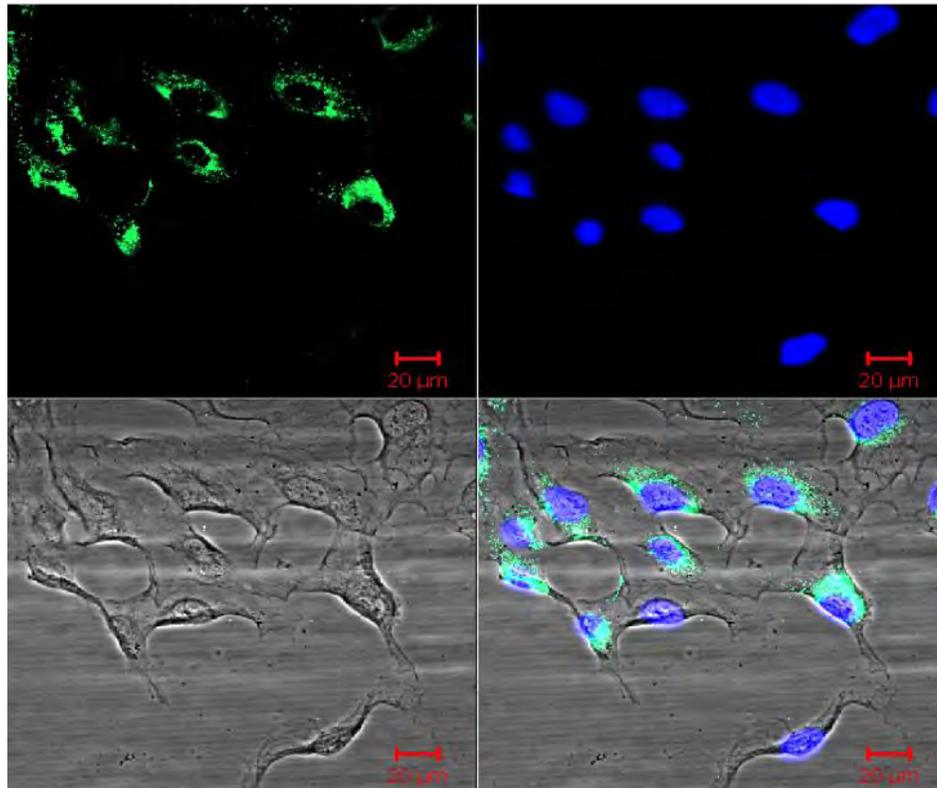


Figura 6. Caracterización de cultivo de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Las células (A) Factor Von-Willerbrand-FITC (verde). (B) Tinción de núcleos con DAPI (azul). (C) Contraste de fases. (D) Imagen sobre puesta del factor Von-Willerbrand y DAPI (D).

8.2. Estandarización del Modelo de disfunción endotelial

8.2.1. Aislamiento y activación de neutrófilos.

Posterior al aislamiento de células polimorfonucleares de sangre periférica se realizó el conteo celular con el equipo Beckman Coulter para analizar el porcentaje de purificación por línea celular obtenido en cada aislamiento (Figura 8). Con este método de separación de neutrófilos se obtuvo alrededor del 89.3%, siendo la población predominante. Con este resultado podemos asegurar que el efecto inducido por la exposición de estas células con el cultivo primario es debido principalmente por neutrófilos.

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA .			
9 SEXO	F	EDAD 0	Years 0 Months 12 Days
RQQA		NOMBRE	PMN DUP
3 /µL		NE	89.30 %
8 /µL		LI	0.90 %
dL		MO	3.00 %
		EO	6.10 %
		BA	0.70 %
HL		LAT	0.04 %
		CIM	6.31 %
		NE#	24.62 10 ³ /µL
/µL		LY#	0.25 10 ³ /µL
		MO#	0.83 10 ³ /µL
		EO#	1.68 10 ³ /µL
		BA#	0.19 10 ³ /µL
		LAT#	0.01 10 ³ /µL
		CIM#	1.64 10 ³ /µL

Figura: 7. Resultados del conteo por línea celular de células polimorfonucleares separadas mediante gradiente de densidad (Polymorphprep). La principal población celular obtenida corresponde a neutrófilos con un 89.3%

A continuación se determinó que efectivamente se realizara la activación de neutrófilos al incubarse con el ácido araquidónico. Para este análisis se utilizaron 2 marcadores de diferenciación específicos para neutrófilos; el CD16b marcado con ficoeritrina (PE) que diferencia a los neutrófilos de macrófagos y células NK, y el CD66b marcado con isotiocinato de fluoresceína (FITC) que diferencia neutrófilos activos de los no activos.

El análisis por citometría de tamaño contra complejidad de la muestra tal y como se obtiene a partir del gradiente define a una población de aproximadamente el 87.9% que corresponde a neutrófilos (Figura 9A). Al analizar la muestra de células que fueron incubadas previamente con ácido araquidónico se observa la misma población con el mismo porcentaje pero con menor complejidad, es decir, menor cantidad de gránulos probablemente debido a la degranulación en respuesta a la activación con el ácido araquidónico (Figura 9B).

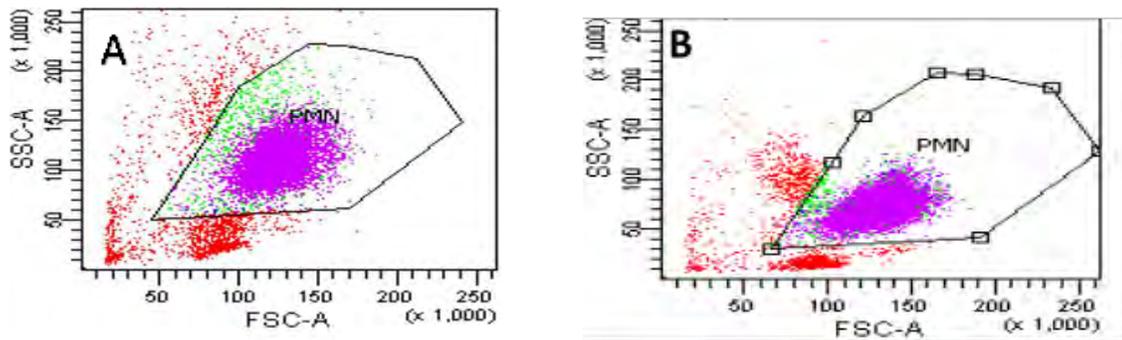


Figura 8 A y B. Gráfica de tamaño contra complejidad de células polimorfonucleares obtenidas de sangre periférica a través de un gradiente de densidad. A) células polimorfonucleares control 87.9%; B) células incubadas con ácido araquidónico 50 μ M 86.4%.

Con respecto a la activación de las células con ácido araquidónico, se documenta una ganancia de fluorescencia para el marcador de diferenciación celular 66b (CD66b) comparado con la muestra sin paso de activación (Figura 10),

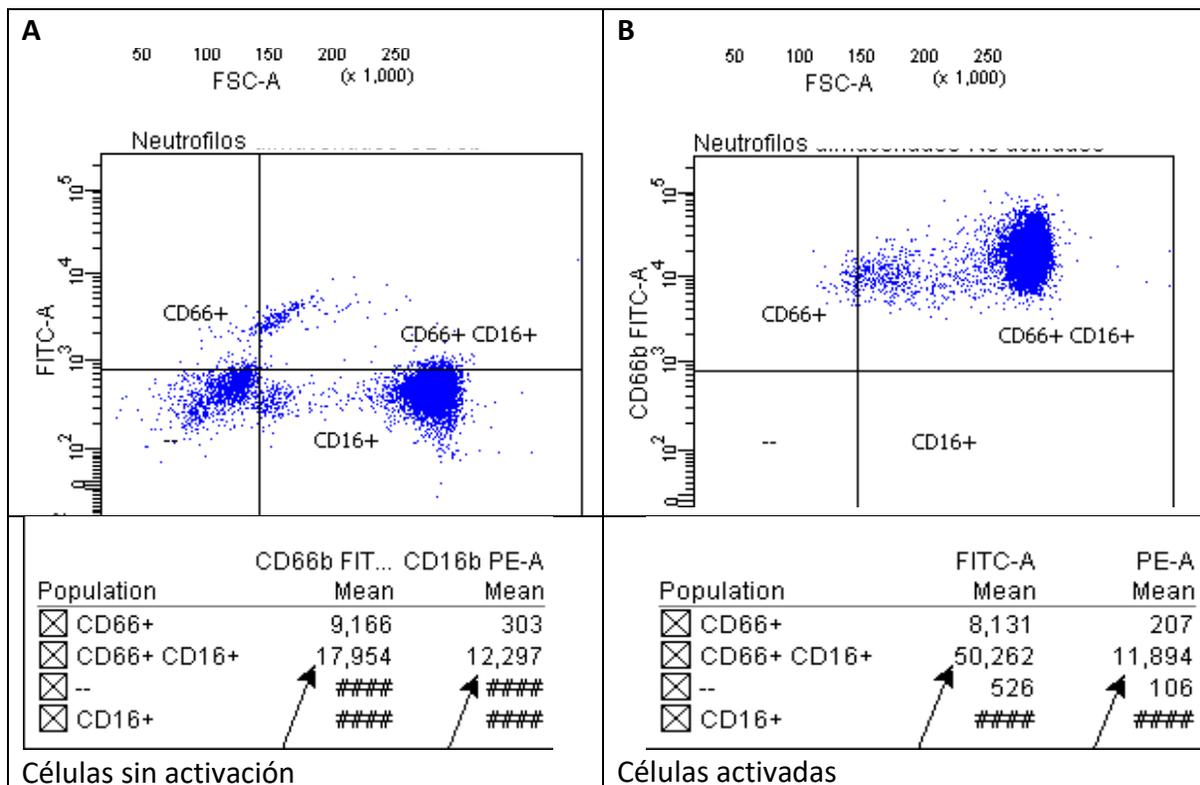
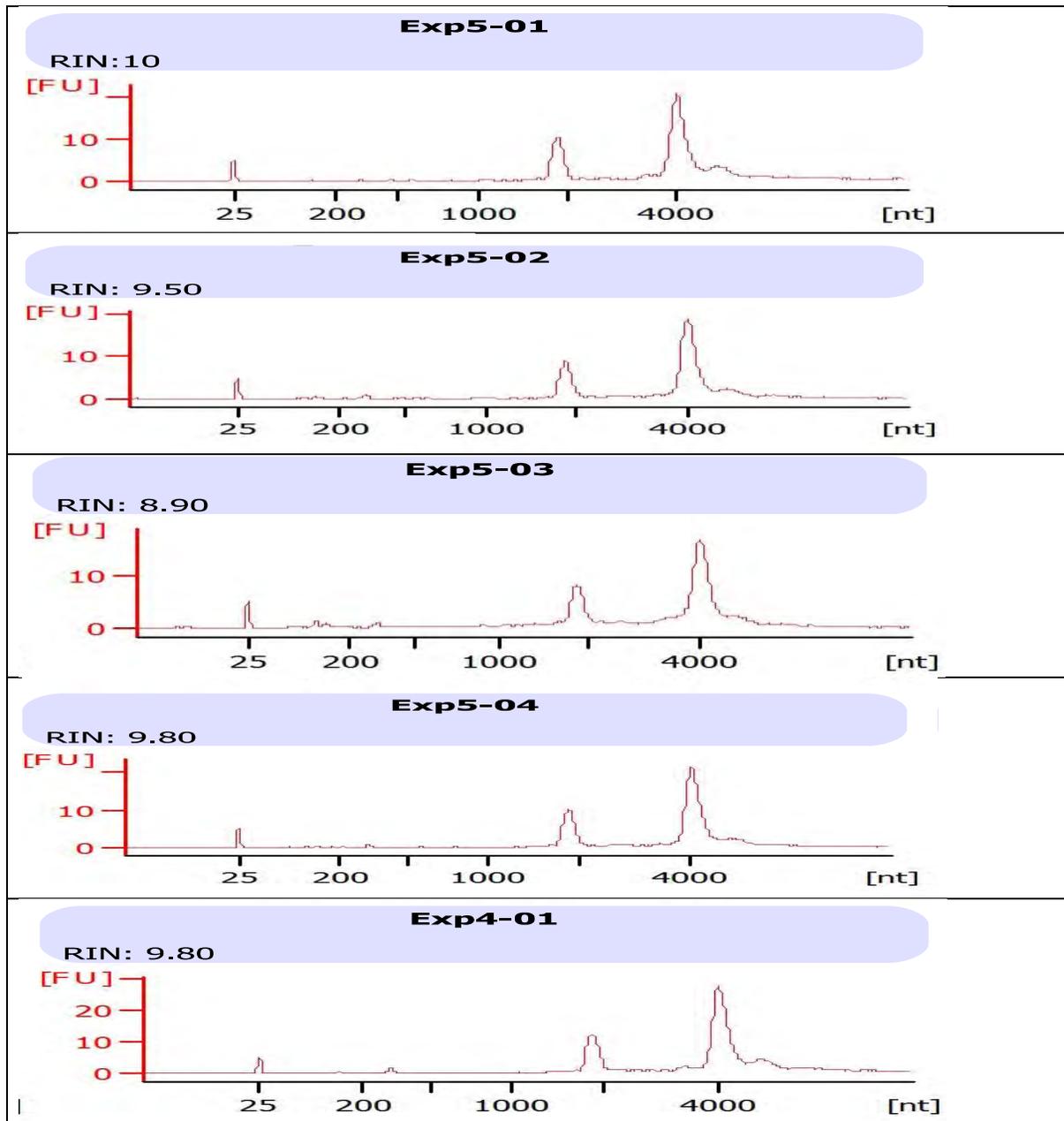


Figura 9. Representación gráfica de ganancia de fluorescencia relativa en neutrófilos activados con ácido araquidónico,. (A) sin activación, (B) activadas.

8.3. Análisis de la integridad del RNA

Previo a realizar los microarreglos de expresión se analizó la integridad del RNA obtenido, este paso es indispensable, para decidir si es utilizado en esta técnica. En este contexto es necesario que el RNA extraído presente una integridad optima expresada con un RIN mayor a 7 y para poder hacer los ajustes necesarios en cuanto a dilución se requiere que la concentración sea mayor o igual a 70 ng/uL.



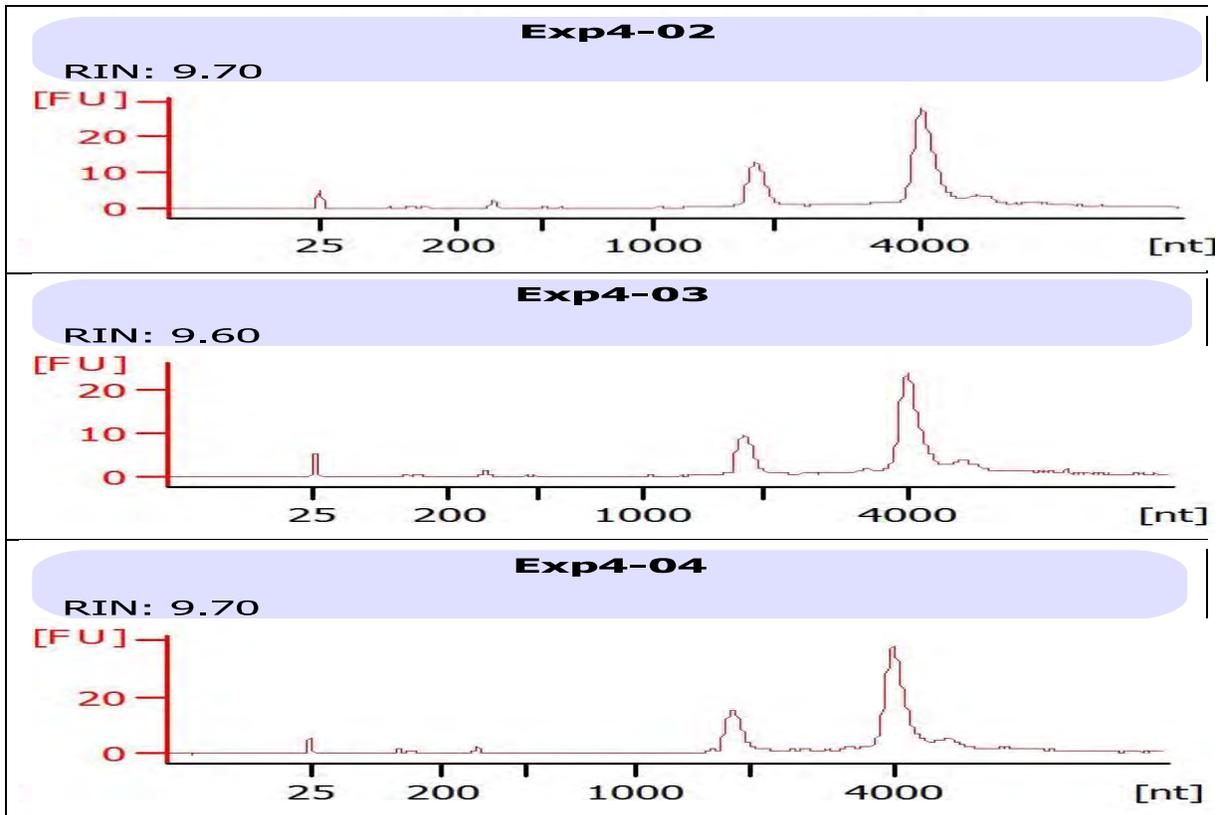


Figura 10. Electroferogramas representativos de los microchips de Bioanalyzer (Agilent Technologies). Exp 5-01: HUVEC Control; Exp 5-02: HUVEC Neutrófilos; Exp 5-03: HUVEC +L-arginina; Exp 5-04: HUVEC +Nueutrófilos+ L-arginina Exp 4-01: HUVEC+ Neutrófilos; Exp 4-02: HUVEC+ L-arginina; Exp 4-03: HUVEC Control; Exp 4-04: HUVEC+ L-arginina.

El electroferograma (Figura 11) muestra los 2 RNAs ribosomales eucariotas, 18S y 28S, sobre los cuales es que se determina la integridad. Otro de los resultados que arroja esta técnica son la representación de corrimiento de electroforesis de las muestras (Figura 12).

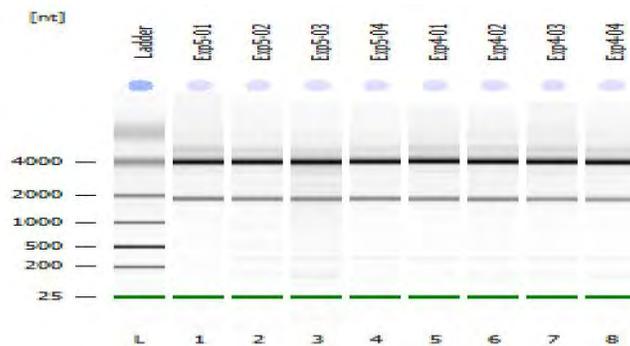


Figura 11. Electroforésis capilar donde se muestran las bandas de los dos RNAs ribosomales

8.4. Microarreglos de expresión

Se comparó la expresión de genes de respuesta antioxidante y el microambiente de estrés oxidativo del cultivo de células HUVEC+Neutrófilos contra el cultivo control de células HUVEC.

Sólo 4 de los 84 genes incluidos en el microarreglo mostraron sobreexpresión, siendo la catalasa (CAT) la de mayor cambio (40.83 veces más expresado que en el grupo control) Tabla 1, los otros 3 genes sobre expresados son albúmina, selenoproteína 1, y la NADPH oxidasa 5. Todos de función antioxidante.

Tabla 1: Genes sobre expresados en HUVEC+Neutrófilos comparado con HUVEC control	
Símbolo del Gen	Veces de cambio
CAT	40.8325
ALB	9.2002
SEPP1	7.1137
NOX5	4.7339

En este mismo análisis 24 de los genes se observan subexpresados, siendo el que codifica para la subunidad catalítica de la glutamato cisteín ligasa (GCLC) y el de la peroxirredoxina 3 (PRDX3), los que presentan mayor diferencia (166.48 y 51.61 veces menos expresados respectivamente), genes importantes en la biosíntesis del glutatión y en la eliminación de hidroperóxidos Tabla 2. Además, se presenta el gráfico de dispersión (Figura 13), con los genes sub-expresados (verde) y sobre-expresados (rojo), en lo que respecta a la comparación de HUVEC control contra HUVEC estimuladas con neutrófilos.

Tabla 2: Genes Sub expresados en HUVEC+Neutrófilos comparado con HUVEC control	
Símbolo del Gen	Veces de cambio
GCLC	-166.4875
PRDX3	-51.6115
DHCR24	-23.762
GSR	-20.087
TTN	-18.3639
TXNRD2	-16.0361
PRDX1	-15.4484
PRDX4	-11.6493
GSTP1	-10.3812
MSRA	-9.487
GAPDH	-7.6562
CCL5	-7.357
NOX4	-7.3081
GPX3	-6.4089
NUDT1	-6.3973

B2M	-5.5698
SIRT2	-4.9344
HSPA1A	-4.8942
OXR1	-4.8764
NCF2	-4.8326
APOE	-4.804
GPX1	-4.1399
PTGS1	-4.0515
BNIP3	-4.0188

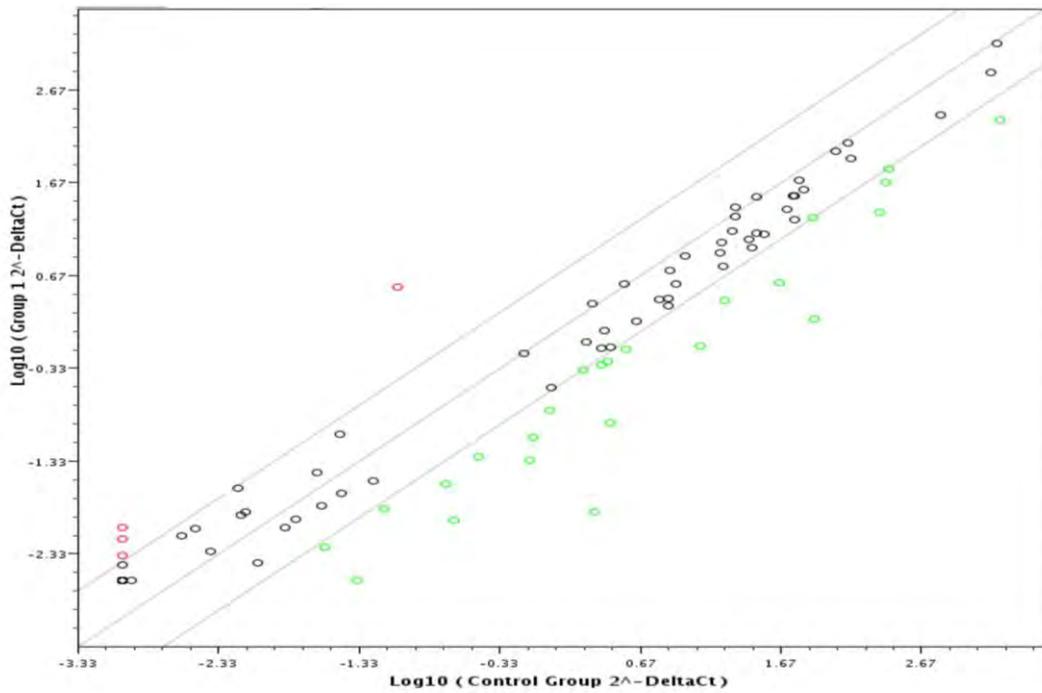


Figura 12. Gráfico de dispersión comparando la expresión normalizada de cada gen entre Células HUVEC + Neutrófilos comparada contra células HUVEC control, para visualizar cambios en la expresión génica. La línea central marcada en negro indica la expresión génica sin cambios tomando como límite de regulación 4 veces de cambio. Los círculos en rojo representan los genes con sobre expresión y los marcados en verde representan los genes con subexpresión.

El siguiente análisis consistió en comparar la expresión del cultivo de células HUVEC + Neutrófilos suplementado con L-Arginina contra el cultivo de HUVEC + Neutrófilos como control, y de igual forma se observó que de los 84 genes que incluye el microarreglo 11 de ellos presentan sobre expresión Tabla 3. Llamando la atención que dos de los genes (GCLC y PRDX 3) que en la comparación anterior se ven sub expresados muestran un comportamiento inverso, es decir, están sobreexpresados.

Tabla 3: Genes sobre expresados en HUVEC+Neutrófilos suplementado con L-Arginina comparado con HUVEC + Neutrófilos	
Símbolo del Gen	Veces de cambio
GCLC	37.9815
PRDX3	22.9294
MSRA	8.4294
TTN	7.9611
NCF1	7.948
NCF2	5.8199
DHCR24	5.6418
GSR	4.3851
CYBB	4.1595
MT3	4.0352
GCLM	4.0195

Tabla 4: Genes sub expresados en HUVEC+Neutrófilos suplementado con L-Arginina comparado con HUVEC + Neutrófilos	
Símbolo del Gen	Veces de cambio
DUOX1	-6.8049
GSS	-5.9809
ACTB	-5.7396
ALB	-4.5245

En el gráfico de dispersión (Figura 15), se observan los genes que muestran sobre-expresión (rojo) y sub-expresión (verde). Quedando marcado que la mayoría de los genes que se ven subexpresados al comprar la expresión de HUVEC+ neutrófilos en este análisis se encuentran sobreexpresados en el cultivo que esta suplementado con la L-Arginina y en presencia de los neutrófilos activados.

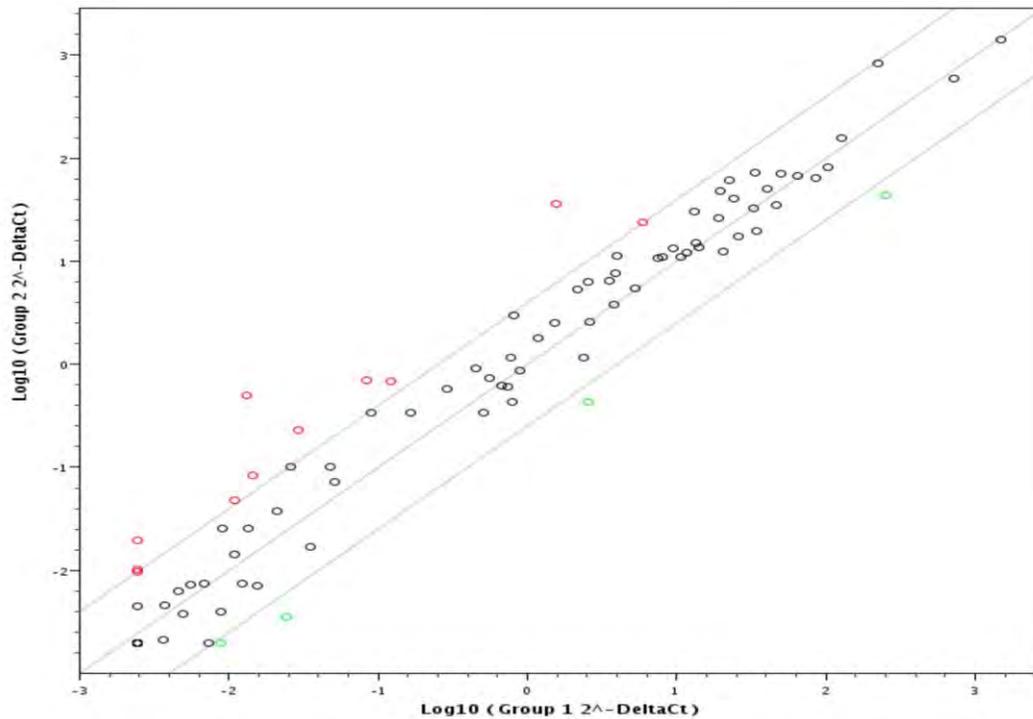


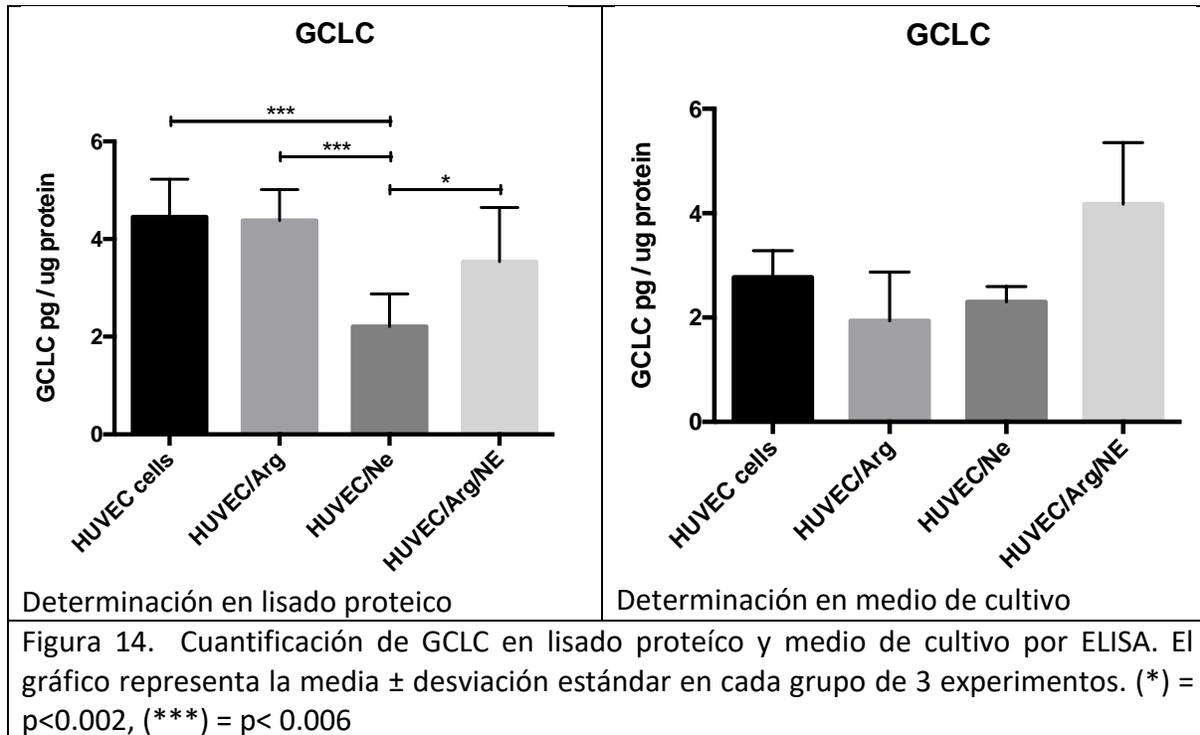
Figura 13. Gráfico de dispersión comparando la expresión normalizada de cada gen entre Células HUVEC + Neutrófilos suplementada con L-Arginina comparada contra células HUVEC + Neutrófilos como control, para visualizar cambios en la expresión génica. La línea central marcada en negro indica la expresión génica sin cambios tomando como límite de regulación 4 veces de cambio. Los círculos en rojo representan los genes con sobre expresión y los marcados en verde representan los genes con subexpresión.

8.5 Validación de los genes con mayor expresión diferencial.

Finalmente se realizó la validación de los microarreglos determinando la concentración de dos de las proteínas con mayor cambio en expresión, esto con el fin de documentar si también a nivel de proteína se observaba la misma tendencia. De tal forma, que se determinó GCLC, peroxirredoxina 3 y la sintasa de óxido nítrico endotelial (NOS 3), que si bien no sufre cambios respecto a su expresión, es una de las enzimas más importantes para el mantenimiento de un embarazo saludable. Esta determinación se realizó tanto en lisado proteico de las células, como en el medio de cultivo.

Respecto a la validación de GCLC mediante ELISA (Figura 15), se documentó que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre las células HUVEC control, al compararlo con las células HUVEC estimuladas con neutrófilos activos, de manera similar observamos diferencia significativa ($p < 0.01$), entre las células HUVEC estimuladas con neutrófilos y las células HUVEC con el estímulo de neutrófilos y suplementadas con L-arginina, todo esto en los lisados proteicos, en lo que respecta a las cuantificaciones en medios de cultivo, si bien no se encontraron diferencias significativas entre ningún caso, si

se logra observar tendencia al incremento de esta proteína en los medios de cultivo de las células HUVEC estimuladas con neutrófilos y suplementadas con L-arginina, lo cual sugeriría que las células estarían secretándola al medio de cultivo, para tratar de contrarrestar el estrés oxidativo. Con esto comprobamos que no solo observamos cambios a nivel del mRNA de GCLC, sino que el proceso se mantiene hasta llegar a la traducción de la proteína. Cabe señalar que estos resultados son consistentes con los vistos a nivel de expresión de genes.



La medición por ELISA de la sintasa de óxido nítrico endotelial (Figura 16), no muestra diferencias estadísticamente significativas, en lo que respecta a los medios de cultivo así como en los lisados proteicos, mismo fenómeno que se presenta al evaluarlos a nivel de expresión génica en los microarreglos, en donde tampoco se observa diferencias en cuanto a las veces de cambio entre los grupos. Sin embargo, si se aprecia tendencia a aumentar en el medio de cultivo de las células HUVEC estimuladas con los neutrófilos activados, por lo cual probablemente se debería aumentar la n, para verificar que no existan diferencias tanto a nivel génico como proteico.

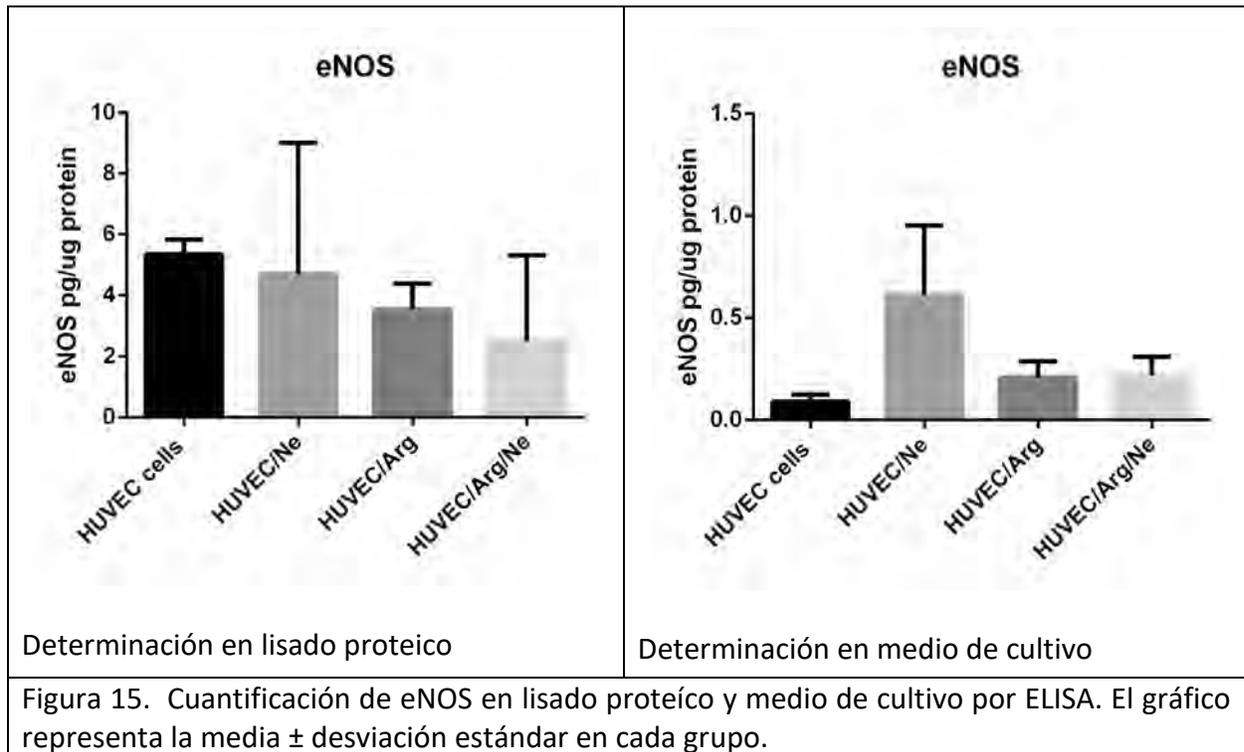
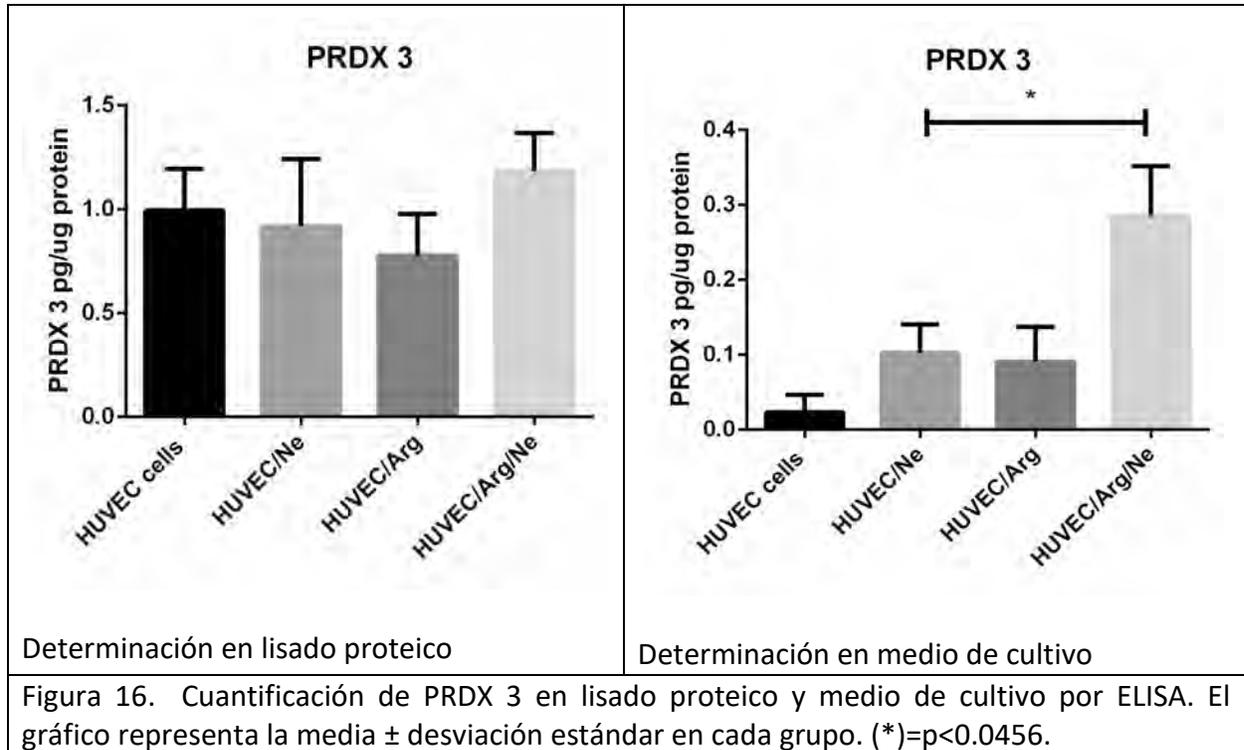


Figura 15. Cuantificación de eNOS en lisado proteico y medio de cultivo por ELISA. El gráfico representa la media \pm desviación estándar en cada grupo.

Por otro lado, al realizar la validación de PRDX 3 por ELISA (Figura 17), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones de los lisados proteicos, sin embargo, en los medios de cultivo al comparar el de las células HUVEC estimuladas con neutrófilos activados versus el de las células HUVEC con el estímulo de los neutrófilos y que además fueron suplementadas con L-arginina presentó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0456$), todo esto a pesar de que esta es una proteína intracelular, más específicamente mitocondrial.



9. Discusión

Con incidencia de entre el 2-8%, la preeclampsia es un trastorno frecuente del embarazo, que empieza en la placenta y finaliza en el endotelio materno. Uno de los principales eventos en el síndrome de la preeclampsia es la disfunción endotelial, postulándose dentro de los más importantes causantes de este evento la participación de los neutrófilos activos, los cuales se han detectado que aumentan en la circulación de pacientes con preeclampsia, generando un microambiente de estrés oxidativo, y exacerbando la respuesta endotelial (Ramma et al., 2012).

Entre las limitantes para poder evaluar la disfunción endotelial en el evento de preeclampsia encontramos que todos los estudios en ciencia básica solo se pueden realizar al final del embarazo y en la parte clínica solo se pueden hacer determinaciones en sueros maternos o para la función endotelial se utilizan técnicas de análisis un tanto invasivas, es por ello que un modelo in vitro nos permite mayor control experimental y de análisis.

Así, en el modelo de disfunción endotelial propuesto en el presente trabajo, documentamos, que la exposición de células endoteliales con neutrófilos activos, se genera un ambiente de estrés oxidativo el cual puede ser analizado a nivel de expresión génica, debido a que encontramos que varios de los genes relacionados con la defensa antioxidante se ven disminuidos en comparación del cultivo control, este evento refuerza la participación de los neutrófilos en el evento.

En general el estrés oxidativo (EO), hace referencia a una alteración en el fino balance entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) o especies reactivas del nitrógeno (ERN) y los mecanismos de defensa antioxidante. Durante el periodo gestacional estos mecanismos de defensa antioxidante toman una importancia aun mayor (Ruder et al., 2009).

Debido a la magnitud de los eventos adversos a la preeclampsia, los estudios se enfocan en el tratamiento para disminuir la incidencia o el grado de severidad, así, se ha logrado documentar que dosis bajas de aspirina (<150 mg/día) administrado antes de la semana 16 de gestación se observa reducción significativa de la preeclampsia y de la restricción de crecimiento intrauterino en comparación de los controles, esta reducción no se produce si la administración comienza después de las 16 semanas de gestación. Institucionalmente esta es la terapia que se prescribe cuando una paciente presenta elevado riesgo de desarrollar la enfermedad.

Existen diversos trabajos en donde se ha documentado una falla en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y el aumento en los niveles de EO, lo cual conduce hacia la búsqueda de blancos terapéuticos que apoyen en el tratamiento de la enfermedad. En este contexto, el aminoácido L-Arginina ha sido postulado como opción terapéutica en el

tratamiento y prevención de la preeclampsia, debido a que es el sustrato utilizado por la sintasa de óxido nítrico para generar NO. Sin embargo, y a pesar de haber documentado clínicamente una disminución estadísticamente significativa ($\chi^2=19.41$ $P<0.001$) en la incidencia de la patología en una población de alto riesgo, aún se desconocen los mecanismos moleculares, ni se tiene una propuesta de la vía de acción de este aminoácido (Vadillo-Ortega et al., 2011).

Así, en el presente trabajo se documentó que al exponer un cultivo de células endoteliales en presencia de neutrófilos activos, se induce una baja en la expresión de genes relacionados con defensa antioxidante, principalmente de GCLC y peroxirredoxina 3.

Se sabe que una de las principales líneas de defensa en contra del estrés oxidativo tiene que ver con la actividad transcripcional del factor 2 relacionado a NF-E2 (Nrf2). Nrf2 está íntimamente implicado en la biosíntesis de glutatión (GSH), ya que regula la transcripción de la enzima de mayor importancia en su formación, la glutamato cisteín ligasa (GCL) (Kensler et al., 2007, Lu, 2009). Esta enzima consta de dos subunidades; una grande y otra de menor tamaño.

GCLC (la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa) es un gen que traduce para la subunidad de mayor tamaño del dímero de GCL, cuya función está más directamente involucrada en la biosíntesis *de novo* del GSH; el cual es un tiol tripéptido sintetizado endógenamente (γ -glutamilcisteinilglicina) con importantes propiedades bioquímicas y antioxidantes (Franklin et al., 2009).

El promotor humano de *GCLC* tiene muchos elementos potenciales que actúan en cis, incluyendo sitios que reconocen secuencias consenso para la unión de Sp1 y el elemento de respuesta antioxidante (ARE). Nrf2 puede estar regulando la expresión de *GCLC* mediante su unión con la región ARE4, misma que presenta una muy marcada función de activación de la transcripción y que está localizada ~4 kb “río arriba” del sitio de inicio de la transcripción (Erickson et al., 2002, Mulcahy et al., 1997).

En un estudio (Kawasaki et al., 2015) reportaron que la expresión de este gen, se ve disminuida significativamente en placentas con preeclampsia, para esto se basaron en comparar diferentes plataformas de microarreglos debido a la gran variedad en los resultados. Los resultados en el presente trabajo muestran resultados similares a pesar de haber sido realizados en células de origen distinto.

En lo que respecta a la familia de las sintasas de óxido nítrico (NOS) comprenden la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). El óxido nítrico (NO), es un radical libre gaseoso conocido por su amplio rango de actividades biológicas, y es sintetizado por las tres isoformas NOS (Yadav et al., 2016).

No es extraño el hecho de que si bien no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la concentración de eNOS en los medios de cultivo ni en los lisados proteicos, si se observa mayor cuantificación de esta proteína en los medios de cultivo de las células HUVEC estimuladas con neutrófilos, ya que posiblemente sea una respuesta de las células a consecuencia del EO, ya que se sabe que la chaperona HSP90 no solo puede regular la actividad de eNOS, sino que además le confiere una protección contra los productos del EO, así como del estrés por calor, entre otras, es por esto que probablemente bajo estas condiciones, dicha chaperona protege esta enzima de ser susceptible a la degradación (Bharati et al., 2017).

En relación a la peroxiredoxina 3, otro gen que también vimos disminuida su expresión, codifica para una familia de enzimas que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos a agua y alcohol, respectivamente (Chae et al., 1994, Rhee et al., 2005). Específicamente la PRDX3 se localiza en las mitocondrias.

De acuerdo a lo reportado por Liu et al., (2005) PRDX-3 es sintetizada en el citoplasma y posteriormente transportada a la mitocondria por la esfingosina cinasa-1 unida a la proteína RPK118 (Liu et al., 2005). Este mecanismo puede explicar el hecho de que encontremos niveles tan bajos de esta proteína en los medios de cultivo bajo condiciones fisiológicas (HUVEC control), debido a que está siendo transportada a la mitocondria, donde de manera natural ejerce sus funciones. Esta proteína transportadora (esfingosina cinasa-1), de igual manera estaría implicada en el transporte de la PRDX 3 pero hacia afuera de la célula, motivo por el cual la encontramos en mayor cantidad en los medios de cultivo una vez que las células son suplementadas con L-arginina y en presencia de los neutrófilos activados, ya que es aquí donde encontramos aumentados los niveles de hidroperóxidos y peróxidos de hidrógeno, producto de la activación de los neutrófilos. Debido a que cumple con la función de eliminar las ERO mitocondriales, PRXD3 es esencial para mantener la función normal de la mitocondria (Araki et al., 1999, Wonsey et al., 2002). La forma en la que actúa es porque posee dos cisteínas típicas que son oxidadas por el H₂O₂. Las cisteínas oxidadas son después reducidas por la Tiorredoxina mitocondrial 2 (TRX2) o por la glutarredoxina 2 (Grx2) (Hanschmann et al., 2010). PRDX3, TRX2, y TRX reductasa 2 (TrxR2) constituyen la primera línea respecto a la protección en contra del estrés oxidante de la mitocondria.

10. Conclusiones

El estímulo con neutrófilos activados sobre nuestro modelo *in vitro* de células HUVEC, simulando el microambiente de estrés oxidativo presentado en la preeclampsia, induce la expresión génica a la baja de genes de respuesta antioxidante, esto no se detecta cuando existe una suplementación con L-arginina en el cultivo, previo a la exposición con neutrófilos, suponiendo una posible vía o mecanismo molecular de defensa contra el estrés oxidativo mediante el cual actúa dicho aminoácido. Dos de las proteínas producidas por los genes con mayor variación en expresión (GCLC y PRDX 3), tienen función de revertir o brindar cierta protección a las células del daño inducido por el estrés oxidativo.

11. Apéndice de técnicas

11.1. Apéndice 1

Fijación de células para inmunocitoquímica

- 1.- Se realiza un lavado con PBS 1X de 5 minutos cada uno.
- 2.- Se fijaron con metanol absoluto durante 15 minutos a -20°C , posteriormente se añadió acetona durante 15 minutos a -20°C . Como una opción alternativa, se puede realizar una dilución 1:1 de metanol-acetona, y fijar durante 20 minutos a -20°C . Este proceso también se puede realizar manteniendo las laminillas sobre hielo.
- 3.- Las células ya fijadas se incubaron con HCl al 0.05N durante 5 minutos sobre hielo.
- 4.- Las células se lavaron con PBS 1X 3 veces de 5 minutos cada lavado.
- 5.- Se incubaron con 250 μL de RNAsa de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM durante 1 hora a 37°C .
- 6.- Las laminillas se lavaron de manera secuencial en PBS 1X, etanol al 35%, 50% y 75% de 3 minutos cada lavado.
- 7.- Se realizó la desnaturalización *in situ* del DNA, con 250 μL de NaOH al 0.15N en etanol al 70%.
- 8.- Se lavaron 2 veces con PBS 1X.
- 9.- Se utilizaron 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 μL) de colorante de Hoescht (32358) en PBS 1X durante 10 minutos para teñir el DNA.
- 10.- Se realizaron lavados secuenciales con etanol al 70% con 4% v/v de formaldehído, etanol al 50%, 35% y PBS 1X de 2 minutos cada lavado.
- 11.- Se incubaron con 250 μL de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K (1 μL) en 200 mM de Tris, 1mM de EDTA a pH de 7.5 durante 10 minutos a 37°C .
- 12.- Se lavaron varias veces con PBS 1X.
- 13.- Se bloquearon las posibles uniones inespecíficas con suero de cabra al 5% diluido en PBS 1X durante 1 h a $T^{\circ}\text{C}$ ambiente.
- 14.- Se les dieron varios lavados con PBS 1X, y se incubaron con 250 μL del anticuerpo específico a 4°C o en cámara húmeda
- 15.- Lavaron varias veces con PBS 1X y Tween 20 al 0.05% de 5 minutos cada lavado.
- 16.- Se enjuagaron con agua desionizada.
- 17.- Las laminillas se montaron con medio de montaje (vectashield).

11.2. Apéndice 2

Citometría de Flujo para identificar Neutrófilos y neutrófilos activos

- 1.- Se tomó el volumen necesario para tener un mínimo de 1×10^6 células por mililitro.
- 2.- Se fijaron con 100 μ L del reactivo 1 de intraprep.
- 3.- Cada tubo se agitó vigorosamente.
- 4.- Se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
- 5.- Se agregaron 4 mL de PBS.
- 6.- Se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g a temperatura.
- 7.- El sobrenadante fue descartado por aspiración.
- 8.- Se adicionaron 100 μ L del reactivo 2 de IntraPrep a cada tubo. Se dejaron mezclar sin agitarse.
- 9.- Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) sin agitar.
- 10.- Los tubos fueron agitados de manera “suave” (manualmente), durante 1 o 2 segundos.
- 11.- Se agregaron 20 μ L (o 10 μ L de acuerdo a las instrucciones del fabricante).
- 12.- Vortexear suavemente cada tubo.
- 13.- Se dejaron incubando durante a temperatura ambiente (18-25 °C) en oscuridad.
- 14.- Se agregaron 4 mL de PBS.
- 15.- Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado por aspiración.
- 16.- Finalmente las células fueron resuspendidas en 500 μ L de PBS, conteniendo 0.5% de formaldehído, y se procedió a la citometría de flujo.

11.3. Apéndice 3

Obtención de neutrófilos por gradiente de densidad

- 1.- Se tomaron 5 mL de sangre periférica de una mujer no embarazada, clínicamente sana y sin aparentes estados inflamatorios.
- 2.- La sangre obtenida se colocó sobre una cama de polymorphoprep, dicha cama es de un volumen igual al de la sangre obtenida.
- 3.- Se centrifugó a 500 x(g) durante 30 minutos a 20 °C y sin freno.
- 4.- Una vez finalizado el paso anterior se tomó el pellet que contiene a los PMCs.

5.-Se les agrego buffer HEPES para regresarles la osmolaridad a las células, en una proporción 1:1 en relación al volumen obtenido al recuperar las células. Se centrifugaron por 10 minutos a 400 x(g) y 20 °C.

6.-Dependiendo de la cantidad de hemoglobina observada en el pellet celular, se le dieron los lavados necesarios con buffer de lisis hasta eliminarla por completo. Entre cada lavado se centrifugaban a 400 x(g) durante 10 minutos a 20 °C.

7.-Se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo, y se tomaron 10 µL para realizar el conteo en el hemocitómetro.

8.-Se tomó el volumen necesario del stock para colocar 25, 000 neutrófilos en cada caja, y se activaron con ácido araquidónico durante 30 minutos.

9.- Se colocaron los 25, 000 neutrófilos en las cajas correspondientes y se dejaron incubando por 24 horas.

11.4. Apéndice 4

Extracción de RNA

Se retiró el medio de cultivo de las cajas de cultivo y fueron lavadas con PBS 1X, esto para remover las posibles células muertas.

Fue adicionado 1 mL del reactivo de Trizol (TRI reagent) para las cajas T25.

Se dejaron incubando con este homogenizado durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

El sobrenadante se transfirió a tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 12, 000 x g 10 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se llevaron a tubos nuevos.

Extracción del RNA

A los sobrenadantes se les agregaron 200 µL de cloroformo por cada mililitro del reactivo de Trizol y se mezclaron vigorosamente.

Se dejaron incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugaron a 12, 000 x g 10 minutos a 4 °C.

De esto se tomaron 400 µL de la fase acuosa y se llevaron a un tubo nuevo de microcentrífuga.

Purificación final del RNA

Se añadieron 200 µL de etanol absoluto (se mezcló inmediatamente en un vortex a máxima velocidad), para permitir la precipitación del RNA.

Las muestras fueron transferidas a una columna con filtro y centrifugada a 12, 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.

Se lavó el filtro 2 veces con 500 µL de solución de lavado.

Se centrifugaron a 12, 000 x g 30 segundos a temperatura ambiente para remover la solución de lavado. Se centrifugaron una vez más sin solución de lavado.

El RNA se eluyó en 200 µL de buffer de elución y se dejaron incubando durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12, 000 xg 30 segundos en un tubo de colecta.

11.5. Apéndice 5

Análisis de concentración e integridad del RNA

1.- Los reactivos se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que se equilibraran antes de utilizarlos.

2.- El colorante concentrado RNA 6000 Nano se agito en el vortex durante 10 segundos y se centrifugó para concentrar todos los componentes.

3.- Se agregó 1 µL de este concentrado a una alícuota de 65 µL del gel previamente filtrado.

4.- Se agitó al máximo en el vortex, procurando que el gel y el colorante se mezclaran perfectamente. El colorante concentrado se almacenó a 4 °C y en la oscuridad.

5.- Este tubo se centrifugó por 10 minutos a temperatura ambiente a 13,000 g (o 14,000 rpm). Esta preparación es estable solo 1 día.

6.- La mezcla del colorante con el gel se dejó 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizado y durante este lapso se protegió de la luz.

7.-Se utilizó un Nano chip de RNA nuevo.

8.- El chip se colocó sobre la base para cargarlo.

9.- Se tomaron 9 µL de la mezcla de colorante con el gel y se dispensaron dentro del pozo marcado con la letra G.

10. Se dejaron transcurrir 30 segundos, asegurándose que el émbolo estuviera posicionado en 1 mL y entonces se cerró la base del chip. Se debe de escuchar un “click” cuando la base es cerrada adecuadamente.

11.- Presionar el émbolo de la jeringa hacia abajo hasta que este sea retenido por el clip.

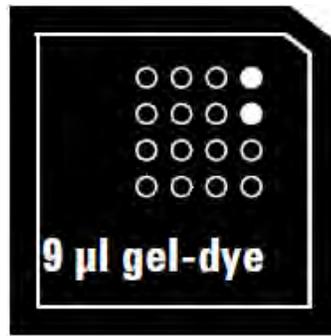
12.- Se espero un tiempo exacto de 30 segundos y entonces se libera la jeringa, mediante el mecanismo de liberación del clip.

13.- Visualmente se inspeccionó que el émbolo se moviera hacia atrás al menos hasta la marca de 0.3 mL.

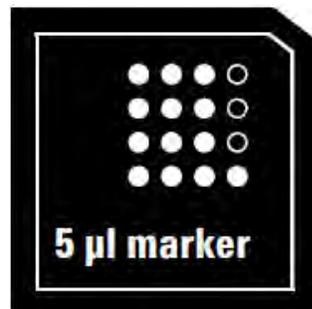
14.- 5 segundos después la jeringa se llevó nuevamente hasta la marca de 1 mL.

15.- Se abrió la base de chip.

16.- Se colocaron 9 μL más de la mezcla de colorante y gel en los pozos marcados a continuación.

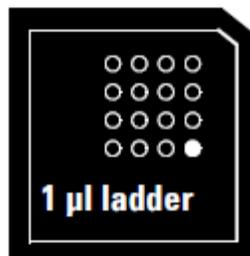


17.- Agregar 5 μL del marcador RNA 6000 Nano (verde) dentro del pozo marcado con el símbolo ladder  y en cada uno de los 12 pozos para muestras.

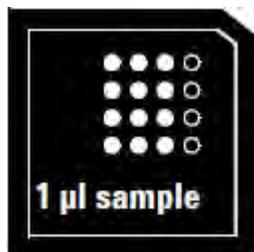


18.- Antes de ser utilizadas, las alícuotas a descongelar se mantuvieron en hielo (para evitar un calentamiento extensivo después del proceso de descongelación).

19.- Se pipetearon 1 μL del RNA ladder dentro del pozo marcado con el símbolo ladder  ladder.



20.- 1 μ L de cada una de las muestras fue colocado en cada uno de los 12 pozos para muestras.



21.- Se dejaron incubando durante 60 segundos.

22.- El chip fue colocado de manera horizontal sobre el adaptador del vortex IKA y se mezcló, asegurándonos de no dañar la pieza que mantiene fijo al chip durante el proceso de agitación.

23.- Se agitó en el vortex durante 60 segundos a 2400 rpm.

24.- Finalmente el chip fue leído en el bioanalyzer 2100 de Agilent.

11.6. Apéndice 6

Cuantificación mediante ELISA de la Subunidad Catalítica de la Glutamato Cisteín Ligasa (GCLC).

Previo a comenzar la experimentación los reactivos se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

1.-Se agregaron 100 μ L de cada uno de los estándares (se agitó el frasco de cada estándar suavemente 3 veces antes de agregarlos) o de las muestras a los pozos apropiados. Se adicionaron 100 μ L de PBS (pH 7.0-7.2) en los pozos destinados para el blanco.

2.-Se agregaron 10 μ L de la solución de balanceo únicamente en los pozos que contenían las muestras, se mezcló debidamente.

3.-Se añadieron 50 μ L del conjugado a todos los pozos (excepto al pozo que contenía el blanco). Se mezcló. Se cubrió y se incubo la placa durante 1 hora a 37 °C.

4.- La placa se lavó utilizando el método indicado abajo:

Lavado manual: Se removió la mezcla de incubación aspirando el contenido de la placa en un contenedor apropiado. Fueron llenados todos los pozos completamente con solución de lavado 1X, y entonces se aspiró el contenido con una pipeta y se desechó en un contenedor adecuado. Este procedimiento fue realizado 5 veces, para un total de 5

lavados. Una vez finalizado el quinto lavado, se invirtió la placa y se dejó secar sobre papel absorbente.

5.- 50 μ L del substrato A y 50 μ L del substrato B fueron agregados subsecuentemente a todos los pozos incluyendo el blanco. Se cubrió y se incubó de 10-15 minutos a 37 °C.

6.- Pasado este tiempo se agregaron 50 μ L de la solución de paro a todos los pozos, incluyendo al blanco.

7.- Se determinó la Densidad Óptica inmediatamente a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

11.7. Apéndice 7

Cuantificación mediante ELISA de la peroxirredoxina 3 (PRDX 3).

1.-Se agregaron 50 μ L de cada uno de los estándares a los pozos adecuados, así como 50 μ L de cada una de las muestras, y 50 μ L del diluyente a los pozos destinados para el blanco.

2.-Se adicionaron 100 μ L del reactivo HRP-conjugado a cada uno de los pozos, se cubrió la placa y se incubó durante 60 minutos a 37 °C.

3.-Se le realizaron 4 lavados a la placa de la siguiente manera:

Se desechó el contenido de cada uno de los pozos en un contenedor apropiado. Utilizando una pipeta o una piseta, se llenaron completamente todos los pozos con buffer de lavado 1X, y se dejó sobre papel absorbente hasta no observar buffer de lavado en los pozos, este procedimiento se repitió 4 veces.

4.-Se agregaron 50 μ L de la solución de cromógeno A y 50 μ L de la solución de cromógeno B a cada uno de los pozos de manera sucesiva. Se incubó 15 minutos protegida de la luz a 37 °C.

5.-Transcurrido este tiempo, se le adicionaron 50 μ L de la solución de paro a cada pozo.

6.-Se determinó la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas.

12. Referencias

- AGARWAL, A., APONTE-MELLADO, A., PREMKUMAR, B. J., SHAMAN, A. & GUPTA, S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 49.
- AGARWAL, A., GUPTA, S. & SHARMA, R. K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28.
- ALVIN, L. W., GEE, S. H., HONG, H. H., CHRISTOPHER, C. W., HENRY, H. S., WEBER, L. K., HOON, T. P. & SHIONG, L. L. 2015. Oncological outcomes following robotic-assisted radical prostatectomy in a multiracial Asian population. *J Robot Surg*, 9, 201-9.
- ANDERSON, U. D., OLSSON, M. G., KRISTENSEN, K. H., AKERSTROM, B. & HANSSON, S. R. 2012. Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta*, 33 Suppl, S42-7.
- ANTTILA, S., LUOSTARINEN, L., HIRVONEN, A., ELOVAARA, E., KARJALAINEN, A., NURMINEN, T., HAYES, J. D., VAINIO, H. & KETTERER, B. 1995. Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: association with GSTM1 polymorphism, smoking, and asbestos exposure. *Cancer Res*, 55, 3305-9.
- ARAKI, M., NANRI, H., EJIMA, K., MURASATO, Y., FUJIWARA, T., NAKASHIMA, Y. & IKEDA, M. 1999. Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system. *J Biol Chem*, 274, 2271-8.
- BARDEN, A., RITCHIE, J., WALTERS, B., MICHAEL, C., RIVERA, J., MORI, T., CROFT, K. & BEILIN, L. 2001. Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in preeclampsia. *Hypertension*, 38, 803-8.
- BEHRMAN, H. R., KODAMAN, P. H., PRESTON, S. L. & GAO, S. 2001. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*, 8, S40-2.
- BELLAMY, L., CASAS, J. P., HINGORANI, A. D. & WILLIAMS, D. J. 2007. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 335, 974.
- BHARATI, J., DANGI, S. S., BAG, S., MAURYA, V. P., SINGH, G., KUMAR, P. & SARKAR, M. 2017. Expression dynamics of HSP90 and nitric oxide synthase (NOS) isoforms during heat stress acclimation in Tharparkar cattle. *Int J Biometeorol*.
- BIRD, I. M., ZHANG, L. & MAGNESS, R. R. 2003. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R245-58.
- BORCHERT, A., SAVASKAN, N. E. & KUHN, H. 2003. Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *J Biol Chem*, 278, 2571-80.
- BRENNAN, L. J., MORTON, J. S. & DAVIDGE, S. T. 2014. Vascular dysfunction in preeclampsia. *Microcirculation*, 21, 4-14.
- BURTON, G. J. & JAUNIAUX, E. 2011. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25, 287-99.
- BUTTERWORTH, B. H., GREER, I. A., LISTON, W. A., HADDAD, N. G. & JOHNSTON, T. A. 1991. Immunocytochemical localization of neutrophil elastase in term placenta decidua and myometrium in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol*, 98, 929-33.
- CADDEN, K. A. & WALSH, S. W. 2008. Neutrophils, but not lymphocytes or monocytes, infiltrate maternal systemic vasculature in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 27, 396-405.

- CALLEJA-AGIUS, J., JAUNIAUX, E., PIZZEY, A. R. & MUTTUKRISHNA, S. 2012. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. *Hum Reprod*, 27, 349-57.
- CRONQVIST, T., SALJE, K., FAMILARI, M., GULLER, S., SCHNEIDER, H., GARDINER, C., SARGENT, I. L., REDMAN, C. W., MORGELIN, M., AKERSTROM, B., GRAM, M. & HANSSON, S. R. 2014. Syncytiotrophoblast vesicles show altered micro-RNA and haemoglobin content after ex-vivo perfusion of placentas with haemoglobin to mimic preeclampsia. *PLoS One*, 9, e90020.
- CHAE, H. Z., ROBISON, K., POOLE, L. B., CHURCH, G., STORZ, G. & RHEE, S. G. 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7017-21.
- CHANDRA, A., SURTI, N., KESAVAN, S. & AGARWAL, A. 2009. Significance of oxidative stress in human reproduction. *Archives of Medical Science*, 5, S28-S42.
- CHATURVEDI, R., DE SABLET, T., COBURN, L. A., GOBERT, A. P. & WILSON, K. T. 2012. Arginine and polyamines in *Helicobacter pylori*-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis. *Amino Acids*, 42, 627-40.
- CHEN, C., CHI, Y. J., ZHAO, M. Y. & LV, L. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*, 43, 457-66.
- CHRISTOPHER CUTLER, G. & SCOTT-DUPREE, C. D. 2014. A field study examining the effects of exposure to neonicotinoid seed-treated corn on commercial bumble bee colonies. *Ecotoxicology*, 23, 1755-63.
- DENNERY, P. A. 2010. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic Biol Med*, 49, 1147-51.
- DIOGUARDI, F. S. 2011. Clinical use of amino acids as dietary supplement: pros and cons. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2, 75-80.
- DULEY, L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33, 130-7.
- ERICKSON, A. M., NEVAREA, Z., GIPP, J. J. & MULCAHY, R. T. 2002. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence. *J Biol Chem*, 277, 30730-7.
- FORSTERMANN, U. & MUNZEL, T. 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113, 1708-14.
- FRANKLIN, C. C., BACKOS, D. S., MOHAR, I., WHITE, C. C., FORMAN, H. J. & KAVANAGH, T. J. 2009. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med*, 30, 86-98.
- FUCHS, T. A., ABED, U., GOOSMANN, C., HURWITZ, R., SCHULZE, I., WAHN, V., WEINRAUCH, Y., BRINKMANN, V. & ZYCHLINSKY, A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176, 231-41.
- FUJII, J., IUCHI, Y. & OKADA, F. 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 43.
- GANDLEY, R. E., ROHLAND, J., ZHOU, Y., SHIBATA, E., HARGER, G. F., RAJAKUMAR, A., KAGAN, V. E., MARKOVIC, N. & HUBEL, C. A. 2008. Increased myeloperoxidase in the placenta and circulation of women with preeclampsia. *Hypertension*, 52, 387-93.
- GOETZ, R. M., THATTE, H. S., PRABHAKAR, P., CHO, M. R., MICHEL, T. & GOLAN, D. E. 1999. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2788-93.

- GREER, I. A., DAWES, J., JOHNSTON, T. A. & CALDER, A. A. 1991. Neutrophil activation is confined to the maternal circulation in pregnancy-induced hypertension. *Obstet Gynecol*, 78, 28-32.
- GREER, I. A., HADDAD, N. G., DAWES, J., JOHNSTONE, F. D. & CALDER, A. A. 1989. Neutrophil activation in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol*, 96, 978-82.
- GRIFFITH, O. W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 27, 922-35.
- GRIFFITH, O. W. & MULCAHY, R. T. 1999. The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 73, 209-67, xii.
- GUPTA, A. K., HASLER, P., HOLZGREVE, W., GEBHARDT, S. & HAHN, S. 2005. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol*, 66, 1146-54.
- HA, T., KIM, H., CHRISTOPHER, C., CARUTHERS, A. & DISHION, T. J. 2016. Predicting sexual coercion in early adulthood: The transaction among maltreatment, gang affiliation, and adolescent socialization of coercive relationship norms. *Dev Psychopathol*, 28, 707-20.
- HANAFY, K. A., KRUMENACKER, J. S. & MURAD, F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 7, 801-19.
- HANSCHMANN, E. M., LONN, M. E., SCHUTTE, L. D., FUNKE, M., GODOY, J. R., EITNER, S., HUDEMANN, C. & LILLIG, C. H. 2010. Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J Biol Chem*, 285, 40699-705.
- HARRINGTON, K., GOLDFRAD, C., CARPENTER, R. G. & CAMPBELL, S. 1997. Transvaginal uterine and umbilical artery Doppler examination of 12-16 weeks and the subsequent development of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 9, 94-100.
- HAYES, J. D. & PULFORD, D. J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30, 445-600.
- HAYES, J. D. & STRANGE, R. C. 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*, 22, 193-207.
- HUBEL, C. A. 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 222-35.
- IGNARRO, L. J. 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*, 53, 503-14.
- KALYANARAMAN, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*, 1, 244-57.
- KARUMANCHI, S. A. & EPSTEIN, F. H. 2007. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia? *Kidney Int*, 71, 959-61.
- KAWASAKI, K., KONDOH, E., CHIGUSA, Y., UJITA, M., MURAKAMI, R., MOGAMI, H., BROWN, J. B., OKUNO, Y. & KONISHI, I. 2015. Reliable pre-eclampsia pathways based on multiple independent microarray data sets. *Mol Hum Reprod*, 21, 217-24.
- KENSLER, T. W., WAKABAYASHI, N. & BISWAL, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89-116.
- KUC, S., WORTELBOER, E. J., VAN RIJN, B. B., FRANX, A., VISSER, G. H. & SCHIELEN, P. C. 2011. Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv*, 66, 225-39.
- LAM, C., LIM, K. H. & KARUMANCHI, S. A. 2005. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*, 46, 1077-85.
- LARESGOITI-SERVITJE, E. 2013. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol*, 94, 247-57.

- LARESGOITI-SERVITJE, E., GOMEZ-LOPEZ, N. & OLSON, D. M. 2010. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. *Hum Reprod Update*, 16, 510-24.
- LEIK, C. E. & WALSH, S. W. 2004. Neutrophils infiltrate resistance-sized vessels of subcutaneous fat in women with preeclampsia. *Hypertension*, 44, 72-7.
- LIN, S., FAGAN, K. A., LI, K. X., SHAUL, P. W., COOPER, D. M. & RODMAN, D. M. 2000. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca²⁺ entry. *J Biol Chem*, 275, 17979-85.
- LIU, L., YANG, C., YUAN, J., CHEN, X., XU, J., WEI, Y., YANG, J., LIN, G. & YU, L. 2005. RPK118, a PX domain-containing protein, interacts with peroxiredoxin-3 through pseudo-kinase domains. *Mol Cells*, 19, 39-45.
- LU, S. C. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30, 42-59.
- LUSCHER, T. F. 1990. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension*, 15, 482-5.
- LYALL, F., ROBSON, S. C. & BULMER, J. N. 2013. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension*, 62, 1046-54.
- MULCAHY, R. T., WARTMAN, M. A., BAILEY, H. H. & GIPP, J. J. 1997. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem*, 272, 7445-54.
- MURPHY, S. R., LAMARCA, B. B., PARRISH, M., COCKRELL, K. & GRANGER, J. P. 2013. Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304, R130-5.
- MYATT, L. 2010. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, 31 Suppl, S66-9.
- MYATT, L. & WEBSTER, R. P. 2009. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost*, 7, 375-84.
- NATHAN, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6, 173-82.
- NEEMS, L. & CHRISTOPHER, C. 2016. Orbital Recurrence of Ethmoid Sinus Malignant Meningioma: Case Study and Literature Review. *Ophthal Plast Reconstr Surg*.
- NISELL, H., LINTU, H., LUNELL, N. O., MOLLERSTROM, G. & PETTERSSON, E. 1995. Blood pressure and renal function seven years after pregnancy complicated by hypertension. *Br J Obstet Gynaecol*, 102, 876-81.
- ORSI, N. M., GOPICHANDRAN, N., LEESE, H. J., PICTON, H. M. & HARRIS, S. E. 2005. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction*, 129, 219-28.
- PAPAPETROPOULOS, A., GARCIA-CARDENA, G., MADRI, J. A. & SESSA, W. C. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 100, 3131-9.
- PEREZ-SEPULVEDA, A., TORRES, M. J., KHOURY, M. & ILLANES, S. E. 2014. Innate immune system and preeclampsia. *Front Immunol*, 5, 244.
- PERINATOLOGÍA, I. N. D. 2008. Anuario estadístico 2001. INPer México.
- PERKINS, A. V. 2006. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 46, 77-83.
- POPOLO, A., ADESSO, S., PINTO, A., AUTORE, G. & MARZOCCO, S. 2014. L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease. *Amino Acids*, 46, 2271-86.

- QUINN, M. T., LINNEN, J. G., SIEMSEN, D., DRATZ, E. A., BUESCHER, E. S. & JESAITIS, A. J. 1995. Immunocytochemical detection of lipid peroxidation in phagosomes of human neutrophils: correlation with expression of flavocytochrome b. *J Leukoc Biol*, 57, 415-21.
- RAIJMAKERS, M. T., DECHEND, R. & POSTON, L. 2004. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension*, 44, 374-80.
- RAMMA, W., BUHIMSCHI, I. A., ZHAO, G., DULAY, A. T., NAYERI, U. A., BUHIMSCHI, C. S. & AHMED, A. 2012. The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis*, 15, 333-40.
- REDMAN, C. W. & SARGENT, I. L. 2010. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 63, 534-43.
- RHEE, S. G., CHAE, H. Z. & KIM, K. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*, 38, 1543-52.
- ROBERTS, J. M. & HUBEL, C. A. 1999. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet*, 354, 788-9.
- ROSSELLI, M., KELLER, P. J. & DUBEY, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*, 4, 3-24.
- RUDER, E. H., HARTMAN, T. J. & GOLDMAN, M. B. 2009. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 21, 219-22.
- RUDOV, A., BALDUINI, W., CARLONI, S., PERRONE, S., BUONOCORE, G. & ALBERTINI, M. C. 2014. Involvement of miRNAs in placental alterations mediated by oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 103068.
- SAITO, S. & NAKASHIMA, A. 2014. A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia: the role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling. *J Reprod Immunol*, 101-102, 80-8.
- SIBAI, B. M. 2003. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 102, 181-92.
- SLADEK, S. M., MAGNESS, R. R. & CONRAD, K. P. 1997. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol*, 272, R441-63.
- SMITH, G. C., PELL, J. P. & WALSH, D. 2001. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*, 357, 2002-6.
- TANNETTA, D. S., DRAGOVIC, R. A., GARDINER, C., REDMAN, C. W. & SARGENT, I. L. 2013. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One*, 8, e56754.
- TJOA, M. L., CINDROVA-DAVIES, T., SPASIC-BOSKOVIC, O., BIANCHI, D. W. & BURTON, G. J. 2006. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol*, 169, 400-4.
- TOWNSEND, D. M. 2007. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv*, 7, 313-24.
- TSUKIMORI, K., TSUSHIMA, A., FUKUSHIMA, K., NAKANO, H. & WAKE, N. 2008. Neutrophil-derived reactive oxygen species can modulate neutrophil adhesion to endothelial cells in preeclampsia. *Am J Hypertens*, 21, 587-91.
- VADILLO-ORTEGA, F., PERICHART-PERERA, O., ESPINO, S., AVILA-VERGARA, M. A., IBARRA, I., AHUED, R., GODINES, M., PARRY, S., MACONES, G. & STRAUSS, J. F. 2011. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ*, 342, d2901.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- VERLOHREN, S., GEUSENS, N., MORTON, J., VERHAEGEN, I., HERING, L., HERSE, F., DUDENHAUSEN, J. W., MULLER, D. N., LUFT, F. C., CARTWRIGHT, J. E., DAVIDGE, S. T., PIJNENBORG, R. & DECHEND, R. 2010. Inhibition of trophoblast-induced spiral artery remodeling reduces placental perfusion in rat pregnancy. *Hypertension*, 56, 304-10.
- VISIOLI, F. & HAGEN, T. M. 2011. Antioxidants to enhance fertility: role of eNOS and potential benefits. *Pharmacol Res*, 64, 431-7.
- WEBSTER, R. P., ROBERTS, V. H. & MYATT, L. 2008. Protein nitration in placenta - functional significance. *Placenta*, 29, 985-94.
- WEISS, G., GOLDSMITH, L. T., TAYLOR, R. N., BELLET, D. & TAYLOR, H. S. 2009. Inflammation in reproductive disorders. *Reprod Sci*, 16, 216-29.
- WONSEY, D. R., ZELLER, K. I. & DANG, C. V. 2002. The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6649-54.
- WU, G., FANG, Y. Z., YANG, S., LUPTON, J. R. & TURNER, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134, 489-92.
- XU, S., GOZEM, S., KRYLOV, A. I., CHRISTOPHER, C. R. & WEBER, J. M. 2015. Ligand influence on the electronic spectra of monocationic copper-bipyridine complexes. *Phys Chem Chem Phys*, 17, 31938-46.
- YADAV, V. P., DANGI, S. S., CHOUHAN, V. S., GUPTA, M., DANGI, S. K., SINGH, G., MAURYA, V. P., KUMAR, P. & SARKAR, M. 2016. Expression analysis of NOS family and HSP genes during thermal stress in goat (*Capra hircus*). *Int J Biometeorol*, 60, 381-9.
- YANG, X., GUO, L., LI, H., CHEN, X. & TONG, X. 2012. Analysis of the original causes of placental oxidative stress in normal pregnancy and pre-eclampsia: a hypothesis. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 25, 884-8.
- YU, J., HU, Y., XUE, M., DUN, Y., LI, S., PENG, N., LIANG, Y. & ZHAO, S. 2016. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *J Microbiol Biotechnol*, 26, 1216-23.

